



HAL
open science

Comportement d'un "Perturbateur Endocrinien" et d'un "non Perturbateur Endocrinien" vis à vis de la toxicité testiculaire chez le rat

Sophie Ludwig

► **To cite this version:**

Sophie Ludwig. Comportement d'un "Perturbateur Endocrinien" et d'un "non Perturbateur Endocrinien" vis à vis de la toxicité testiculaire chez le rat. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114828 . tel-00658641

HAL Id: tel-00658641

<https://theses.hal.science/tel-00658641>

Submitted on 10 Jan 2012

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE : Biologie Cellulaire et Moléculaire

ANNÉE 2008 - 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1131

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 18/11/2011

par

Sophie LUDWIG

Comportement d'un "Perturbateur Endocrinien" et d'un
"non Perturbateur Endocrinien" vis-à-vis de la toxicité
testiculaire chez le rat

Directeur de thèse : Marc PALLARDY Professeur, INSERM UMR-S 996, Université Paris-Sud

Co-directeur de thèse : Helen TINWELL Directeur d'études R&D Toxicologie, Bayer Cropscience,
Sophia Antipolis

Composition du jury :

Président du jury : Moïse PINTO Professeur, Université Paris-Sud

Rapporteurs : Robert BAROUKI Professeur, INSERM UMR-S 747, Université
Paris Descartes

René HABERT Directeur de Recherches, CEA - UMR 967,
Fontenay-aux-Roses

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ANRT, le CEFIC et Bayer Cropscience pour m'avoir accordé l'opportunité d'effectuer cette thèse. Ces trois années resteront à jamais une expérience inoubliable.

Je remercie les Professeurs Robert Barouki et René Habert pour avoir accepté de consacrer de leur temps à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit, ainsi que l'ensemble des membres du jury de thèse, qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail, hommages respectueux.

Je tiens ensuite à exprimer mes remerciements à Rémi Bars pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, et pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans de très bonnes et très agréables conditions de travail. Il m'a guidée tout au long de cette thèse par ses précieux enseignements. Je le remercie de m'avoir initiée à la thématique des perturbateurs endocriniens, et de m'avoir laissé entrevoir le monde de la recherche industrielle. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.

Toute ma reconnaissance et ma gratitude au Professeur Marc Pallardy, d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse, pour ses conseils et son implication dans le suivi de ce projet de recherche, malgré la distance qui nous a éloignés.

Merci à Helen Tinwell pour son encadrement tout au long de ces trois années de thèse ; sans elle cette thèse n'aurait pas du tout la même couleur. Les mots ne suffisent pas pour lui exprimer toute ma gratitude et toute ma reconnaissance pour son soutien scientifique et moral. Merci de m'avoir supportée, écoutée, et conseillée. Tu as su encadrer mon travail avec calme et rigueur. Je n'oublierai jamais ta simplicité et gentillesse, ton enthousiasme, ta bonne humeur et ta profonde humanité. A ton contact, j'ai pu acquérir l'autonomie et, je l'espère, l'esprit scientifique critique qui me seront nécessaires tout au long de ma carrière professionnelle. Tu m'as permis de réaliser combien la recherche était passionnante et méritait un véritable investissement. Tu as été une directrice hors pair, et la confiance que tu m'as accordée a su créer l'environnement nécessaire à la réalisation de ce projet.

Je remercie également David Rouquié qui a joué un rôle clé durant ma thèse. Merci pour ton soutien, ton enthousiasme de tout instant et tes conseils scientifiques avisés. Nos nombreuses discussions m'ont permis de conduire à bien cette thèse. Tu m'as initiée à la biologie moléculaire et a su me faire partager ta passion pour ce domaine.

Ces années de thèse ont été riches en émotions et en rencontres, tant sur le plan professionnel que personnel. Durant cette période, j'ai rencontré des personnes formidables. Un grand Merci.

Avec émotion à l'équipe technique, et plus particulièrement Nicole, Béné, Sophie et Mapie. Mille mercis pour votre aide précieuse, et votre forte implication à l'avancement de mes recherches. A toutes les quatre, un grand merci surtout pour m'avoir accordé votre amitié, qui me tient à cœur, pour tous les fous rires, pour notre complicité et pour les longues discussions partagées. Le travail au sein du laboratoire m'a permis de faire votre rencontre, et je n'oublierai jamais les bons moments que nous avons passés ensemble. Nicole, tu as été comme une maman dans ce sud qui m'était étranger, tu m'as accueillie à bras ouverts avec Daniel. Ceci restera gravé. Vous êtes les bienvenus en Alsace, où je vous promets, entre autres, une bonne côte de bœuf, précédée d'une dégustation des meilleurs vins blancs. Béné, merci pour ton exubérance, et ton côté tellement décalé : un vrai ouragan dans un monde engoncé ! Il va s'en dire que j'ai une pensée spéciale pour toi, dont ta gentillesse à mon égard m'a touchée profondément. Tu as su me remonter le moral dans mes moments de doute, et me motiver lors de mes moments de solitude en m'ouvrant ta porte. Quand tu veux, les Bory en Alsace ! Toutes mes amitiés également à Sophie qui m'a initiée aux techniques de biologie cellulaire, et qui a su être une oreille des plus attentives. Mapie, tu m'as encouragée tout au long de ce travail, et m'as prodiguée de judicieux conseils, dont nombreux sont ceux relatifs à l'apprentissage de la vie. Merci du fond du cœur les filles !

Une pensée affectueuse pour mes "co-galériens", Ihab et Céline, les deux autres thésards, avec qui nous formions le trio infernal. En particulier, un grand merci à Céline, Steph et Daisy, les nénettes de l'équipe, pour tous ces moments passés avec vous, nos balades dans les magasins et à la plage, et pour tous vos soutiens professionnels, mais surtout

personnels. Céline, ta disponibilité, ton assistance pour les puces, ta joie de vivre communicative, nos délires, et je dois surement oublier bon nombre de tes qualités : pour toutes ces raisons, je tiens à te dire un grand merci. Steph, bien sûr, l'autre blonde du ch'nord, parachutée comme moi dans le sud, ma compagne de soirées bureau, de week-ends plage, shopping et films, je te remercie pour ta gaieté et surtout ta présence : cette expérience n'aurait pas été la même sans toi. Une pensée pour Daisy, une stagiaire hors pair qui a su être efficace dans son travail, et dieu sait que je lui en ai demandé beaucoup (broyage de testicules !). Devenue une collègue, nos fous rires et discussions partagés (scientifiques ou non) vont me manquer. Ces trois drôles de dames ont bien égayé mon quotidien et vont drôlement me manquer : une amitié qui, je l'espère profondément, durera malgré les distances qui nous sépareront. Vous connaître a été pour moi un grand plaisir.

A l'équipe de pathologie clinique pour leur contribution essentielle à ce travail notamment Dominique, Annelise et Maud. Maud, tu as toujours répondu présente à mes multiples sollicitations, dosé des centaines voire milliers d'échantillons...Merci pour ton aide et surtout ton amitié, qui a éclot au cours de cette thèse.

A l'équipe patho, et particulièrement Edouard, Emmanuelle, et Frédéric pour toutes vos connaissances sur l'appareil reproducteur mâle, et toutes vos compétences en histologie, qui m'ont été fort utiles au cours de ces trois ans.

A Angeline, François et Daniel, toujours de très bonne humeur et communicative, ainsi que Teureu et Tau, avec qui les petites blagounettes étaient sans fin et toujours très créatives.

A mes relectrices, et tueuses de fautes d'orthographes : vous avez toute ma compassion.

A toute la petite famille de Bayer, qui a égayé mon quotidien au cours de ces trois années passées à vos côtés, merci pour votre sympathie et vos encouragements : Olivier, qui a toujours été disponible pour me conseiller et m'écouter ; Denys, pour sa sympathie et son grand cœur ; Marie-France, pour ton sourire et ton aide administrative ; Aline, que j'ai sollicité plus d'une fois pour des tests immunohistochimiques, tu as toujours su donner le

meilleur de toi-même ; René, mon petit papi qui a toujours pris de mes nouvelles ; Valérie, pour les dosages hormonaux ; Patrice, pour les demandes de formulations de dernières minutes ; Bernard, pour le planning des études ; Arbana, à l'écoute de mes problèmes de cœur ; José, pour ta disponibilité au magasin ; Agnès, une nouvelle collègue de l'open space ; et l'équipe de Lyon, pour les analyses par HPLC.

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et que j'aurais oubliées de citer.

A mes parents, ma sœur et ma grand-mère, qui ont toujours cru en moi tout au long de mon parcours universitaire, même dans mes moments de doute. Vous avez toujours respecté et encouragé mes choix, merci d'avoir été là pour me soutenir à tout moment, et ceci malgré l'éloignement géographique. Avec toute votre tendresse et votre affection, vous m'avez toujours fait confiance. Vous avez su être présents et discrets, comprendre et partager mes joies et mes peines.

A Aude mon amie de toujours, présente malgré la distance. Ton soutien et ton encouragement sans faille m'ont énormément touchée au cours de cette expérience.

A Stéphane, un énorme merci pour ta patience, ton écoute, tes conseils et ta présence tout au long de cette thèse. Sans toi, elle n'aurait pu voir le jour ; sans toi, je n'aurais pas tenu. Je n'aurai jamais assez de ces quelques lignes dans ce manuscrit pour te remercier pour ton amour. Je crois savoir que tu es content que tout cela s'achève enfin, car maintenant de nouvelles aventures s'annoncent pour nous ...De tout mon cœur, je t'aime.

RÉSUMÉ

Comportement d'un "Perturbateur Endocrinien" et d'un "non Perturbateur Endocrinien" vis-à-vis de la toxicité testiculaire chez le rat

Depuis plusieurs années, des agents exogènes environnementaux appelés perturbateurs endocriniens (PE), sont soupçonnés d'interférer avec les fonctions essentielles de reproduction et de développement chez de nombreux organismes vivants. Au travers de ce travail, nous avons tenté de combler certaines lacunes afin de mieux comprendre les dangers pour l'Homme posés par ces produits. Des études ont été menées visant à caractériser la toxicité testiculaire, chez le rat adulte, induite par des composés aux mécanismes d'action toxique divers (PE et non PE), ceci dans le but d'établir *in fine* l'existence ou non d'un comportement propre aux PE. En évaluant les effets de l'anti-androgène flutamide, nous avons identifié des changements d'expression géniques dose-reliés pour les voies métaboliques majeures associées à la lésion du testicule (ex. métabolisme des acides gras), et démontré l'existence d'une "dose sans effet moléculaire" inférieure à la NOAEL définie sur la base des changements phénotypiques adverses. Des études ont également été conduites avec le 1,3-dinitrobenzène, composé décrit dans la littérature comme n'interférant pas avec le système endocrinien et ayant pour cibles les cellules de Sertoli. Nous avons établi qu'en plus d'induire l'apoptose des cellules germinales et d'altérer la progression du cycle cellulaire, cette substance affecte aussi la stéroïdogénèse, remettant quelque peu en question l'origine de sa toxicité. En conclusion, l'ensemble de nos résultats nous ont permis d'apporter des précisions sur le mécanisme d'action toxique des deux molécules examinées et d'identifier des doses sans effet pour chacune d'entre elles. Ils contribuent également au débat portant sur la définition des critères requis pour la détermination des propriétés de PE.

Mots clés : rat mâle, testicule, perturbateur endocrinien, toxique testiculaire à "action directe", transcriptomique, dose sans effet, comportement

Evaluation of testicular toxicity in rats to determine whether endocrine disrupters are fundamentally different to non-endocrine disrupters in their comporment

For several years, certain environmental chemicals known as endocrine disrupters (ED) have been suspected to modulate essential functions like reproduction and development in intact organisms. Through this work, we have tried to fill some of the gaps in the understanding of the dangers posed by these products to man. Studies in adult rats were conducted to characterize testicular toxicity induced by compounds with different mechanisms of toxicity (ED and non-ED), in order to determine ultimately whether or not there exists a behavior specific to EDs. By assessing the effects of the anti-androgen, flutamide, we identified dose-related gene expression changes for the major metabolic pathways associated with testicular injury (eg, fatty acid metabolism) and demonstrated the existence of a "molecular no effect dose" preceding the NOAEL based on adverse phenotypic changes. Studies were also conducted with 1,3-dinitrobenzene (DNB), a compound considered as a direct-acting testicular toxicant and not as an ED. We established that, in addition to inducing germ cell apoptosis and affecting cell cycle progression, DNB interferes with the biosynthesis of steroid hormones, bringing into question the classing of this molecule as a non-ED. In conclusion, our results allowed us to address relevant issues within the field of ED, leading to new insights about the mechanisms of toxicity for the two molecules examined, and the identification of doses without effect for each of them. Our data also contribute to the debate concerning the definition of criteria required for the determination of endocrine disrupting properties.

Keywords: male rat, testis, endocrine disrupter, direct acting testicular toxicant, transcriptomics, no effect dose, comporment

Intitulé et adresse du laboratoire :

Université Paris-Sud,
INSERM UMR-S 996
Faculté de Pharmacie
5 rue Jean-Baptiste Clément
92290 Châtenay-Malabry

Thèse préparée au sein du :

Département Toxicologie
Recherche
Bayer S.A.S.
355, rue Dostoïevski, BP 153
06903 Sophia Antipolis Cedex

TABLE DES MATIÈRES

<i>ILLUSTRATIONS</i>	14
<i>ABRÉVIATIONS</i>	17
<i>AVANT PROPOS</i>	22
<i>INTRODUCTION DU SUJET</i>	25
1. CONTEXTE.....	25
2. TRAVAUX DE RECHERCHE	27
<i>INTRODUCTION GÉNÉRALE</i>	30
CHAPITRE I – LE SYSTEME ENDOCRINIEN	31
1. LE SYSTEME ENDOCRINIEN : DEFINITION.....	31
2. LES GLANDES ENDOCRINES	32
3. CHIMIE DES HORMONES	43
4. MÉCANISME DE L’ACTION HORMONALE	45
5. RÉGULATION DU SYSTÈME ENDOCRINIEN	48
6. PERTURBATIONS DU SYSTEME ENDOCRINIEN.....	49
A. <i>Perturbateurs Endocriniens : Définitions</i>	49
B. <i>Substances et origines</i>	50
I. <i>Les substances naturelles</i>	51
i. Les hormones naturelles	51
ii. Les Phyto-œstrogènes.....	52
iii. Les myco-œstrogènes	54
II. <i>Les substances synthétiques</i>	55
i. Les hormones de synthèse	55
ii. Les composés pharmaceutiques et autres produits chimiques	55
C. <i>Mécanismes d’action</i>	56
D. <i>Conséquences potentielles résultant de l’exposition à des perturbateurs endocriniens</i>	59
I. <i>Effets sur la faune</i>	59
II. <i>Effets sur l’Homme</i>	61
7. EVALUATION DE LA SECURITE DES PRODUITS CHIMIQUES POUR L’HOMME : DETECTION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.....	63
A. <i>Généralités</i>	63
B. <i>Tests de criblage et modèles in vitro</i>	64
I. <i>Tests de liaison au récepteur</i>	65
II. <i>Tests d’activation transcriptionnelle</i>	65
III. <i>Test de stéroïdogénèse sur des cellules H295R</i>	66
IV. <i>Test de l’activité de l’aromatase</i>	66

C.	<i>Etudes in vivo réalisées en toxicologie : détection d'éventuels perturbateurs endocriniens pour l'Homme</i>	67
I.	<i>Test utérotrophique</i>	67
II.	<i>Test Hershberger</i>	68
III.	<i>Tests pubertaires</i>	68
IV.	<i>Etudes de toxicité après administrations répétées</i>	69
D.	<i>Outils utilisés en toxicologie</i>	70
I.	<i>Outils conventionnels</i>	71
II.	<i>Nouveaux outils "-omiques"</i>	72
III.	<i>.... Dont la toxico-transcriptomique</i>	73
CHAPITRE II – L'APPAREIL REPRODUCTEUR MALE		76
1.	GENERALITES	76
2.	LE TESTICULE	77
A.	<i>Compartiment tubulaire et fonction exocrine</i>	79
I.	<i>La spermatogenèse au sein des tubes séminifères</i>	79
i.	Structure des tubes séminifères	79
ii.	La spermatogenèse	80
☒	Phases de la spermatogenèse	80
☒	Cycle de la spermatogenèse	82
II.	<i>La cellule de Sertoli</i>	84
i.	Généralités et structure de la cellule de Sertoli	84
ii.	Fonctions de la cellule de Sertoli, cellule de soutien pour la spermatogenèse	85
III.	<i>Contrôle endocrinien de la spermatogenèse</i>	89
i.	Contrôle par les hormones	90
☒	Les gonadotrophines hypophysaires	90
☒	La testostérone	91
☒	L'œstradiol	92
☒	La prolactine	93
ii.	Régulation paracrine ou contrôle local	93
☒	L'androgen binding protein	93
☒	Les cytokines	94
☒	Les facteurs de croissance	94
B.	<i>Compartiment interstitiel et fonction endocrine</i>	95
I.	<i>L'interstitium</i>	95
i.	Biosynthèse, production et action des androgènes par les cellules de Leydig	96
☒	Généralités et structure de la cellule de Leydig	96
☒	La stéroïdogénèse	97
☒	Métabolisme des androgènes	100
☒	Rôles de la testostérone et de ses dérivés	101
☒	Mécanisme d'action des androgènes	103
Le récepteur aux androgènes	104	
Mode d'action du récepteur aux androgènes	108	

☒ Catabolisme et élimination des androgènes	112
II. <i>Contrôle endocrinien de la stéroïdogénèse</i>	113
i. Contrôle par les hormones	113
☒ Les gonadotropines hypophysaires	113
☒ L'œstradiol	114
☒ La prolactine	114
ii. Contrôle par les facteurs non stéroïdiens	115
☒ L'inhibine et l'activine	115
☒ Les cytokines	115
☒ Les facteurs de croissance	116
3. AXE CEREBRO-TESTICULAIRE	116
CHAPITRE III – TOXICITE TESTICULAIRE	119
1. GENERALITES	119
2. TOXICITE TESTICULAIRE ET PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	120
A. <i>Contexte et syndrome de dysgénésie testiculaire</i>	120
B. <i>Cryptorchidie</i>	123
C. <i>Hypospadias</i>	125
D. <i>Cancers testiculaires</i>	126
E. <i>Hyperplasie et tumeurs des cellules de Leydig</i>	128
I. <i>Les hyperplasies à cellules de Leydig</i>	128
II. <i>Les tumeurs du testicule à cellules de Leydig</i>	129
III. <i>Informations supplémentaires</i>	129
F. <i>Exemples de perturbateurs endocriniens induisant une toxicité au niveau de l'appareil reproducteur mâle et du testicule</i>	130
G. <i>Modèle de perturbateur endocrinien : un anti-androgène, le Flutamide</i>	133
3. TOXICITE TESTICULAIRE ET SUBSTANCES A "ACTION DIRECTE"	135
A. <i>Effets adverses sur les cellules de Sertoli</i>	135
B. <i>Effets adverses sur les cellules germinales</i>	138
C. <i>Effets adverses sur l'équilibre hydrique dans le testicule</i>	140
D. <i>Effets adverses sur les cellules de Leydig</i>	142
E. <i>Exemples de toxiques testiculaires à "action directe"</i>	143
F. <i>Modèle d'étude : toxique à "action directe", le 1,3-Dinitrobenzène</i>	146
MATÉRIELS ET MÉTHODES	149
1. LES REACTIFS	149
2. ETUDES IN VITRO	149
A. <i>Cellules H295R : culture et traitement</i>	149
B. <i>Cellules de Leydig : isolement, culture et traitement</i>	150
C. <i>Analyses hormonales</i>	151
3. ETUDES IN VIVO	152
A. <i>Les animaux</i>	152

B.	<i>Le choix des doses</i>	153
C.	<i>Analyses histopathologiques</i>	153
D.	<i>Analyse hormonale</i>	154
E.	<i>Dosages du flutamide et de l'hydroxyflutamide dans les testicules et le plasma</i>	155
F.	<i>Analyses statistiques</i>	155
4.	ANALYSES MOLECULAIRES.....	155
A.	<i>Préparation des extraits d'ARN totaux</i>	155
B.	<i>Transcription inverse</i>	157
C.	<i>Analyse par PCR en temps réel</i>	157
D.	<i>Puces à ADN</i>	159
E.	<i>Analyses fonctionnelles</i>	161
I.	<i>Genespring</i>	161
II.	<i>Ingenuity Pathway Analysis (IPA)</i>	163
F.	<i>Cas particulier des miARN</i>	164
5.	ANALYSES PROTEIQUES.....	166
A.	<i>Dosage des protéines</i>	166
B.	<i>Western Blot</i>	166
	RESULTATS	167
	ARTICLE 1 : APPROCHE INTEGRANT LES OUTILS MOLECULAIRES ET CONVENTIONNELS DE TOXICOLOGIE AFIN D'IDENTIFIER LA DOSE SANS EFFET, DANS LE CADRE D'UNE TOXICITE INDUITE PAR UN ANTI-ANDROGENE	168
	DONNEES SUPPLEMENTAIRES : MICROARN ET FLUTAMIDE	183
1.	GENERALITES SUR LES MIARN.....	183
2.	CONTEXTE DE L'ETUDE COMPLEMENTAIRE.....	185
3.	RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	185
	ARTICLE 2 : NOUVELLES INVESTIGATIONS CONCERNANT LES MECANISMES MOLECULAIRES A L'ORIGINE DE LA TOXICITE TESTICULAIRE INDUITE PAR LE 1,3-DINITROBENZENE	192
	DONNEES SUPPLEMENTAIRES : STEROÏDOGENESE ET 1,3-DINITROBENZENE	221
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	223
1.	ETUDES "EFFET DOSE", MECANISMES D'ACTION ET ELEMENTS NOVATEURS.....	224
A.	<i>Flutamide : confirmation moléculaire de son anti-androgénicité et mise en évidence de l'altération du catabolisme des acides gras</i>	224
B.	<i>miARN : éléments de compréhension supplémentaires concernant le mécanisme d'action du flutamide</i>	227
C.	<i>1,3-dinitrobenzène : confirmation moléculaire de sa toxicité testiculaire et mise en évidence de perturbations du cycle cellulaire</i>	227

2.	DOSE SANS EFFET ET SEUIL DE TOXICITE : CAS DE L'ANTI-ANDROGENE, FLUTAMIDE ET DE LA SUBSTANCE A "ACTION DIRECTE", 1,3-DINITROBENZENE.....	230
	<i>Résultats supplémentaires : miARN et dose sans effet.....</i>	233
3.	REEVALUATION DE LA TOXICITE TESTICULAIRE INDUITE PAR LE 1,3-DINITROBENZENE	234
A.	<i>1,3-Dinitrobenzène, substance supposée à action testiculaire directe.....</i>	234
I.	<i>Evaluation in vivo des propriétés de perturbateur endocrinien du DNB</i>	234
II.	<i>Evaluation in vitro des propriétés de perturbateur endocrinien du DNB</i>	235
III.	<i>Perturbation du système endocrinien : quelques explications</i>	236
B.	<i>1,3-Dinitrobenzène, réel perturbateur endocrinien ?</i>	237
I.	<i>Basé sur la bibliographie et les résultats actuels</i>	237
II.	<i>Basé sur les réglementations en cours</i>	238
C.	<i>1,3-Dinitrobenzène et perspectives</i>	242
4.	COMPORTEMENTS DU FLUTAMIDE ET DU 1,3-DINITROBENZENE RELATIFS A LA MISE EN PLACE DE LA TOXICITE	243
A.	<i>Profil de toxicité du flutamide.....</i>	243
B.	<i>Profil de toxicité du 1,3-dinitrobenzène.....</i>	244
C.	<i>Conclusions.....</i>	245
5.	PERSPECTIVES	246
	ANNEXES.....	247
	ANNEXES : ARTICLE 1.....	247
	<i>Tableau S1. Liste des gènes différentiellement exprimés dans les testicules de rat, après traitement au flutamide.....</i>	247
	<i>Tableau S2. Comparaison des données issues de puces à ADN versus celles obtenues par RT-qPCR, pour une sélection de gènes modulés après une exposition au flutamide</i>	282
	<i>Fig. S1. Comparaison des cinq principaux processus biologiques affectés à chaque niveau de dose, sur la base des listes de gènes différentiellement exprimés après traitement au flutamide</i>	284
	<i>Tableau S3. Effets du flutamide sur le poids corporel absolu, le poids du foie, des organes sexuels, des tissus accessoires, et sur le niveau de testostérone plasmatique</i>	285
	ANNEXES : DONNEES SUPPLEMENTAIRES MIARN/FLUTAMIDE	286
	<i>Tableau : Liste des gènes cibles potentiels des miARN différentiellement exprimés après traitement au flutamide à la forte dose (30 mg/kg/jour), identifiés à partir de données in silico et expérimentales.</i>	286
	ANNEXES : ARTICLE 2.....	287
	<i>Tableau S1. Changements histopathologiques testiculaires fonction de la dose, après exposition répétée au 1,3-dinitrobenzène.....</i>	288
	<i>Tableau S2. Comparaison des données issues de puces à ADN versus celles obtenues par RT-qPCR, pour une sélection de gènes modulés après exposition répétée au 1,3-dinitrobenzène</i>	289
	<i>Tableau S3. Effets d'une administration unique de 1,3-dinitrobenzène sur le poids corporel absolu, le poids du foie, des organes sexuels, et des tissus accessoires.....</i>	291

<i>Tableau S4. Analyse par qPCR de l'expression de gènes sélectionnés, impliqués dans les voies associées au "Rôle mitotique des Polo-like kinase" et à la stéroïdogénèse, après une exposition unique au 1,3-dinitrobenzène</i>	292
ANNEXES : ETUDE AIGÛE FLUTAMIDE	293
1. Niveau de flutamide et d'hydroxyflutamide plasmatique et testiculaire 1 à 48 heures après une administration unique de flutamide à 150 mg/kg	293
2. Niveau de testostérone plasmatique à 8, 24 et 48 heures, après une seule administration de flutamide à 150 mg/kg.....	294
3. Transcrits impliqués dans le métabolisme des lipides, dont le niveau d'accumulation est modulé après une administration unique de flutamide à 150 mg/kg.....	294
ANNEXES : ETUDES IN VITRO ASSOCIEES A UN PROGRAMME DE CRIBLAGE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	297
1. Potentiels de perturbateur endocrinien concernant nos deux composés d'intérêt, le 1,3-dinitrobenzène (DNB) et le flutamide, sur la base du test H295R	297
2. Potentiels de perturbateur endocrinien concernant nos deux composés d'intérêt, le 1,3-dinitrobenzène (DNB) et le flutamide, sur la base du test de liaison au récepteur aux androgènes.....	298
3. Potentiels de perturbateur endocrinien concernant nos deux composés d'intérêt, le 1,3-dinitrobenzène (DNB) et le flutamide, sur la base du test d'activation transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes .	299
BIBLIOGRAPHIE	300

ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Modélisation de l'hypothèse de travail.....	28
Figure 2 : Principales glandes endocrines	32
Figure 3 : Hypothalamus et hypophyse	33
Figure 4 : Cibles des hormones hypophysaires	37
Figure 5 : Les glandes surrénales	39
Figure 6 : Les trois principales classes d'hormones.....	44
Figure 7 : Mécanismes d'action des hormones, généralités	45
Figure 8 : Mode d'action intracellulaire des hormones stéroïdes.....	47
Figure 9 : Structure chimique du cholestérol, précurseur des hormones stéroïdes	52
Figure 10 : Structures chimiques de certains phyto-œstrogènes	53
Figure 11 : Structure chimique de la zéaralénone	54
Figure 12 : Structures chimiques de quelques œstrogènes synthétiques	55
Figure 13 : Structures chimiques de quelques xéno-œstrogènes et composés synthétiques	56
Figure 14 : Grenouille léopard (<i>Rana pipiens</i>) avec deux pattes surnuméraires : exemple de malformations sévères chez l'amphibien	60
Figure 15 : Courbe de dose-réponse.....	64
Figure 16 : Outils et méthodes utilisés en toxicologie	71
Figure 17 : Les nouveaux outils "-omiques "	73
Figure 18 : Photographie de la cavité abdominale d'un rat mâle montrant une partie des organes composant le système uro-génital	76
Figure 19 : Structure interne de l'appareil reproducteur masculin chez l'homme	77
Figure 20 : Coupes internes du testicule.....	78
Figure 21 : Structure des tubes séminifères.....	80
Figure 22 : Phases de la spermatogenèse chez le rat ; types de cellules germinales concernés	81
Figure 23 : Représentation de trois vagues successives de générations de spermatogenèse	83
Figure 24 : Représentation schématique des stades spermatogéniques chez le rat	83
Figure 25 : Structure de la cellule de Sertoli	85
Figure 26 : Schéma d'une cellule de Sertoli : étroite interaction avec les cellules germinales.....	86
Figure 27 : Coupe de testicule de rat sur laquelle figure l'espace interstitiel entre les tubes séminifères	95
Figure 28 : Sources de cholestérol-substrat nécessaire à la stéroïdogénèse dans la cellule de Leydig .	97
Figure 29 : Biosynthèse de la testostérone chez le rat, régulation de la stéroïdogénèse testiculaire...	100

Figure 30 : Structure du récepteur aux androgènes	105
Figure 31 : Localisation des domaines fonctionnels au niveau du récepteur aux androgènes	106
Figure 32 : Représentation du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes	107
Figure 33 : Mode d'activation génomique du récepteur aux androgènes.....	109
Figure 34 : Voies de signalisation non-génomiques de la testostérone dans les cellules de Sertoli....	112
Figure 35 : Mécanismes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique.....	117
Figure 36 : Évolution du nombre de spermatozoïdes et des anomalies de l'appareil reproducteur masculin au cours des dernières décennies, en Amérique du Nord et en Europe	121
Figure 37 : Différentes formes de cryptorchidie, selon la position du testicule.....	123
Figure 38 : Exemples d'hypospadias chez l'homme : (A) antérieure, (B) coronale ou (C) distale.....	125
Figure 39 : Structure chimique du flutamide et de son métabolite actif.....	133
Figure 40 : Atteinte des cellules de Sertoli en réponse à un composé toxique.....	137
Figure 41 : Spécificité cellulaire de l'apoptose des cellules germinales	138
Figure 42 : Lésions observées suite à une réduction du niveau de testostérone.....	143
Figure 43 : Structure chimique du 1,3-Dinitrobenzène	146
Figure 44 : Principe du test EIA par compétition.....	151
Figure 45 : Contrôles de la qualité des ARN.....	156
Figure 46 : Transcription inverse	157
Figure 47 : Principe d'une PCR en temps réel.....	158
Figure 48 : Marquage des échantillons.....	160
Figure 49 : Analyse des données de puces à ADN.....	161
Figure 50 : Analyse des données de puces à ADN par GeneSpring.....	161
Figure 51 : Légendes des symboles utilisés par le logiciel IPA	164
Figure 52 : Voie classique de biogénèse des miARN, et leurs actions sur les transcrits cibles	184
Figure 53 : Identification de cibles potentielles des miARN différentiellement exprimés après traitement au flutamide : un parallèle entre les analyses <i>in silico</i> et les données générées expérimentalement	188
Figure 54 : Confirmation des données de puces à miARN par TaqMan qRT-PCR.....	190
Figure 55 : Appréciation de l'"effet-dose" et de la dose sans effet par miARN TaqMan qRT-PCR..	191
Figure 56 : Stimulation des cellules de Leydig primaires au DNB pendant 24 heures	222
Figure 57 : Modélisation des courbes "effet-dose" du Flutamide (1) et du 1,3-Dinitrobenzène (2) ...	232
Figure 58 : Profils de toxicité testiculaire du DNB établis d'après les critères de l'ECETOC	239

TABLEAUX

Table 1 : Les différentes hormones et leurs fonctions principales	42
Table 2 : Différentes classes de substances à action endocrine	51
Table 3 : Répartition des prélèvements et analyses.....	153
Table 4 : Types d'anticorps, fournisseurs et protocoles utilisés	154
Table 5 : miARN différentiellement exprimés dans le testicule après traitement des rats au flutamide pendant 28 jours à une dose de 30 mg/kg/jour	186
Table 6 : Principales fonctions cellulaires et moléculaires (IPA) modulées par les miARN après traitement au flutamide (30 mg/kg/jour) définies à partir de la liste des cibles potentielles	189

ABRÉVIATIONS

³ H	tritium marqué
ABP	androgen binding protein
ACAD	acyl-CoA déshydrogénase
ACAT	cholestérol acyltransférase
ACTH	corticotrophine ou hormone adrénocorticotrope
ACOX1	acyl-CoA oxydase 1, palmitoyl
ADH	hormone antidiurétique ou vasopressine
ADHFE1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1
ADN	acide désoxyribonucléique
AF	activation function
AKT ou PKB	protéine kinase B
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANRT	Association Nationale de la Recherche et de la Technologie
APC	anaphase promoting complex
AQP	aquaporine
AR	récepteur aux androgènes
ARE	éléments de réponse aux androgènes
ARKO	androgen receptor knockout
ARN	acide ribonucléique
ARNc	acide ribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
ASDN	androstènedione
ATP	adénosine triphosphate
BBP	benzyl butyl phtalate
BCL2L1	B-cell CLL/lymphoma 2-like 1
BMP	bone morphogenetic protein
Ca ²⁺	calcium
CBP	CREB Binding Protein
CDC	cell division cycle
CDK	cyclin-dependent kinase
cFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
c-FOS	Finkel-Biskis-Jinkins (FBJ) murine osteosarcoma viral oncogene homolog (homologue humain)

CEFIC	Conseil Européen de l'Industrie Chimique
CIAPIN1	cytokine induced apoptosis inhibitor 1
CIS	carcinoma <i>in situ</i>
c-JUN	ju-nana (jun) proto-oncogene
CPT	carnitine palmitoyltransférase
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP-response element binding
CRF ou CRH	corticolibérine
Cyp	cytochrome P450
DAG	diacylglycérol
DBD	DNA binding domain
DBP	dibutyl phtalate
DDE	dichlorodiphényldichloroéthylène
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
DEHP	diéthylhexylphtalate
DES	diéthylstilbestrol
DHEA	déhydroépiandrostérone
DHT	dihydrotestostérone
DNB	1,3-Dinitrobenzène
ECETOC	Centre Européen d'Ecotoxicologie et de Toxicologie des Produits Chimiques
EDS	éthylène diméthane sulfonate
EDSP	Endocrine Disruptor Screening Program
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGME	éther monométhylque de l'éthylène glycol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPA	Agence de Protection de l'Environnement
ER	récepteur aux œstrogènes
ERK	extracellular signal regulated kinase
ERKO	estrogen receptor knockout
ESI	electrospray ionization
EST	expressed sequence tag
Ex.	exemple
FABP	fatty acid binding protein
FGF	fibroblast growth factor
FM	flutamide

FORKO	FSH receptor knockout
FSH	follicle-stimulating hormone
FSH-R	follicle-stimulating hormone receptor
GDNF	glial cell derived neurotrophic factor
GH	hormone de croissance
GH-IH	somatostatine
GH-RH	somatocrine
GnRH ou LHRH	gonadolibérine
Gp	glycoprotéine
H ₂ O	molécule d'eau
HAT	histone acétyl transférase
hCG	hormone chorionique gonadotrope
HCL	hyperplasie à cellules de Leydig
HD	2,5-hexanédione
HDAC	histone désacétylase
HDL	high density lipoprotein
HMG	hydroxyméthylglutaryl
HR	hinge region
HRE	élément de réponse à l'hormone
HSD	hydroxystéroïde déshydrogénase
HSP	heat shock protein
IGF(BP)	insulin growth factor (binding protein)
IL	interleukine
INSL	insulin-like
IP3	inositol triphosphate
IPCS	International Programm on Chemical Safety
K ⁺	potassium
kDa	kilo dalton
KGF	keratinocyte growth factor
LBD	ligand binding domain
LDL	low density lipoprotein
Leu	leucine
LH	luteinizing hormone (hormone lutéinisante)
LH-R	luteinizing hormone receptor
LHRKO	LH receptor knockout
LIF	leukemia inhibitory factor
LO(A)EL	lowest observed (adverse) effect level

LOEC	lowest observed effect concentration
LRI	Long-range Research Initiative
M1	2-[[[3,5-dichlorophényl]carbamoyl]oxy]-2-méthyl-3-buténoïque
M2	3',5'-dichloro-2-hydroxy-2-méthylbut-3-énanilide
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCF	Michigan Cancer Foundation
MEK	mitogen activated protein kinase kinase
miARN	microARN
MIS	Müllerian inhibiting substance
MPF	mitosis promoting factor
MS	spectrométrie de masse
MSH	hormone mélanotrope ou mélano-stimuline
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NES	signal d'export nucléaire
NF-κB	nuclear factor kappa B
NH2	extrémité N-terminale
NLS	signal de localisation nucléaire
nM	nanomolaire
NNB	nitrosonitrobenzène
NO(A)EC	No observed (adverse) effect concentration
NO(A)EL	No observed (adverse) effect level
NTD	N-terminal domain
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P53	tumor protein p53
p90Rsk	ribosomal protein S6 kinase
PBDE	polybromodiphényléther
PCB	polychlorobiphényle
PCR	polymerase chain reaction
PE	perturbateur endocrinien
pH	potentiel hydrogène
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol biphosphate
PKA	protéine kinase A
PLC	phospholipase C
PLK	polo-like kinase
pM	picomolaire

PRK1	PKC related kinase 1
PRL	prolactine
PTH	parathormone
PTTG	pituitary tumor-transforming
PVC	polychlorure de vinyle
RMN	résonance magnétique nucléaire
RN	récepteur nucléaire
RT	réverse transcription
SAGE	serial analysis of gene expression
SCARA	scavenger receptor class A
SCARKO	androgen receptor in Sertoli cells knockout
Scc	side chain cleavage
SCF	stem cell factor
SD	écart-type/déviatiion standard
SDS	sodium dodécyl sulfate
SF-1	splicing factor 1
SHBG	sex hormone-binding globulin
SHBGR	récepteur des hormones sexuelles
SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
SRY	sex determining region Y
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
T3	triiodothyronine
T4	thyroxine
TBG	thyroxine-binding globulin
TCL	tumeur de testicule à cellules de Leydig
TDS	syndrome de dysgénésie testiculaire
TESC	tescalcin
TFIIF	transcription Factor II D
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL ou TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 ou
TRH ou PRH	thyréolibérine
TSH	thyréotrophine ou thyrostimuline
UPP	ubiquitine-proteasome pathway
VDAC	voltage-dependent anion channel
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
Zn ²⁺	zinc

AVANT PROPOS

Depuis plusieurs années, les préoccupations concernant les effets de la pollution et des nouvelles technologies sur la santé humaine et animale s'immiscent de plus en plus au cœur des débats politiques et scientifiques. En particulier, la prise de conscience des autorités sanitaires, des gouvernements et du grand public, concernant la présence de substances environnementales susceptibles de perturber le système endocrinien n'a cessé de progresser depuis le début des années 1990. D'origine naturelle ou synthétique, les perturbateurs endocriniens (PE) peuvent altérer le fonctionnement du système hormonal des animaux et des Hommes. Ces substances pourraient donc induire des effets néfastes sur la santé d'un organisme, de sa descendance, ou d'une population, et constituer un danger sanitaire qui est encore aujourd'hui mal étudié.

Un observateur non averti pourrait facilement être amené à penser que la capacité des substances exogènes à interférer avec le système endocrinien était inconnue jusqu'à une date relativement récente. En réalité, les anciens étaient déjà familiarisés avec les actions de diverses préparations à base de plantes modulant, ce que nous savons maintenant être hormonalement régulés. De même, pendant des siècles, les agriculteurs ont observé des problèmes de reproduction chez les vaches qui paissaient sur les pâturages riches en certaines espèces de trèfle, qui plus tard, se sont révélés contenir des composés œstrogéniques, tels que le coumestrol [1]. Dès les années 1930, la capacité des produits chimiques naturels et synthétiques à interagir avec les récepteurs hormonaux endogènes était déjà bien établie [2]. A partir des années 1940, les composés stéroïdiens commençaient à être utilisés dans l'industrie du bétail afin de réguler les cycles de reproduction, et améliorer le taux et l'efficacité de la prise de poids. Simultanément, des substances telles que l'éthinylestradiol, le mestranol, ou le noréthynodrel étaient développées comme agents contraceptifs, dans le but de traiter des pathologies spécifiques de l'Humain [2]. En parallèle à ces évolutions, les toxicologues ont commencé à prendre en considération l'existence d'éventuels effets indésirables consécutifs à l'exposition à ces composés, en plus de ceux occasionnés par les reprotoxiques, les mutagènes, les carcinogènes...

L'un des premiers signes d'alerte sur les PE avait été donné par Rachel Carson dans son livre "*Silent Spring*" (1962), dans lequel elle décrivait les effets du dichlorodiphényl-trichloroéthane (DDT) sur le déclin des populations d'oiseaux. Depuis, de nombreux rapports ont décrit des comportements et des développements anormaux du tractus génital chez les poissons et les reptiles exposés à des polluants chimiques [3], bien que la démonstration d'une toxicité médiée par ces PE n'ait pas été clairement établie. Des liens de causalité entre xénobiotiques et perturbation endocrinienne chez l'Homme sont à l'heure actuelle rarement et difficilement établis. L'un des seuls cas avérés de perturbation endocrinienne sur l'Homme est celui du diéthylstilbestrol (DES). Cet "œstrogène synthétique" a été préconisé en France à partir de 1958, administré aux femmes enceintes pour prévenir les avortements spontanés, les risques de prématurité et les hémorragies gravidiques. Considéré comme un moyen sûr pour le fœtus et la femme enceinte, il fut largement prescrit dans le monde entier pendant plus de trente ans. Ce n'est qu'au début des années 1970 que la communauté scientifique et médicale réussit à faire le lien entre le DES et une série d'anomalies du tractus génital [4, 5]. En France, l'indication "avortement spontané à répétition" a été supprimée en 1976 dans le dictionnaire Vidal, et la contre-indication d'utilisation chez la femme enceinte a été ajoutée en 1977. Malgré les événements susmentionnés, aucune attention particulière n'avait à cette époque été accordée à la toxicité induite par les PE.

Cet état d'esprit a changé assez brusquement au milieu des années 1990, suite à une série de publications suggérant que les pesticides et autres produits chimiques synthétiques menaçaient la capacité de reproduction et l'intelligence des générations futures [3, 6]. Notamment, un livre intitulé "*Our Stolen Future, are we threatening our fertility, intelligence and survival? – A scientific Detective Story*", écrit par Colborn *et al.* (1996), et dont la préface rédigée par le vice-président des Etats-Unis Al Gore, a fortement marqué les esprits. Cet ouvrage reprend le travail de Rachel Carson, et rassemble les preuves scientifiques toujours plus nombreuses qui établissent un lien entre les produits chimiques, les anomalies du développement sexuel, et certains problèmes reproductifs et comportementaux. Au travers de cet écrit et d'autres publications, il a été proposé que certains composés à activité endocrinienne induisent des effets aux doses bien plus basses que celles généralement admises pour d'autres modes d'action ; ces substances requerraient donc une réglementation spéciale. Dans le même temps, un certain nombre de rapports invoquant des associations entre PE et baisse de la qualité du sperme [7, 8], augmentation du cancer du sein [9] et du testicule

[8], cryptorchidie et hypospadias [8, 10], ainsi qu'anomalies du développement chez les espèces sauvages [11], ont été édités. Enfin, plus récemment, l'année 2008 a été marquée par l'affaire très médiatisée du bisphénol A, œstrogène-mimétique utilisé notamment dans les matières plastiques de biberons, et suspecté de jouer un rôle dans la survenue de fausses couches, de l'obésité ou de certains cancers [12].

Malgré les incertitudes quant à la validité scientifique de ces études et l'ampleur réelle du problème, la communauté scientifique et le public ont fortement réagi. Depuis, l'intérêt pour ce sujet relatif aux PE croît régulièrement. En parallèle, des plateformes de décision réunissant des représentants de la science, de l'industrie et des autorités ont été créées. Elles prévoient des mesures à court, moyen et long terme, parmi lesquelles on compte les identifications des PE, les listes de priorités pour l'évaluation des risques, les programmes de monitoring, la recherche sur les mécanismes d'action et l'adaptation de la législation (cf. *Introduction*).

De ce fait, le terme "Perturbateur Endocrinien" a été adopté dans le jargon des toxicologues, des professionnels de la santé publique, des autorités, et même par le grand public, et semble vouloir perdurer...

INTRODUCTION DU SUJET

1. Contexte

Depuis trois décennies, le déclin de la qualité du sperme humain a été observé par de nombreuses équipes scientifiques, et dans de nombreuses régions du globe [7, 13-17]. Parallèlement, la fréquence des affections de l'appareil reproducteur mâle a augmenté dans l'espèce humaine [18]. Des anomalies du système reproducteur de plusieurs espèces de poissons de rivières ont également été mises en évidence, ainsi que des effets sur la reproduction de certains reptiles et gastéropodes [19-26]. L'hypothèse privilégiée depuis une décennie suppose que des substances naturelles ou synthétiques, présentes dans l'environnement, pourraient agir sur les systèmes hormonaux, et être à l'origine des diverses anomalies observées tant chez l'Homme que chez de nombreuses espèces animales. Ces substances ont été regroupées sous le terme de "perturbateurs endocriniens" (PE).

Même si les effets néfastes des PE sur la santé ne sont que soupçonnés, des programmes de recherche et des groupes de travail ont été mis en place afin d'évaluer l'étendue des problèmes relatifs aux PE, en vue de développer des stratégies de prévention et d'intervention. Ainsi, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a chargé l'IPCS (International Program on Chemical Safety) de préparer un rapport décrivant l'évaluation globale de la littérature scientifique sur les PE [26]. L'US-EPA (Agence de Protection Américaine de l'Environnement) et l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) ont également établi des programmes ayant comme objectifs : (i) d'accroître l'échange d'informations et la coordination des activités de recherche relatifs aux PE ; (ii) d'élaborer et de réviser les lignes directrices pour les essais visant à détecter les PE ; (iii) de développer des tests de criblage robustes, reproductibles et pertinents, capables de détecter les composés ayant une activité œstrogénique, anti-œstrogénique, androgénique ou anti-androgénique ; (iv) ainsi que d'harmoniser les méthodes de caractérisation des dangers et des risques. De ces travaux sont issues les premières recommandations ("Guidelines") 407 de l'OCDE datant de 1995, et portant sur des études de 28 jours chez des rongeurs.

Quinze ans après, des doutes quant à la capacité à pouvoir détecter tous les PE ont amené le CEFIC (Conseil Européen de l'Industrie Chimique) à proposer d'améliorer la ligne directrice 407 de l'OCDE. Cet organisme a de ce fait initié un programme intitulé "Long-range Research Initiative" (LRI). Celui-ci vise à identifier et à combler les lacunes dans la compréhension des dangers causés par ces produits chimiques, ainsi qu'à adapter les méthodes disponibles, permettant d'évaluer les risques qui y sont associés. L'essor récent de la toxicogénomique a contribué à cette remise en question.

Depuis plusieurs années, des outils "-omiques", tels que la génomique, la protéomique et la métabolomique ont émergé, ayant le potentiel de fournir de nouveaux aperçus sur les études toxicologiques. En particulier, la toxicogénomique, c'est-à-dire l'évaluation de l'expression des gènes comme point final pour prédire la toxicité d'un xénobiotique, constitue une discipline en pleine essor. Celle-ci permet d'évaluer les profils d'expression de milliers de gènes, générant ainsi le potentiel d'accélérer la découverte de nouvelles signalisations toxicologiques et de cibles spécifiques, de même qu'éclaire le processus d'évaluation du risque. Bien que ces approches novatrices promettent de rénover le monde de la toxicologie, de nombreux tests et validations sont encore nécessaires avant de pouvoir intégrer ces nouveaux outils "-omiques" dans les processus d'évaluation du risque.

Enfin, le testicule est l'organe clé de la fonction de reproduction mâle. Les hormones sexuelles endogènes sont les facteurs les plus importants garantissant l'homéostasie et le fonctionnement optimal de la fonction sexuelle. Les gonades mâles représentent donc une cible pour les perturbateurs de la fonction endocrinienne. Aussi, les substances environnementales présentant la capacité de mimer ou antagoniser les hormones naturelles attirent l'attention de la communauté scientifique, désireuse d'établir un lien entre l'exposition à de tels composés et l'apparition des effets délétères observés sur la reproduction.

C'est dans un tel contexte que s'inscrit le travail de thèse présenté au travers de ce manuscrit.

2. Travaux de recherche

Les travaux de recherche effectués au cours de ces trois années de thèse portent sur un des axes de recherche du LRI, traitant de la caractérisation de la toxicité testiculaire chez le rat mâle Wistar à l'aide des outils traditionnels de toxicologie et des outils "-omiques". Ce projet vise à (i) intégrer et interpréter correctement l'ensemble des données générées par les outils "-omiques" dans les processus d'évaluation du risque, et (ii) permettre une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des altérations de l'appareil reproducteur constatées à la suite d'expositions à divers composés, dont certains PE, (iii) dans le but *in fine* de préciser si un PE se comporte de façon similaire à un composé considéré comme non PE pour ce qui est de la mise en place de la toxicité.

L'évaluation du risque des produits chimiques pour l'Homme repose sur l'identification de la dose n'induisant aucun effet adverse (NOAEL) dans les études de toxicité, chez les animaux de laboratoire, via l'utilisation de méthodes standards d'évaluation de la toxicité. Avec l'avènement des technologies à haut contenu d'informations, notamment les biopuces, il est pertinent de déterminer l'apport de données moléculaires sur la NOAEL. Un défi particulier consiste donc à définir si les données de recherche en génomique peuvent être appliquées dans les pratiques d'évaluation des risques toxicologiques. En particulier, il s'agit de préciser comment la toxicogénomique pourrait être appliquée à reconnaître et à distinguer les effets adverses des effets non adverses dans les études de toxicité. En supposant que des seuils de toxicogénomique puissent être établis, il devrait être possible d'intégrer la toxicogénomique avec les résultats quantitatifs traditionnels des études de toxicité, comme le montre la Figure 1. La détection d'une activité toxique se base traditionnellement sur des outils mettant en évidence des perturbations de l'homéostasie par l'intermédiaire de modifications des masses corporelles ou d'organes, d'apparitions de signes cliniques et/ou de lésions histologiques, ou encore de modifications de paramètres biochimiques. L'apparition de ces effets correspond donc au dépassement de la dose maximale sans effet toxique (Figure 1, B). L'hypothèse de travail est qu'il existe vraisemblablement une zone de transition, ou phase adaptative (Figure 1, A à B), entre l'état normal et la zone toxique, caractérisée par des variations dans l'expression de gènes demeurant sous contrôle homéostatique. D'après cette hypothèse, l'exposition à de faibles doses d'un composé toxique pourrait par exemple induire l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans une voie métabolique particulière, sans pour autant être associée à des effets toxiques délétères et détectables. Ceci

suggère que l'analyse d'expression génique aurait le potentiel d'affiner l'identification de la dose sans effet. Enfin, l'étude de cette phase adaptative pourrait également apporter des éléments nouveaux précisant les mécanismes d'action des PE et autres substances actives, permettant ainsi de mettre en place des tests prédictifs d'effets toxiques chez le rongeur.

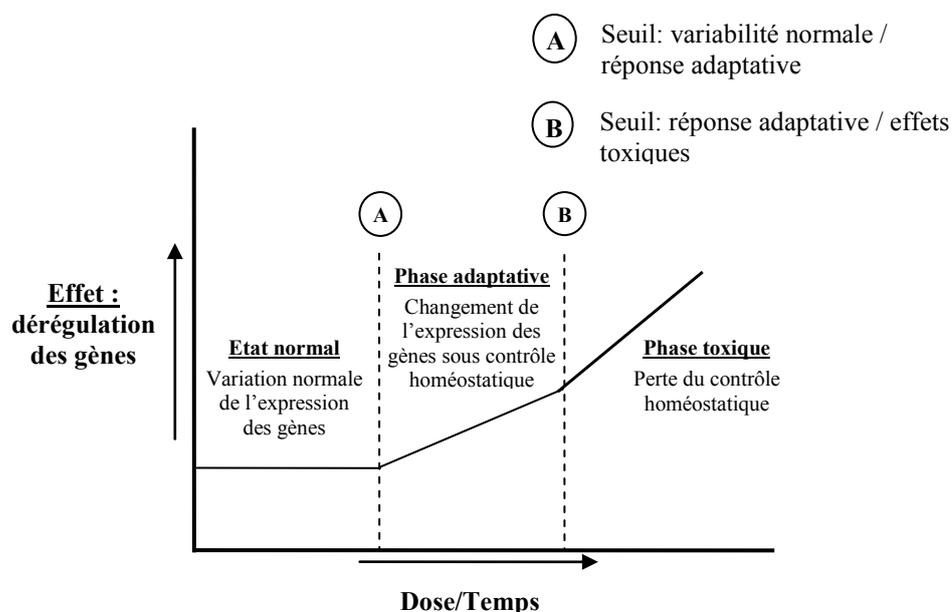


Figure 1 : Modélisation de l'hypothèse de travail

Dans ce contexte, des molécules de référence connues pour induire des lésions au niveau de l'appareil reproducteur mâle sont utilisées : un PE aux propriétés anti-androgéniques (le flutamide) versus un composé à action toxique testiculaire directe (le 1,3-dinitrobenzène). La stratégie générale consiste : (i) d'abord à décrire et étudier de manière exhaustive les processus macroscopiques, microscopiques et moléculaires aboutissant à la mise en place des lésions au niveau de l'organe cible, fonction de la dose ou du temps d'exposition des composés, chez le rat ; (ii) puis, à apprécier la valeur ajoutée des résultats moléculaires obtenus dans le cadre d'études conventionnelles de toxicologie, au travers de la définition de la dose sans effet, et de l'investigation de la phase adaptative ; (iii) et finalement évaluer les profils de toxicité testiculaires établis, afin d'observer comment un PE par rapport à une molécule exerçant également une toxicité testiculaire, mais considérée comme non PE, aborde la toxicité. Les outils classiques de la toxicologie sont ainsi utilisés en parallèle à l'utilisation d'outils moléculaires comme ceux de la transcriptomique.

Au travers des résultats obtenus, une première partie de mon travail a permis d'aborder un sujet délicat, objet de polémique, relatif à l'existence ou non d'un seuil de toxicité pour les PE, essentiel à l'évaluation de la sécurité des produits chimiques pour l'Homme. Nous avons ainsi apprécié les effets sur le testicule du flutamide, au sein d'une étude intégrative chez le rat. En utilisant une étude de toxicité standard de 28 jours, il nous a été possible d'identifier une dose seuil fondée sur des modifications transcriptomiques pertinentes précédant celle basée sur les changements phénotypiques adverses (cf. *Résultats, Article 1*). Nous avons également saisi l'opportunité de cette étude pour caractériser le profil d'expression testiculaire des microARN en réponse au flutamide, entités récemment découvertes, dont l'impact sur la biologie apparaît important. Dans un second temps, nous avons mené une approche avec le 1,3-dinitrobenzène, composé décrit dans la littérature comme ciblant directement les cellules de Sertoli, afin d'y confronter nos données résultant d'une exposition à un PE. Cette partie a été consacrée à la description du mécanisme de toxicité testiculaire induite par le 1,3-dinitrobenzène, au travers d'études *in vivo* ("effet-dose" et "effet-temps"), et *in vitro*. Nous avons établi que cette substance affecte la progression du cycle cellulaire, mais aussi la biosynthèse des hormones stéroïdes (cf. *Résultats, Article 2*). Cette dernière conclusion remet en question l'origine de sa toxicité, et plus largement la définition de PE.

Le manuscrit s'articule autour de quatre grandes parties. La partie introductive, composée de trois chapitres, apporte les notions fondamentales nécessaires à la compréhension du travail de thèse. La seconde partie présente l'ensemble des matériels et méthodes utilisés pour la réalisation de ces travaux. La troisième partie expose les contributions. Elle comporte deux chapitres associés chacun à un article. Enfin, la quatrième partie propose une discussion et diverses perspectives.

INTRODUCTION GENERALE

Avant de détailler les contributions de ce travail de thèse, nous allons commencer, dans cette partie introductive, par exposer les différents points nécessaires à la compréhension du reste du manuscrit. Le premier chapitre aborde de manière générale le système endocrinien, définissant les glandes endocrines, les mécanismes de l'action hormonale et leurs régulations. Il détaille ensuite les composés capables d'interférer avec ce système de communication, à savoir, les perturbateurs endocriniens, ainsi que les études, tests et outils en toxicologie capables de permettre leur détection. Le second chapitre a trait à la physiologie du testicule, et renseigne sur le déroulement de la spermatogenèse et de la stéroïdogénèse chez le rat. Il montre notamment comment les différents types cellulaires concernés sont intrinsèquement liés, via l'implication de multiples contrôles endocriniens. Enfin, le troisième chapitre étudie le phénomène de toxicité au niveau du testicule. Dans le but de caractériser au mieux les profils de toxicité générés par les perturbateurs du système endocrinien, les altérations induites par ces substances dans l'organe d'intérêt sont dans un premier temps précisées, puis confrontées à celles résultant d'une exposition aux composés présentant un mode d'action cellulaire direct (toxicité non médiée par le système endocrinien). Nous finissons par décrire plusieurs substances appartenant à chaque catégorie, pour lesquelles la toxicité testiculaire a été largement rapportée dans la littérature.

CHAPITRE I – LE SYSTEME ENDOCRINIEN

L'organisme possède deux systèmes de communication, le système nerveux et le système endocrinien, qui travaillent en synergie pour coordonner l'activité cellulaire dont dépend l'homéostasie. Les signaux électrochimiques transmis via la moelle épinière et les nerfs périphériques, rendent le système nerveux particulièrement adapté à des réponses coordonnées rapides et brèves. A l'inverse, la communication hormonale reposant sur la production, la libération d'hormones par les diverses glandes, et sur le transport de ces hormones par le sang, est adaptée aux situations qui nécessitent des ajustements fonctionnels plus durables.

1. Le système endocrinien : Définition

Plus spécifiquement, le système endocrinien contrôle et régule de nombreux processus physiologiques dont la reproduction, la croissance et le développement, la mobilisation des moyens de défense de l'organisme, le maintien de l'équilibre des électrolytes, des liquides et des nutriments dans le sang ainsi que la régulation du métabolisme cellulaire [27]. Il est constitué par des organes ou ensembles de cellules spécialisées dans l'élaboration d'hormones (messagers chimiques). Depuis la sécrétine, première hormone découverte par Bayliss et Starling (1902) [28], régulant la sécrétion par le pancréas d'enzymes digestives, de nombreuses substances ont été identifiées. Elles ont pour propriété d'être sécrétées dans le sang par des glandes appelées glandes endocrines (Figure 2), en opposition aux glandes exocrines (sudoripares, salivaires...). Certaines glandes remplissent les deux fonctions, endocrine et exocrine : on parle alors de glandes mixtes (pancréas, testicules...). Le testicule par exemple, est constitué de deux types de structure, l'une impliquée dans la synthèse d'androgènes (fonction endocrine), et l'autre impliquée dans la production de gamètes mâles (fonction exocrine).

Avant de rentrer dans le vif du sujet, nous allons présenter les principales glandes endocrines, de même que les hormones qu'elles sécrètent. Quelques généralités seront également exposées concernant la chimie des hormones, leurs mécanismes d'action et leurs régulations.

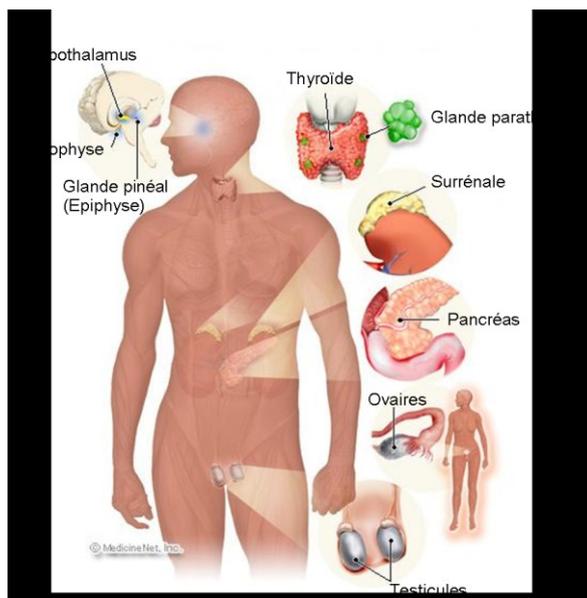


Figure 2 : Principales glandes endocrines
(D'après *MedicineNet*, 2007)

2. Les glandes endocrines

En dépit de l'existence de nombreux sites de production hormonale, le système endocrinien est composé de glandes endocrines principales, des organes qui sont sensibles à des signaux internes précis et qui sécrètent des hormones de manière prévisible [30].

Les glandes endocrines, aussi appelées glandes à sécrétion interne, libèrent des hormones dans le sang ou dans la lymphe, et sont généralement pourvues d'un abondant drainage vasculaire. Les principales glandes endocrines sont l'épiphyse, l'hypophyse, la thyroïde, les parathyroïdes, les surrénales, le pancréas et les gonades.

☞ L'**épiphyse** ou glande pinéale, est située à l'extrémité postérieure du toit du troisième ventricule cérébral. Cette glande est constituée de masses de cellules gliales et de cellules sécrétrices appelées pinéalocytes. Ces dernières sont responsables de la synthèse de la mélatonine à partir de la sérotonine, et ce, sous la dépendance de l'intensité lumineuse. La mélatonine est sécrétée la nuit et contribue à régler l'horloge biologique du corps humain (cycle nyctéméral) [31, 32]. Cette hormone régulatrice du cycle du sommeil intervient également dans différents processus biologiques dont la reproduction [33], la croissance cellulaire [34], et contrôle le poids corporel et la balance énergétique [35]. Par ailleurs, la

mélatonine affecte la synthèse et la fonction des stéroïdes, tels que les œstrogènes, la testostérone, et la progestérone. Enfin, il a été largement établi que cette neuro-hormone inhibe l'angiogénèse et la prolifération tumorale, via (i) l'inhibition de l'absorption des acides gras par les cellules cancéreuses ; (ii) l'inhibition de l'activité télomérase, entraînant l'apoptose de cellules cancéreuses ; (iii) l'inhibition de la synthèse d'endothéline-1, un facteur angiogénique ; (iv) des mécanismes épigénétiques ; et (v) l'induction de l'apoptose, ainsi que la modulation du cycle cellulaire [36, 37].

☞ L'ensemble constitué par l'**hypothalamus**, l'**hypophyse** (Figure 3) et les organes situés au pourtour du troisième ventricule cérébral constitue un relais. Son but est de recueillir une multitude d'informations provenant tant de l'environnement que de l'organisme sous forme d'afférences sensorielles (visuelles, olfactives, viscéro-somatiques,...), de les analyser, d'intégrer les variations, de les filtrer ou de les renforcer. Après ce travail de tri et de synchronisation principalement réalisé par le système limbique, des signaux sont transmis par voie nerveuse et par des neurotransmetteurs à des régions spécialisées de l'hypothalamus. A son tour, l'hypothalamus règle par l'intermédiaire d'hormones hypophysiotropes, l'activité des cellules hypophysaires en modulant directement leur sécrétion, ou en modifiant leur consigne. Enfin, les hormones hypophysaires, agissent au niveau de l'organisme dans le but de maintenir l'homoéostasie. Pour cette raison, le complexe hypothalamo-hypophysaire représente à lui seul l'essentiel des processus d'intégration neuro-endocrinienne de l'organisme.

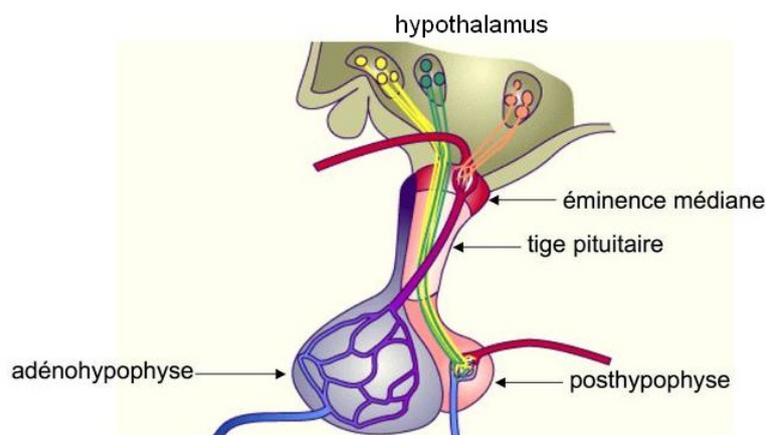


Figure 3 : Hypothalamus et hypophyse

(Modifiée d'après http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/endokrin/images/hypophyse_mod_ohne.gif)

✓ L'hypothalamus, formé par les parois du troisième ventricule est considéré comme le lien entre le système nerveux et le système endocrinien. Il produit deux hormones qui sont stockées dans l'hypophyse avant d'être libérées dans le sang : l'hormone antidiurétique (ADH) ou vasopressine, et l'ocytocine. L'hypothalamus sécrète aussi des libérines, hormones régulant les sécrétions de l'hypophyse [38, 39], dont les principales sont :

- La gonadolibérine (GnRH ou LHRH). En phase de repos, cette hormone est libérée de façon pulsatile toutes les 30 à 120 minutes, par les neurones du noyau arqué ou de l'aire pré-optique hypothalamique, en fonction de l'espèce. Son récepteur est exprimé par les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. Il appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, liés à des protéines G. Sa stimulation par la GnRH induit une augmentation de la transcription de son propre gène, et des gènes codant pour les hormones FSH et LH [40, 41] ;
- La thyroïdolibérine (TRH) stimule la sécrétion de la thyrotrophine (TSH) ;
- La dopamine inhibe la sécrétion de la prolactine ;
- La somatocitrine (GH-RH) provoque la libération de l'hormone de croissance, tandis que la somatostatine (GH-IH) l'inhibe ;
- La corticolibérine (CRF) stimule la sécrétion de la corticotrophine.

La sécrétion des hormones hypothalamiques (sauf de la dopamine) est soumise à un phénomène de rétrocontrôle exercé par les hormones hypophysaires correspondantes.

✓ L'hypophyse, appelée aussi glande pituitaire, est appendue à la base du cerveau au niveau de la selle turcique. Divisée en deux lobes, elle est sous le contrôle de l'hypothalamus.

- Le lobe postérieur, neurohypophyse ou posthypophyse, se forme à partir d'une excroissance du tissu hypothalamique, et reste uni à l'hypothalamus par un réseau de neurofibres. La neurohypophyse est composée principalement de cellules gliales, d'axones et de terminaisons axonales. Ces dernières emmagasinent l'ocytocine et l'ADH synthétisées et libérées par les neurones hypothalamiques (Figure 4). Par conséquent, en libérant des neurohormones qu'elle reçoit "préfabriquées" de l'hypothalamus, la neurohypophyse est bien plus un site de stockage qu'une glande endocrine. Ces hormones sont sécrétées lorsque les terminaisons axonales sont stimulées par un influx nerveux. L'ADH influence l'équilibre hydrique, tandis que l'ocytocine stimule la contraction des muscles lisses de l'utérus et des cellules myoépithéliales des glandes mammaires [42, 43].

• Le lobe antérieur, antéhypophyse ou adénohypophyse, est composé de cellules hormonopoiétiques. Contrairement au lobe postérieur, il produit et libère de nombreuses hormones. Six hormones adénohypophysaires, ayant chacune des effets physiologiques distincts sur l'organisme, ont été décrites (Figure 4) [44, 45] :

Stimulines, régissant le fonctionnement hormonal d'autres glandes endocrines :

› Les gonadotrophines, la FSH et la LH, régissent le fonctionnement des gonades. Ces deux hormones sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité commune, la glycoprotéine α (gp α), et d'une sous-unité β spécifique de chacune des deux hormones (FSH β , LH β). Les récepteurs des gonadotrophines LH et FSH font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La fixation du ligand sur ce récepteur permet *in fine* l'activation de la transcription des gènes cibles [46]. Chez les deux sexes, la FSH stimule la production de gamètes (spermatozoïdes et ovules), tandis que la LH favorise la production des hormones gonadiques. Enfin, quand le taux sanguin d'hormones gonadiques s'élève, la sécrétion de LH ou de FSH est inhibée par rétrocontrôle. (cf. chapitre II, *Axe cérébro-testiculaire*)

› La thyroïdrotrophine (TSH) ou hormone thyroïdrotrope, est une glycoprotéine qui stimule le développement normal et l'activité sécrétrice de la thyroïde.

› La corticotrophine (ACTH) ou hormone corticotrope, amène la corticosurrénale à libérer les hormones corticostéroïdes formées à partir du cholestérol, et plus particulièrement les glucocorticoïdes, qui aident l'organisme à résister aux facteurs de stress.

Hormones adénohypophysaires agissant principalement sur des cibles non endocriniennes :

› La prolactine (PRL) (*pro* = en faveur de ; *lactus* = lait) est une hormone protéique semblable, du point de vue structural, à l'hormone de croissance. Son principal effet consiste en la stimulation et le maintien de la lactation. L'élévation transitoire du taux de PRL précédant la menstruation est une des causes du gonflement et de la sensibilité des seins que certaines femmes éprouvent ; cependant, le séjour de la PRL dans le sang est trop bref pour déclencher la lactation. En revanche, son taux

sanguin s'élève énormément à la fin de la grossesse et provoque cette fois la lactation. Ce taux sanguin élevé est également à l'origine de la réduction de l'incidence de la conception durant la lactation. Le rôle de la PRL chez l'homme n'est pas totalement élucidé, bien qu'une hyperprolactinémie entraîne l'impuissance.

› L'hormone de croissance (GH), aussi appelée somatotrophine, est l'hormone protéique la plus abondante des hormones sécrétées par l'adénohypophyse. Bien que la GH provoque la croissance et la division de la plupart des cellules de l'organisme, ses principales cibles sont les os et les muscles squelettiques. Elle contrôle également certains métabolismes dans de nombreux organes, dont le foie, l'intestin et le pancréas ; elle stimule la synthèse protéique, le catabolisme des graisses, et augmente le taux sanguin de glucose. Chez le mâle, la GH a des fonctions extra-gonadiques, comme l'accroissement et le maintien de la taille du pénis, la différenciation des canaux spermatiques chez l'adolescent, et la stimulation de la synthèse d'enzymes dans certaines glandes annexes. Enfin, cette hormone possède aussi des effets sur les fonctions gonadiques comme la spermiogenèse, la stimulation de la synthèse des androgènes et l'accroissement de la mobilité des spermatozoïdes.

• Enfin, une troisième structure a été identifiée entre le lobe postérieur et antérieur de l'hypophyse : l'hypophyse intermédiaire. Celle-ci sécrète la mélanostimuline (MSH) qui dérive de l'ACTH par clivage enzymatique. La MSH agit notamment sur les mélanocytes de la peau, en induisant la synthèse de mélanine en réponse aux rayons UVA.

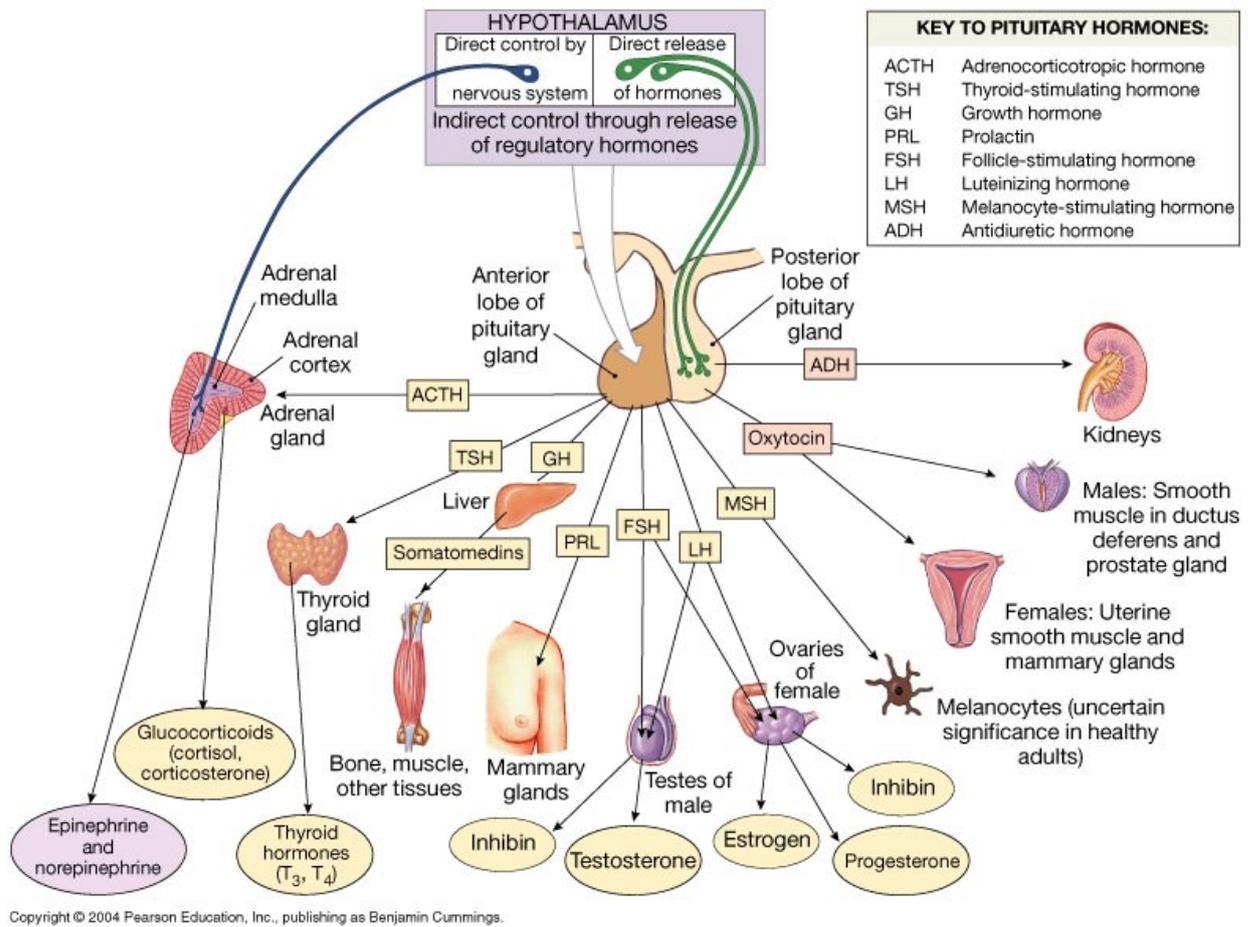


Figure 4 : Cibles des hormones hypophysaires
 (D'après Pearson Education, 2004)

☞ La **thyroïde** ou glande thyroïde est la plus volumineuse des glandes purement endocrines chez l'être humain. En forme de papillon, elle est située dans la partie antérieure du cou ; elle repose sur la trachée, juste en-dessous du larynx. Cette glande sécrète la triiodothyronine (T3), la thyroxine (T4) et la calcitonine.

✓ Les hormones thyroïdiennes (T3 et T4), de structure similaire et contenant de l'iode, agissent sur les cellules de presque tous les tissus (hormis la rate, l'utérus et la glande thyroïde elle-même). La production de ces hormones est régie par la TSH, produite par l'hypophyse. La thyroïde ne produit de la T3 directement qu'en très faible quantité. La plus grande production de la T3 est obtenue par la conversion de la T4 au niveau du foie, et les intestins pour le reste. En règle générale, ces hormones stimulent les enzymes effectuant l'oxydation du glucose. En conséquence, elles accélèrent le métabolisme basal et augmentent la consommation d'oxygène ainsi que la production de chaleur. Par ailleurs, les hormones thyroïdiennes influent sur la croissance et le développement des tissus. Elles

sont essentielles au développement du système squelettique et du système nerveux, ainsi qu'aux fonctions de reproduction [47, 48]. Enfin, il semblerait qu'elles soient impliquées dans la régulation de la spermatogenèse, le développement testiculaire [49], et la stéroïdogénèse [50].

✓ La calcitonine, aussi appelée thyrocalcitonine, est une hormone polypeptidique dont l'effet principal est d'abaisser le taux sanguin de calcium en inhibant la résorption osseuse [51]. La calcitonine est un antagoniste direct de la parathormone élaborée par les glandes parathyroïdes [52].

☞ Les **glandes parathyroïdes** sont de petites glandes rattachées à la face postérieure de la glande thyroïde, généralement au nombre de quatre. Elles sécrètent la parathormone (PTH), ou hormone parathyroïdienne, qui favorise le maintien de l'équilibre calcique dans le sang. La PTH a pour principal effet d'élever le taux de calcium en stimulant trois organes cibles : le squelette, les reins et les intestins [53]. La sécrétion de cette hormone est indépendante de l'hypophyse. En effet, la diminution du taux sanguin de calcium provoque sa libération, et l'hypercalcémie l'inhibe.

☞ Les deux **glandes surrénales** coiffant chacune respectivement un rein (Figure 5A), ont une forme pyramidale aplatie. Durant le développement embryonnaire, les glandes surrénales se différencient en deux régions distinctes sur les plans structural et fonctionnel : un grand cortex surrénal situé en périphérie qui constitue 80 à 90% de la masse de la glande, et une petite médullosurrénale localisée au centre (Figure 5B). [54]

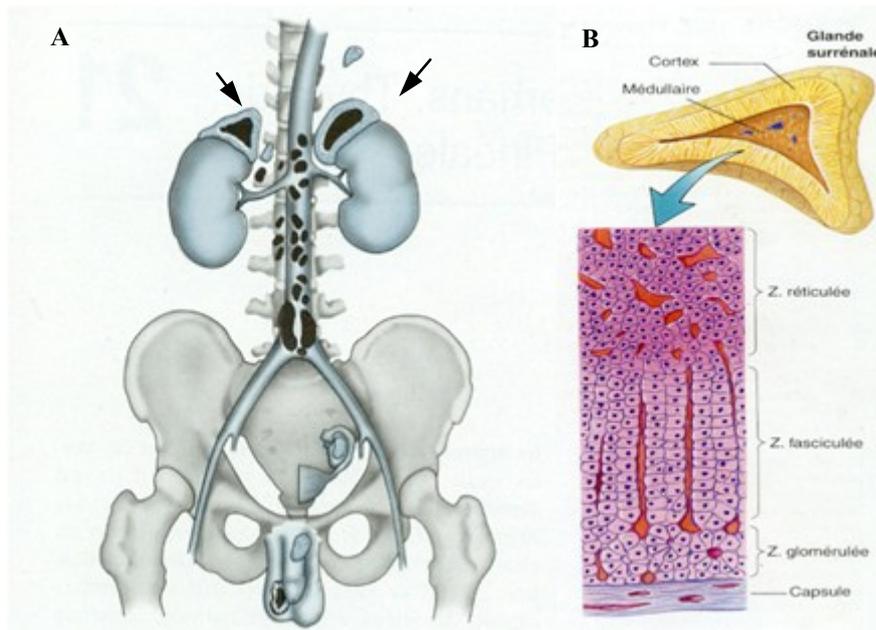


Figure 5 : Les glandes surrénales
(D'après Poirier *et al.*, 1997)

✓ Le cortex surrénal (Figure 5B) est divisé en trois couches, ou zones, qui sécrètent des hormones distinctes. La couche externe, située immédiatement sous la capsule de tissu conjonctif, est appelée zone glomérulée. Ses cellules sécrètent des hormones nommées minéralocorticoïdes parce qu'elles influent sur l'homéostasie de sels minéraux, tels que le sodium ou le potassium. La couche intermédiaire, appelée zone fasciculée, est la plus large des trois couches. Ses cellules sécrètent principalement des glucocorticoïdes, ainsi nommés parce qu'ils influent sur l'homéostasie du glucose. Enfin, les cellules de la couche interne, appelée zone réticulée, synthétisent de petites quantités d'androgènes. [55]

- *Minéralocorticoïdes* : ils constituent un groupe d'hormones dont l'aldostérone est la plus importante (~95%). Le maintien de l'équilibre des ions sodium est le but premier de cette hormone. L'aldostérone a pour cible principale la partie distale des tubules rénaux, où elle stimule la réabsorption des ions sodium de l'urine (s'accompagnant de rétention d'eau). Leur retour dans la circulation sanguine entraîne l'élimination des ions potassium, et dans une certaine mesure, la régulation de l'équilibre acido-basique du sang. La libération d'aldostérone a peu de rapport avec l'hypothalamus ou l'hypophyse : elle dépend de la concentration des ions dans le sang, de l'osmolarité sanguine et de la pression artérielle. [56]

• *Glucocorticoïdes* : ils influent sur le métabolisme de la plupart des cellules et contribuent à leur résistance face au stress. Les glucocorticoïdes permettent à l'organisme de s'adapter aux changements de l'environnement et à l'intermittence de l'apport alimentaire en stabilisant la glycémie. De plus, ils maintiennent l'équilibre du volume sanguin en empêchant l'eau de pénétrer dans les cellules. Les glucocorticoïdes sont le cortisol, la cortisone et la corticostérone ; parmi ces hormones, seul le cortisol est sécrété en quantité notable chez l'être humain. Ce dernier possède une action hyperglycémiant, favorise la formation de glucose par le foie et la rétention de sodium, inhibe la lipolyse, et intervient dans la production d'anticorps. La régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes répond à une rétro-inhibition typique par l'ACTH, basée sur l'apport alimentaire et le degré d'activité. [57]

• *Gonadocorticoïdes* : dans ce groupe, les androgènes et particulièrement l'androstènedione, sont les plus abondants. La quantité des hormones stéroïdes fabriquée par le cortex surrénal, dont la testostérone, est négligeable comparativement à celle qu'élaborent les gonades [54]. Le rôle précis des ces gonadocorticoïdes demeure obscur.

✓ La médullosurrénale élabore deux catécholamines dont la sécrétion est induite par le système nerveux sympathique, impliqué dans les mécanismes de réponse au stress. L'adrénaline et la noradrénaline induisent des effets identiques comprenant une augmentation de la fréquence cardiaque, une vasoconstriction, une augmentation de la pression artérielle, une dérivation du sang vers les organes vitaux, une augmentation de la glycémie, une stimulation de la respiration et une bronchodilatation. [58, 59]

☞ Le **pancréas**, sous forme d'une masse chez l'Homme, est situé à l'arrière de l'estomac. Le pancréas du rat se présente, quant à lui, de façon diffuse dans l'abdomen. Le pancréas est à la fois une glande endocrine et une glande exocrine. Le corps de cet organe est constitué d'un tissu exocrine qui libère les sucs gastriques dans le duodénum. Répartis au sein du pancréas, les îlots de Langerhans contiennent deux grandes populations de cellules aptes à fabriquer des hormones : les cellules α qui synthétisent le glucagon, et les cellules β plus nombreuses, qui élaborent l'insuline. L'insuline et le glucagon interviennent différemment, mais de manière toute aussi essentielle dans diverses phases du métabolisme et de la régulation de la glycémie [60]. Leurs effets sont opposés : l'insuline est une hormone hypoglycémiant qui agit sur les métabolismes glucidique, protidique et lipidique, augmentant le niveau d'utilisation du glucose et diminuant son taux sanguin [61] ; tandis que le glucagon est une hormone

hyperglycémiant qui provoque la libération du glucose du foie [62]. Les îlots pancréatiques synthétisent également de petites quantités d'autres peptides, dont la somatostatine et l'amyline [60]. La somatostatine exerce un contrôle inhibiteur sur la sécrétion de nombreuses hormones : pancréatiques, intestinales et hypophysaires. Le rôle exact de l'amyline est encore sujet à caution.

☞ Les **ovaires** sont des glandes génitales paires logées dans la cavité pelvienne de la femme. L'ovaire produit cycliquement des hormones œstrogéniques et progestatives sous l'influence de la FSH et de la LH sécrétées par l'hypophyse, qui assurent la régulation du système reproducteur [63]. En particulier, la LH est responsable du déclenchement de l'ovulation. Les œstrogènes produits par les follicules ovariens, stimulent la prolifération de l'endomètre et sont responsables du développement et du maintien des caractères sexuels secondaires, notamment au niveau de la glande mammaire. Les hormones progestatives sont produites par le corps jaune ovarien. Elles stimulent l'activité sécrétoire de l'endomètre. Elles ont aussi une action sur le développement de la glande mammaire. Les ovaires produisent également l'inhibine, une hormone protéique qui s'oppose à la sécrétion de la FSH. Enfin, au cours des semaines précédant l'accouchement, les ovaires et le placenta synthétisent une hormone peptidique appelée relaxine. Celle-ci provoque l'assouplissement et la relaxation de l'utérus, des ligaments pelviens et de la symphyse pubienne, ce qui facilitera l'expulsion du nouveau-né.

☞ Les **testicules** sont constitués de deux compartiments : un compartiment tubulaire composé de tubes séminifères contenant les cellules de Sertoli et les cellules germinales assurant la fonction exocrine (spermatogenèse), et un compartiment interstitiel comportant plusieurs types cellulaires dont les cellules de Leydig qui assurent la fonction endocrine du testicule (stéroïdogénèse) en produisant les androgènes. La plus importante de ces hormones est la testostérone, qui régit la production des spermatozoïdes, stimule le développement des caractères sexuels secondaires, influence la croissance des glandes annexes (prostate, vésicules séminales, ...), et favorise l'activité sécrétoire de ces structures. (cf. chapitre II, *Le testicule*)

La Table 1 résume les principales hormones du système endocrinien, ainsi que leurs fonctions. Afin de rendre compte de la complexité de ce système, on peut noter qu'une même glande endocrine peut sécréter plusieurs hormones, qu'une hormone donnée peut avoir des effets différents sur diverses cellules cibles, qu'un processus physiologique peut être contrôlé par plusieurs hormones et enfin, il est fréquent que différentes structures endocrines agissent les unes sur les autres afin de moduler leurs fonctionnements.

Système endocrinien	Hormones sécrétées	Abréviations	Effets	
Axe Hypothalamo-Hypophysaire	Hypothalamus	<i>Hormone thyroïdienne</i>	TRH ou PRH	Stimule la sécrétion de TSH et PRL au niveau de l'hypophyse
		<i>Dopamine</i>	DA	Inhibe la sécrétion de PRL au niveau de l'hypophyse
		<i>Hormone de libération de l'hormone de croissance</i>	GHRH	Stimule la sécrétion de GH au niveau de l'hypophyse
		<i>Gonadolibérine</i>	GnRH ou LHRH	Stimule la sécrétion de FSH et LH au niveau de l'hypophyse
		<i>Corticolibérine</i>	CRH	Stimule la sécrétion d'ACTH au niveau de l'hypophyse
	Anté-Hypophyse	<i>Hormone de croissance</i>	GH	Stimule la croissance et la reproduction cellulaire
		<i>Prolactine</i>	PRL	Stimule la lactation
		<i>Hormone folliculo-stimulante</i>	FSH	Stimule la maturation des follicules chez la femelle et régule la spermatogénèse chez le mâle
		<i>Hormone lutéinisante</i>	LH	Stimule la sécrétion d'œstrogènes et induit l'ovulation chez la femelle. Stimule la sécrétion de testostérone chez le mâle
		<i>Thyréostimuline</i>	TSH	Stimule la sécrétion d'hormones thyroïdiennes
		<i>Hormone adrénocorticotrope</i>	ACTH	Stimule la sécrétion des glucocorticoïdes
	Post-Hypophyse	<i>Mélano-stimuline</i>	MSH	Stimule la production de mélanine
		<i>Ocytocine</i>		Stimule la contraction utérine et la lactation
Surrénales	Cortex	<i>Vasopressine</i>	ADH	Inhibe la sécrétion d'urine et maintient l'équilibre électrolytique
		<i>Cortisol</i>		Régule le métabolisme, la croissance et la maturation des tissus de l'organisme
Surrénales	Medulla	<i>Déhydroépiandrostérone</i>	DHEA	Action contre le vieillissement
		<i>Adrénaline</i>		Accélère le rythme cardiaque suite à un stress ou une activité physique
Thyroïdes	Thyroïde	<i>Noradrénaline</i>		Action dans l'attention, les émotions, le sommeil, le rêve et l'apprentissage
		<i>Triiodothyronine</i>	T3	Stimule la production de l'ARN polymérase I et II, la fréquence cardiaque et la force de contraction, la production de myéline, les neurotransmetteurs et la croissance axonale
		<i>Thyroxine</i>	T4	Régule la vitesse du métabolisme et des processus de croissance et de différenciation des tissus
Thyroïdes	Parathyroïdes	<i>Calcitonine</i>		Régule le métabolisme du phosphore et du calcium
		<i>Parathormone</i>	PTH	Régule le métabolisme phospho-calcique du sang
Gonades	Testicules	<i>Inhibine</i>		Intervient dans la virilisation (voix, poils, développement musculaire), dans le désir sexuel (la libido), dans la production de spermatozoïdes
		<i>Hormone antimüllérienne</i>	AMH	Intervient dans la régression des canaux de Müller durant l'embryogénèse
		<i>Testostérone</i>	T	Inhibe la synthèse de la FSH hypophysaire
	Ovaires	E1, E2 ou E3	Stimule le développement des organes reproducteurs et des caractères secondaires féminins, régule le cycle ovarien	
		<i>Progestérone</i>	P4	Prépare l'endomètre à l'implantation de l'œuf fécondé, maintient le col de l'utérus fermé, intervient dans le développement des glandes mammaires
		<i>Androstènedione</i>		Participe à la synthèse des oestrogènes
Autres glandes endocrines	Pancréas	<i>Inhibine</i>		Inhibe la synthèse de la FSH hypophysaire
		<i>Glucagon</i>		Régule la glycémie
		<i>Insuline</i>		Régule les substrats énergétiques comme le glucose, les acides gras et les corps cétoniques
	Placenta	<i>Somatostatine</i>		Inhibe la sécrétion de GH, de TSH, d'insuline et du glucagon
		<i>Hormone chorionique gonadotrope</i>	hCG	Maintien du corps jaune durant la grossesse et de sa sécrétion de progestérone
		<i>Estriol</i>	E3	Forme principale d'œstrogènes produite pendant la grossesse
	Epiphyse	<i>Progestérone</i>	P4	Maintien de la grossesse
		<i>Mélatonine</i>		Agit sur la reproduction, le système immunitaire et en tant qu'antioxydant
	Thymus	<i>Thymuline</i>		Stimule l'immuno-compétence des lymphocytes T
		<i>Thymopoïétine</i>		Agit sur les cellules nourricières des prothymocytes

Table 1 : Les différentes hormones et leurs fonctions principales

Hormones peptidiques

Hormones stéroïdes

Hormones monoaminées

3. Chimie des hormones

Les hormones jouent un rôle essentiel dans la transmission de l'information entre les cellules ou les organes. Les hormones sont définies comme des substances chimiques que des cellules sécrètent dans le liquide interstitiel (extracellulaire), et qui régissent le métabolisme d'autres cellules, la contraction des cellules musculaires lisses ainsi que la sécrétion de certaines glandes. Bien que l'organisme produise des hormones très diverses, elles peuvent être classées en trois groupes selon leur nature biochimique [44] :

☞ Les **hormones peptidiques** sont de taille et de structure très diverses (Figure 6) [64]. Elles ont des dimensions variables, comprises entre 3 acides aminés pour la TRH, et 191 acides aminés pour la GH. Certaines sont constituées de deux chaînes peptidiques comme la LH ou l'insuline. Après traduction de leurs gènes en ARN messager (ARNm), elles sont synthétisées par les ribosomes du réticulum endoplasmique granulaire et empaquetées dans des vésicules sécrétoires au niveau de l'appareil de Golgi. Ces vésicules permettent aux hormones de franchir la bicouche lipidique hydrophobe de la membrane plasmique. Une fois libérées dans le sang, les hormones agissent sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs protéiques transmembranaires qui servent de relais pour transmettre les signaux à l'intérieur de la cellule. Cette classe d'hormones comprend les hormones produites par l'antéhypophyse, les parathyroïdes, le pancréas ainsi que les hormones activatrices de l'hypothalamus.

☞ Les **hormones stéroïdes** sont des lipides synthétisés dans le cytosol à partir du cholestérol (Figure 6). Ces hormones hydrophobes traversent aisément les membranes plasmiques, et doivent se complexer avec des protéines plasmatiques pour circuler dans le sang [64]. Le complexe stéroïde-protéine est inactif, seule l'hormone stéroïde libre a une action endocrine. La protéine de transport ne libère l'hormone stéroïde qu'au niveau des capillaires sanguins qui irriguent les organes cibles. Les hormones pénètrent ensuite dans le cytoplasme de leurs cellules cibles, où elles se lient à des récepteurs intracellulaires. Ces récepteurs appartiennent à une grande famille de molécules protéiques que sont les récepteurs nucléaires. Dans ce groupe d'hormones se retrouvent les hormones sécrétées par les corticosurrénales, par les gonades et le placenta.

Les **hormones monoaminées** dérivent d'acides aminés, principalement de la tyrosine et du tryptophane, et sont des molécules de petite taille (Figure 6). Il s'agit entre autres de l'adrénaline, de la noradrénaline, de la dopamine et de la mélatonine. Leur mécanisme d'action sur les cellules cibles est comparable à celui des hormones peptidiques. En effet, ces hormones aminées circulent librement dans le sang et agissent sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires spécifiques. Certaines d'entre elles, telles que la noradrénaline et la dopamine, existent aussi dans le système nerveux où elles fonctionnent, non pas en tant qu'hormone, mais comme neuro-transmetteur. Un autre sous-groupe d'hormones monoaminées, dérivées de la tyrosine, est constitué par les hormones thyroïdiennes. Les deux principales sont la T3 et la T4, ayant comme caractéristiques principales : (i) elles contiennent des atomes d'iode, (ii) elles sont liées à des protéines plasmatiques, dont l'albumine et la TBG (*thyroxine-binding globulin*), pendant leur transport sanguin (ce qui les inactive transitoirement) et (iii) elles agissent sur des récepteurs intracellulaires.

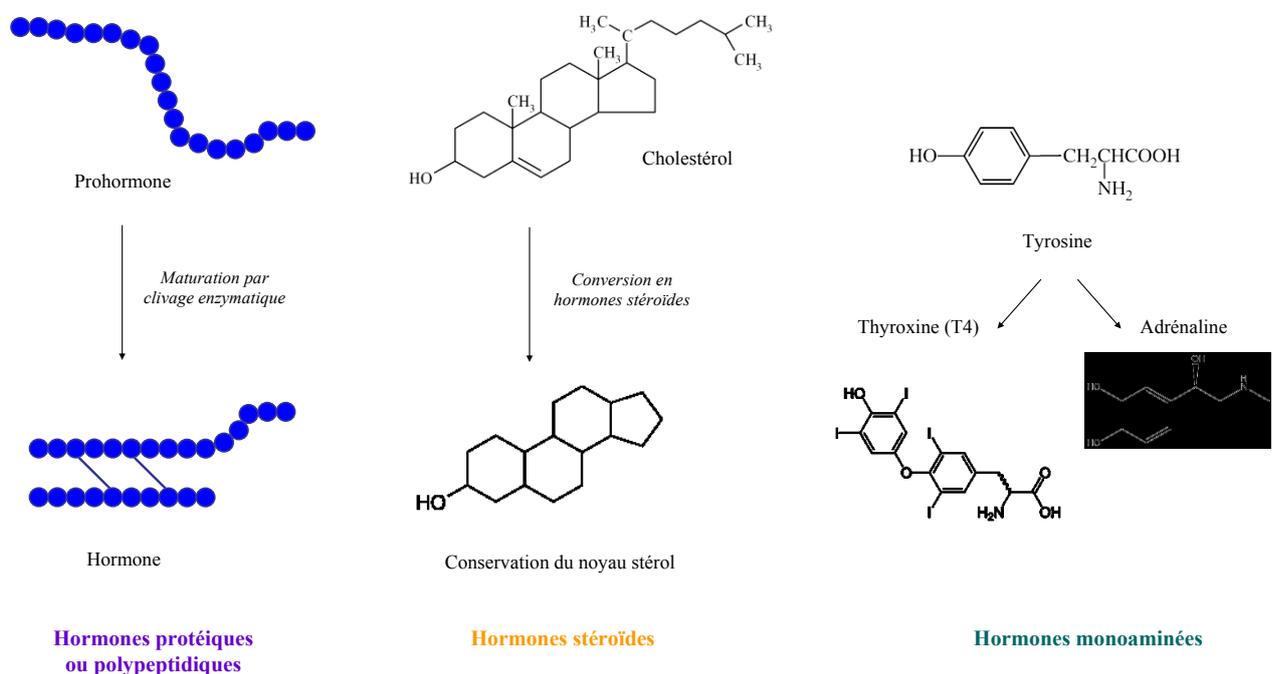


Figure 6 : Les trois principales classes d'hormones

4. Mécanisme de l'action hormonale

Les hormones sont des molécules très actives, c'est-à-dire capables de modifier le fonctionnement d'un organe à de très faibles doses. Leurs concentrations sanguines sont généralement infimes (ex., la testostérone chez le rat contrôle : 3-5 ng/l de plasma, chez l'homme : 3-10 ng/ml). En raison de leur transport par voie sanguine, on pourrait s'attendre à une action non sélective des hormones. En fait, il n'en est rien : une hormone n'agit pas globalement mais spécifiquement dans le corps. Pour réagir à une hormone, une cellule cible doit posséder des récepteurs auxquels l'hormone peut se lier de manière complémentaire. En d'autres termes, c'est la présence du récepteur hormonal qui confère à la cellule cible sa sensibilité vis-à-vis de l'hormone. Ces récepteurs sont présents soit dans la membrane plasmique pour les hormones peptidiques, telles que l'adrénaline, la dopamine, la noradrénaline et la mélatonine (Figure 7, cellule cible A), soit dans la cellule pour les stéroïdes et les hormones thyroïdiennes (Figure 7, cellule cible B).

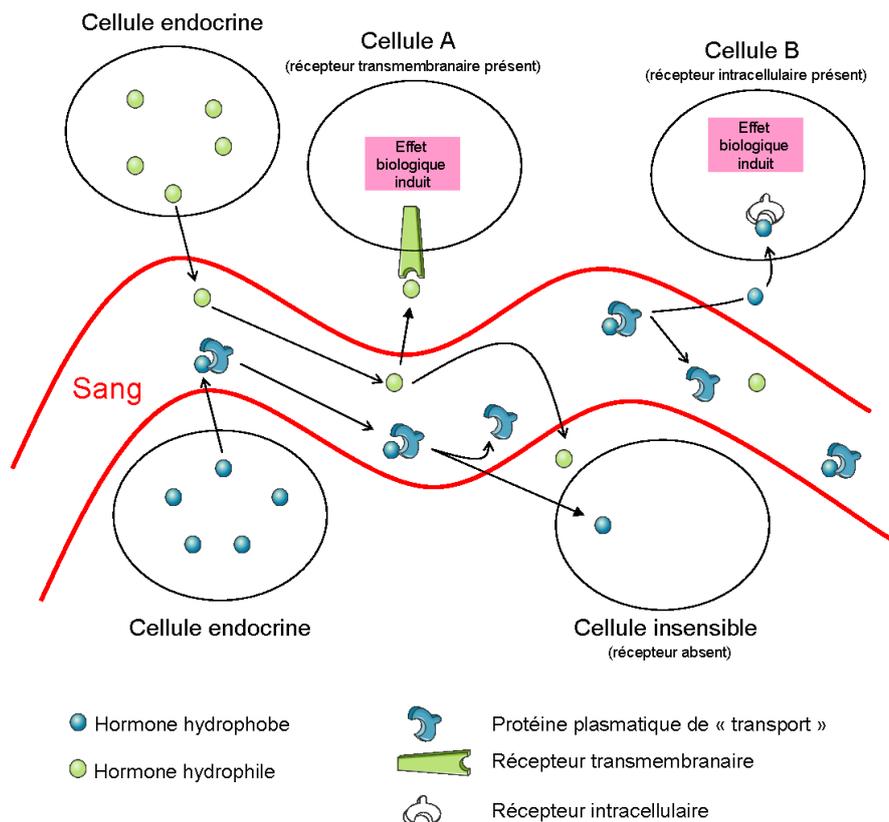


Figure 7 : Mécanismes d'action des hormones, généralités
(Modifiée d'après un cours de l'Université de Médecine de Montpellier, S. Bartolami)

☞ **Action via les récepteurs transmembranaires.** Les récepteurs hormonaux membranaires sont des protéines qui participent au passage de l'information véhiculée par l'hormone vers le cytoplasme, sans que celle-ci ne pénètre à l'intérieur de la cellule cible. Ils sont principalement répartis en trois grandes familles : les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs des cytokines. La fixation de l'hormone sur la face externe du récepteur active ce dernier, conduisant à des réponses immédiates ou très légèrement différées. [65]

✓ Les réponses différées, appelées système de transduction, apparaissent lorsque le récepteur n'est que le premier maillon d'une chaîne de molécules. Ce système réalise le transfert de l'information hormonale dans le milieu intracellulaire. Dans ce cas, le récepteur appartient à la classe des récepteurs métabotropiques. Le système de transduction se compose typiquement de trois éléments : d'un récepteur, d'un système protéique de couplage et d'une ou plusieurs protéines effectrices. Le système de couplage, qui associe le récepteur à la (aux) protéine(s) effectrice(s), est localisé sur la face interne de la membrane plasmique. Les protéines effectrices sont des enzymes qui, une fois stimulées, catalysent la synthèse de vecteurs intracellulaires porteurs de l'information amenée à la cellule cible par l'hormone. Ces vecteurs sont appelés seconds messagers par analogie avec l'hormone, qui est le premier messager. Parmi les principaux seconds messagers, le calcium, l'AMPc (*adénosine monophosphate cyclique*), le diacylglycérol et l'inositol triphosphate peuvent être cités. Dans la plupart des cas, les seconds messagers provoquent de manière plus ou moins directe la phosphorylation de protéines qui existent déjà dans la cellule. La phosphorylation des protéines a pour conséquence de transformer leurs activités biologiques. Enfin, comme les cibles moléculaires sont des protéines préexistantes, l'effet endocrinien se développe rapidement en quelques secondes ou quelques minutes. [66]

✓ Les réponses immédiates par les récepteurs-canaux ou les récepteurs ionotropiques résultent de l'ouverture de canaux ioniques inclus dans la structure des récepteurs membranaires. Une fois ouverts, les canaux ioniques donnent naissance à des courants ioniques transmembranaires qui modifient les propriétés électrophysiologiques des cellules cibles. Ce type de réponse cellulaire apparaît en quelques millièmes de seconde, mais n'est pas majoritaire dans le système endocrinien.

☞ **Action via des récepteurs intracellulaires.** Une fois entrées dans la cellule, les hormones hydrophobes franchissent la membrane nucléaire et interagissent via des récepteurs protéiques avec le génome [67]. Dans le cas des stéroïdes, ces hormones liposolubles se lient à des récepteurs cytosoliques, et c'est le complexe hormone/récepteur qui migre ensuite dans le noyau (Figure 8). Par contre, les hormones thyroïdiennes atteignent librement le noyau et reconnaissent des récepteurs nucléaires présents en permanence sur la séquence d'ADN cible.

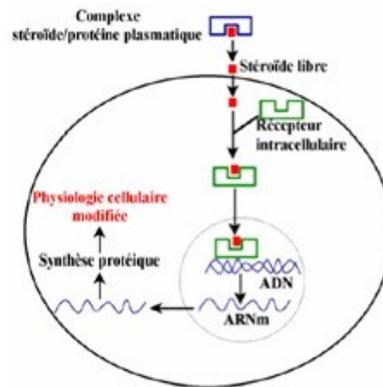


Figure 8 : Mode d'action intracellulaire des hormones stéroïdes

Le récepteur intracellulaire activé agit alors sur une séquence d'ADN particulière, "l'élément de réponse" à l'hormone. Cet élément de réponse est localisé dans la région du promoteur d'un gène cible. Le promoteur étant la partie du gène qui régule son expression, la fixation du complexe hormone/récepteur sur l'élément de réponse module la transcription de ce gène en ARNm. Pour cette raison, ces récepteurs intracellulaires sont souvent dénommés récepteurs nucléaires, et sont donc des facteurs de transcription dont l'activité est dépendante de la liaison de leurs ligands. La grande famille des récepteurs nucléaires compte au moins une cinquantaine de membres, dont le récepteur aux androgènes (cf chapitre II, *Biosynthèse, production et action des androgènes par les cellules de Leydig*).

Les hormones stéroïdes et thyroïdiennes stimulent ou inhibent la synthèse de protéines spécifiques dans les cellules cibles et transforment leur fonctionnement. La réponse biologique induite se produit donc après de nombreuses minutes voire quelques heures, mais est durable.

La finalité des hormones consiste en la modification de l'activité des cellules cibles, c'est-à-dire accélérer ou ralentir leurs processus normaux. La réponse suscitée par l'hormone est fonction : (i) du type de la cellule cible ; (ii) de la concentration sanguine de l'hormone ; (iii) du nombre relatif de récepteurs de l'hormone sur la membrane plasmique ou à l'intérieur de la cellule cible ; (iv) de l'affinité entre l'hormone et le récepteur. En général, une stimulation hormonale produit sur les cellules cibles l'un des effets suivants : modification de la perméabilité ou du potentiel de repos de la membrane plasmique, synthèse de protéines ou de molécules régulatrices dans la cellule, activation ou désactivation d'enzymes, déclenchement de l'activité sécrétrice, stimulation de la mitose.

5. Régulation du système endocrinien

Trois principaux types de stimulus amènent les diverses glandes endocrines à produire et à libérer des hormones : les stimuli humoraux, nerveux et hormonaux. Etant donné que la majeure partie de notre travail a porté sur l'étude des perturbateurs endocriniens, nous nous sommes focalisés sur cette dernière stimulation dans le cadre de cette thèse.

☞ **Stimuli humoraux.** Les variations des taux sanguins de certains ions et de certains nutriments entraînent la libération d'hormones et, à ce titre, elles constituent le plus simple des mécanismes de régulation endocrinienne. Ces variations sont qualifiées de stimuli humoraux pour les distinguer des stimuli hormonaux, lesquels sont aussi des substances chimiques qui diffusent du sang vers le liquide interstitiel. Parmi les hormones libérées en réaction à des stimuli humoraux, la calcitonine peut être mentionnée, de même que l'insuline, et l'aldostérone. Par exemple, une carence en calcium dans le sang induit la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne, et, inversement, un taux élevé de calcium stimule la libération de calcitonine par la thyroïde.

☞ **Stimuli nerveux.** Des neurofibres stimulent parfois la libération d'hormones. L'exemple classique est celui du système nerveux sympathique qui amène la médullosurrénale à libérer de l'adrénaline et de la noradrénaline pendant les périodes de stress. De la même façon, la

neurohypophyse libère de l'ocytocine et de l'hormone antidiurétique en réaction à des influx nerveux provenant de neurones hypothalamiques.

☞ **Stimuli hormonaux.** La libération de la plupart des hormones adénohypophysaires est sous le contrôle des hormones hypothalamiques (hypophysiotropes) de libération et d'inhibition. A leur tour, de nombreuses hormones adénohypophysaires (stimulines) amènent d'autres glandes endocrines à libérer leurs hormones dans le sang. A mesure que les hormones produites par les dernières glandes cibles se concentrent dans le sang, elles inhibent la libération d'hormones adénohypophysaires et ainsi leur propre libération (rétrocontrôle négatif).

La régulation hormonale de la reproduction humaine constitue l'un des nombreux exemples. L'hypothalamus stimule les sécrétions de l'adénohypophyse par la GnRH. L'adénohypophyse stimule ensuite les gonades via la FSH et la LH, et enfin les gonades exercent un rétrocontrôle hormonal sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse (cf. chapitre II, *Axe cérébro-testiculaire*, pour plus de détails).

6. Perturbations du système endocrinien

A. Perturbateurs Endocriniens : Définitions

Comme illustré au travers des précédents paragraphes, le système endocrinien participe au maintien des constantes garantissant le respect de l'homéostasie, indispensable à l'intégrité d'un individu. Les hormones produites par ce système sont impliquées dans un très grand nombre de mécanismes notamment dans : la différenciation sexuelle, les fonctions liées à la reproduction, la croissance, le métabolisme, les fonctions cardiovasculaires ou encore la digestion et l'excrétion. En conséquence, l'action de substances perturbatrices du système endocrinien peut entraîner des modifications physiologiques importantes, et avoir un rôle néfaste [68-70].

La prise de conscience de l'impact de composés chimiques actifs sur le système hormonal, dits "perturbateurs endocriniens" (PE), a conduit à un développement accru des recherches dans ce domaine ces dernières années [71]. Bien qu'il n'existe pas de définition

universellement acceptée du terme PE, certaines sont largement admises. L'une des premières à avoir été établie, fait la distinction entre un PE et un PE potentiel (1996, Weybridge, Royaume-Uni) : «*Un perturbateur endocrinien est une substance exogène qui entraîne des effets néfastes sur la santé dans un organisme intact, ou sa descendance, suite à des changements dans la fonction endocrine*». En 1997, un groupe de travail sur la perturbation endocrinienne (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee) de l'Agence de Protection Américaine de l'Environnement (EPA) a précisé les modes d'action au regard de la littérature, avec la définition suivante : «*Un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la fixation, l'action, ou l'élimination des hormones naturelles du corps humain responsables de l'entretien ou de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et/ou du comportement* ». Une troisième définition proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (2002), étend le principe de perturbation endocrinienne aux populations : «*Les perturbateurs endocriniens sont des substances exogènes qui modifient la(les) fonction(s) du système endocrinien et qui ont pour conséquence de provoquer des effets néfastes sur la santé dans un organisme intact, ou sa descendance, ou (sous-) populations*». [26, 72-74]

Ces définitions sont difficiles à appréhender concrètement et peuvent donner lieu à différentes interprétations. Néanmoins, elles partagent des éléments communs et reposent sur deux notions principales : la modification de l'homéostasie endocrinienne et l'induction d'effet nocif sur la santé.

B. Substances et origines

Les PE pris dans leur ensemble n'ont pas d'autre point commun que la propriété qui les définit. Les PE englobent un grand nombre de molécules chimiques de provenance diverse, incluant notamment des constituants de plantes, des pesticides, des composés utilisés dans l'industrie des plastiques et des produits de consommation, des sous-produits industriels et des polluants... Plusieurs centaines de substances sont aujourd'hui suspectées d'être des PE, dont certaines sont présentées dans la Table 2. Les PE peuvent être classés en deux grandes catégories, en considérant leur origine : naturels ou synthétiques. [75]

Substances	
Hormones stéroïdes naturelles Estrone 17 α -Œstradiol Œstriol	Hormone sexuelle Hormone sexuelle Hormone sexuelle
Médicaments/ Hormones synthétiques 17- α -Ethinylestradiol Diéthylstilbestrol Mestranol Tamoxifène	Hormone de synthèse, contraceptif Œstrogène de synthèse Hormone de synthèse, contraceptif Traitement de certains cancers du sein
Phyto-Œstrogènes Génistéine Formononétine Biochanine A Daidzéine Coumestrol	Famille des isoflavones (légumineuses) Famille des isoflavones (légumineuses) Famille des isoflavones (légumineuses) Famille des isoflavones (légumineuses) Famille des coumestanes (alimentation animale)
Alkylphénols Nonylphénol Nonylphénol éthoxylate Octylphénol Octylphénol éthoxylate Nonylphénol carboxylate Octylphénol carboxylate	Produit de dégradation Agent de surface Produit de dégradation Agent de surface Produit de dégradation Produit de dégradation
Composés organostanniques Tributylétain	Biocide
Composés organiques oxygénés Bisphénol A Dioxines Phtalates	Industrie plastique (production de polycarbonate et de résines époxydes) Sous produits Industrie plastique
Composés polychlorés Biphényles polychlorés (PCB) Retardateurs de flamme bromés Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	Présents dans de nombreux secteurs de l'industrie (plastique, peintures, ...) Prévention de feu Sous produits de combustion, industrie chimique
Pesticides Lindane, Atrazine, Endosulfan, Linuron, etc.	

Table 2 : Différentes classes de substances à action endocrine
(D'après Birkett et Lester, 2003)

I. Les substances naturelles

i. Les hormones naturelles

Les hormones naturelles correspondent à des dérivés hormonaux produits par les organismes humain et animal. Le cholestérol est le précurseur des différentes classes d'hormones stéroïdes (Figure 9) dont les hormones sexuelles, œstradiol et testostérone. Les différentes familles se distinguent par leur nombre d'atomes de carbone : les progestagènes (C21), les androgènes (C19) et les œstrogènes (C18).

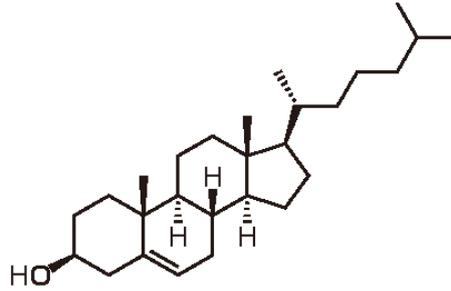
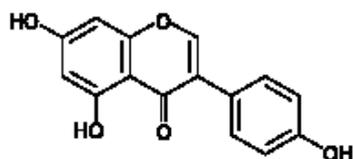


Figure 9 : Structure chimique du cholestérol, précurseur des hormones stéroïdes

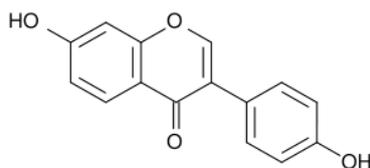
Ces hormones stéroïdes ont la propriété d'être lipophiles et sont excrétées après biotransformation hépatique, principalement sous forme glucorono- ou sulfoconjuguée. Dans l'environnement, ces formes conjuguées sont rapidement hydrolysées, et se retrouvent alors sous forme d'hormones libres ou de métabolites. Ces hormones peuvent provenir de différents êtres vivants ; les taux de ces hormones excrétées dépendent de plusieurs paramètres dont l'espèce animale, le sexe, l'état physiologique (gestation), l'âge ou le régime alimentaire. Une part non négligeable d'œstrogènes naturels présents dans l'environnement est produite par les animaux d'élevage, et peuvent constituer des sources de pollution.

ii. Les Phyto-œstrogènes

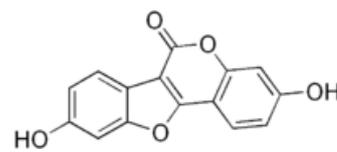
Les phyto-œstrogènes sont des molécules issues du règne végétal, de structure non stéroïdienne, capables de se fixer sur le récepteur aux œstrogènes. La notion de substances naturelles ayant un effet de type œstrogénique est apparue dès 1940, avec l'identification de troubles de la reproduction comme l'infertilité, dans des troupeaux ovins australiens (dite "maladie du trèfle") [76, 77]. Les phyto-œstrogènes, tels que la génistéine, la daidzéine, et le coumestrol (Figure 10) sont connus pour avoir des propriétés œstrogéniques [78], présents dans certaines plantes ou légumes comme le trèfle, les germes de soja, la luzerne, les choux, les haricots verts et les épinards [79]. Ces substances ont une analogie structurale importante avec l'œstradiol, et ont une activité œstrogénique *in vitro* supérieure à de nombreuses molécules synthétiques [80].



Génistéine



Daidzéine



Coumestrol

Figure 10 : Structures chimiques de certains phyto-œstrogènes

A ce jour, ce sont plus de 200 substances issues de plantes qui ont été reconnues comme ayant des activités œstrogéniques. La majorité des phyto-œstrogènes appartiennent à un groupe important appelé les flavonoïdes. Ce dernier est divisé en trois catégories principales [81] :

☞ Les **isoflavones** sont présents dans les légumineuses : graines de soja essentiellement, mais aussi dans les lentilles ou les pois. Les principaux composés sont la génistéine, la daidzéine, la glycitérine, la biochanine A et la formononetine ;

☞ Les **lignanes** sont retrouvés dans diverses céréales : graines de lin, son, seigle, sarrasin, millet, soja, avoine et orge, par ordre décroissant, ainsi que dans les fruits, certains légumes et baies. Les principaux composés sont l'entérodiol et l'entérolactone.

☞ Les **coumestanes**, essentiellement représentés par le coumestrol, sont présents dans les luzernes utilisées en alimentation animale.

Il convient de prendre en compte leur activité de PE, étant donné que les phyto-œstrogènes sont souvent absorbés via l'alimentation, notamment dans les pays asiatiques. En effet, l'utilisation du lait de soja, contenant des isoflavones, comme unique source de nourriture chez l'enfant constitue une source d'inquiétude quant au développement sexuel de celui-ci [82, 83]. En parallèle, les phyto-œstrogènes sont également connus par le grand public pour leurs effets bénéfiques potentiels sur la santé (effet "anti-cancer" du soja [84], effet "anti-oxydant" du resveratrol du vin rouge...). Précisément, il a été rapporté que ces substances peuvent : (i) agir comme agonistes et apporter des effets bénéfiques (au niveau du système cardio-vasculaire et osseux) à la femme ménopausée chez qui la production d'œstrogènes endogènes est inexistante ; (ii) agir comme antagonistes avec un effet protecteur contre le cancer du sein ; (iii) exercer des effets délétères lors du développement

embryonnaire, en interférant avec la différenciation sexuelle normale. En conséquence, le fait que ces molécules puissent agir à la fois en tant qu'agonistes et antagonistes des récepteurs stéroïdiens, laisse supposer que des effets délétères sur la santé pourraient être attendus. [85, 86]

Les phyto-œstrogènes généralement lipophiles, sont plus stables que les œstrogènes naturels. Ils ont également une demi-vie plus élevée, car ils ne sont pas aussi vite métabolisés que les hormones humaines. [87]

iii. Les myco-œstrogènes

Les myco-œstrogènes sont des substances produites par les champignons, en particulier *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*, pouvant se développer sur les plantes. Ils sont retrouvés à de fortes concentrations après la récolte du maïs ou de l'orge, ainsi que dans les graines de céréales et dans l'huile végétale. On distingue parmi les mycotoxines, la zéaralénone (Figure 11). Cette dernière se développe dans les denrées alimentaires à la suite d'une infection fongique des céréales notamment le maïs, mais aussi l'avoine, le blé, le riz et le soja [88]. L'effet toxique le plus préoccupant de la zéaralénone est son caractère de PE à activité œstrogénique [72, 89]. Entre autres, des travaux réalisés chez le rongeur adulte ont rapporté que l'exposition à cette substance induit l'apoptose des cellules germinales (principalement spermatogonies et spermatocytes), ce qui se traduit par une diminution du poids testiculaire et une diminution de la production de sperme [90, 91].

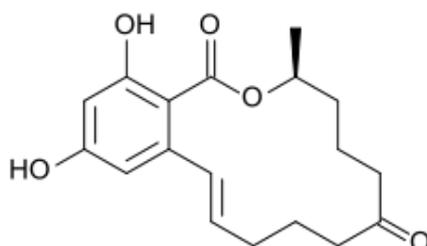


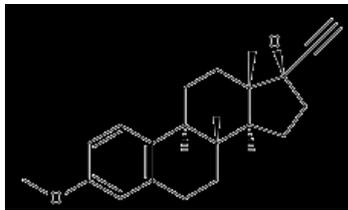
Figure 11 : Structure chimique de la zéaralénone

II. Les substances synthétiques

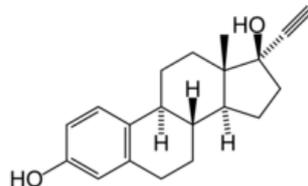
i. Les hormones de synthèse

Les hormones de synthèse sont des hormones spécialement conçues pour agir sur le système endocrinien, et le moduler. Cette catégorie comprend le diéthylstilbestrol (DES, utilisé jusqu'en 1970 lors de grossesses à risques), ainsi que les composés contraceptifs (éthinyloestradiol, méstranol, mifépristone ou RU 486). Elle englobe également les hormones utilisées pour les traitements de l'infertilité, de la stérilité, de la ménopause, ou encore de cancers hormono-dépendants comme le 4-hydroxytamoxifène ou le raloxifène. La structure chimique de ces différents composés est très variable. [78] (Figure 12)

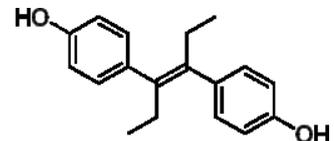
Ces dernières persistent plus durablement dans l'environnement que les hormones naturelles, dont la dégradation est plus rapide. Ces hormones de synthèse (telles que les hormones de pilules contraceptives) sont largement suspectées de perturber la fonction endocrine des populations animales exposées, car difficilement éliminées par des traitements d'épuration classiques d'eaux usées (ex. chapitre I, *Conséquences potentielles résultant de l'exposition à des perturbateurs endocriniens*).



Mestranol



Ethinylestradiol



Diéthylstilbestrol

Figure 12 : Structures chimiques de quelques œstrogènes synthétiques

ii. Les composés pharmaceutiques et autres produits chimiques

Les substances synthétiques comprennent des produits chimiques conçus pour une utilisation industrielle en tant que solvants, surfactants ou lubrifiants (ex. diphenyles polychloré/PCB ou nonylphénol), ou retrouvés dans les plastiques (ex. bisphénol A), les pesticides (ex. methoxychlore, dichlorodiphényltrichloroéthane/DDT, lindane), les fongicides (ex. vinclozoline, benomyl), les substances médicamenteuses (ex. flutamide), et les produits de consommation courante (ex., cosmétiques, produits d'entretien). Cette catégorie inclut

également des sous-produits industriels, comme les dioxines suspectées d'influer sur le système endocrinien de l'Homme et de l'animal (Figure 13) [92]. Certains métaux lourds font également partie de cette classe de substances, dont le plomb, le cadmium, le mercure, le cuivre, ou le cobalt, qui présentent des activités œstrogéniques [93].

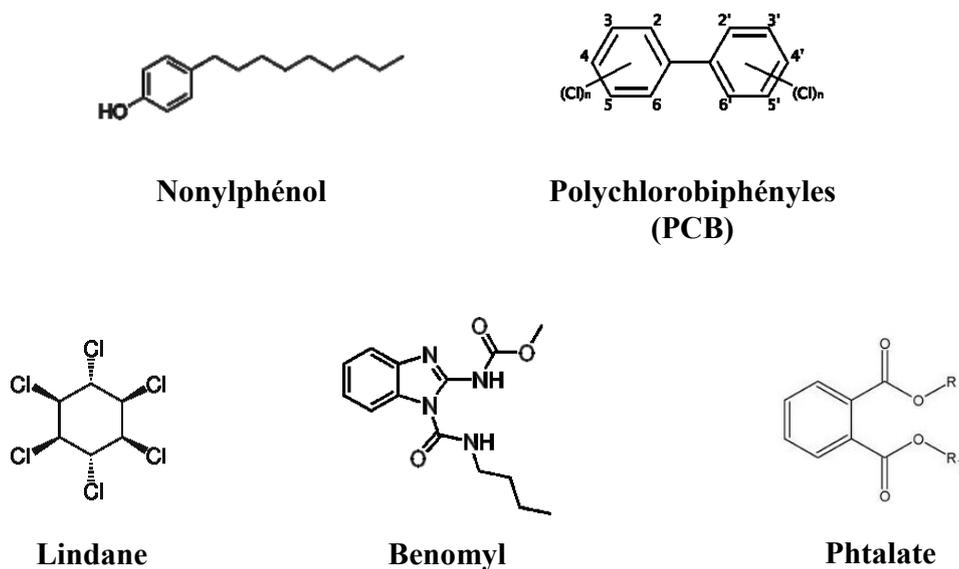


Figure 13 : Structures chimiques de quelques xéno-œstrogènes et composés synthétiques

En conclusion, de nature chimique très différente, les PE dits "synthétiques" peuvent se dissoudre dans les eaux ou, pour les plus hydrophobes, se fixer partiellement sur les sédiments et les matières en suspension. Ils sont retrouvés principalement dans la nourriture, les eaux potables polluées et quelques produits plastiques. Par conséquent, les PE sont actuellement omniprésents dans l'environnement. Ils ont même été retrouvés là où aucune substance chimique de propriétés similaires aux PE n'est utilisée, ni produite, tel que dans le lait de femmes Inuit en Arctique [94, 95].

C. Mécanismes d'action

Si les PE peuvent être classés suivant leur origine, ils peuvent également être répertoriés selon leur mécanisme d'action. Les PE vont de manière compétitive :

☞ **Imiter l'action des hormones endogènes** (effet agoniste) : la substance de structure similaire peut interagir directement avec le récepteur de l'hormone et l'activer, mimant l'action d'une hormone endogène et induisant des effets similaires, notamment par l'activation ou l'inhibition de transcription des gènes en aval (ex. PE à activité œstrogénique : DES, chlordécone, nonylphénol, éthinylestadiol, génistéine ; PE à activité androgénique : triclosan). [96, 97]

☞ **Inhiber des interactions entre les hormones et leurs récepteurs** (effet antagoniste) : la substance vient se fixer sur le récepteur sans l'activer, empêchant la liaison de l'hormone endogène à son récepteur. Il bloque ainsi le récepteur et son fonctionnement. Ceci affecte les fonctions cellulaires normales liées à l'hormone, puisque le PE empêche la fixation du complexe hormone/récepteur sur l'ADN, et donc l'activation des gènes cibles (ex. PE à activité anti-androgénique : linuron, vinclozoline, flutamide). [96, 97]

Jusqu'à présent, une grande partie des données connues sur le mécanisme d'action des PE porte sur leur capacité à interférer au niveau des récepteurs nucléaires hormonaux. En effet, les efforts de recherche ont été centrés sur ce point, mais d'autres mécanismes d'action s'avèrent tout aussi importants [75] :

☞ **Par action sur la synthèse, le transport, le métabolisme et l'excrétion des hormones**, modifiant les concentrations d'hormones endogènes [96, 98]. La substance peut avoir une action sur le métabolisme intracellulaire des glandes sécrétrices, en perturbant les cascades de biosynthèse des hormones elles-mêmes. Ces composés affectent potentiellement des enzymes spécifiques du métabolisme comme les sulfatases, les 5 α -réductases, les stéroïdes déshydrogénases ou l'aromatase, en stimulant ou inhibant leur activité. En particulier, certains PE sont capables d'affecter les enzymes de synthèse de la stéroïdogénèse, intervenant ainsi dans la synthèse des androgènes (cas de la dioxine et de certains antifongiques comme le kétoconazole) [99, 100]. D'autre part, quelques produits peuvent altérer la biodisponibilité des hormones endogènes, en modulant leur synthèse et leur catabolisme [101], ainsi qu'en interférant avec les protéines de transport, telles que la Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) [102].

☞ **En altérant le développement des récepteurs hormonaux et leurs fonctions** : la substance peut activer ou supprimer le développement d'un récepteur cellulaire, et donc altérer les activités hormonales [103]. Le bisphénol A est par exemple capable d'altérer la

régulation protéique du récepteur nucléaire et/ou de ses cofacteurs par la voie de dégradation du protéasome [98, 104].

☞ **En altérant les fonctions par des interactions avec les hormones** : la substance peut interagir avec une hormone et modifier le message issu de celle-ci, et ainsi altérer les fonctions cellulaires [96]. Par exemple, un PE peut interférer au niveau des récepteurs hormonaux en modulant le recrutement de coactivateurs ou corépresseurs nécessaires à leur action [98].

Pour la plupart des associations mises en évidence entre une exposition à un PE et des effets biologiques, les mécanismes d'action restent peu connus. Cependant, certains points importants peuvent être dégagés [26] :

☞ Une exposition à un PE pendant la vie fœtale, et plus précisément pendant la mise en place du système endocrinien, peut entraîner une perturbation permanente du système à l'âge adulte ;

☞ Selon la dose, les effets consécutifs à une exposition à un PE à l'âge adulte peuvent être compensés par des mécanismes d'homéostasie, et ainsi ne pas causer d'effets toxiques significatifs ou détectables ;

☞ Compte tenu des interférences possibles entre différentes composantes du système hormonal, les effets de PE peuvent se produire de façon imprévisible, dans des tissus cibles autres que ceux supposés être affectés.

Enfin, la complexité des voies endocrines rend possible une perturbation par un grand nombre de PE à différents niveaux de l'organisme. Cependant, les effets délétères des PE considérés à l'heure actuelle s'exercent principalement sur trois axes hormonaux : l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade, l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde et l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénales.

D. Conséquences potentielles résultant de l'exposition à des perturbateurs endocriniens

I. Effets sur la faune

Cette prise de conscience concernant les effets potentiels des PE sur le fonctionnement du système endocrinien est liée à des observations faites dans le milieu naturel. En effet, dans les années 1980 chez les animaux sauvages, de premières anomalies sur les organes reproducteurs, voire une diminution des populations, ont été observées. Ces réponses adverses seraient la conséquence d'un effet œstrogénique probablement déclenché par les PE présents dans l'environnement. Dès lors, un lien causal a pu être mis en évidence entre l'exposition aux PE, et les anomalies sur le développement ou la reproduction de différentes populations d'animaux sauvages.

On peut citer comme exemples connus :

☞ La masculinisation des femelles de certaines espèces de gastéropodes marins due au tributylétain (TBT). Cette substance toxique pour les algues entraine dans la composition de certaines peintures anti-salissures appliquées sur la carène des bateaux. Mais cette molécule s'avère être également extrêmement active sur les mollusques marins qui mangent les algues. Le bigorneau perceur y est particulièrement sensible. Ainsi, le développement d'un pénis chez les individus femelles a été responsable du déclin de populations locales dans le monde entier [105]. D'autre part, des populations entières de bulots ont disparu en mer du Nord à cause du TBT. Des troubles peu anodins ont été développés : imposex (masculinisation) qui serait conséquent à une inhibition de l'activité en aromatasase [106], et intersexualité (organes féminins partiellement "transformés" en organes sexuels masculins). Ces anomalies entraînent généralement une fertilité fortement réduite. [107, 108]

☞ Chez les rapaces exposés au pesticide DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), un amincissement de la coquille des œufs et un développement altéré des organes sexuels ont été observés, entraînant un fort déclin des populations. Des anomalies congénitales chez des oiseaux qui se nourrissent de poissons seraient directement liées à une exposition aux PCB (polychlorobiphényles). Cependant, la relation précise entre ces anomalies et une éventuelle perturbation endocrinienne sous-jacente n'est pas établie avec certitude [26].

☞ Le cas du micro-pénis chez les alligators, observé dans les années 1980 en Floride, a été largement décrit dans la littérature. Guillette *et al.* ont montré que les anomalies du développement et du fonctionnement de l'organe sexuel sont associées à un déversement massif de pesticides tels que le DDT, dans le lac d'Apopka en Floride aux États-Unis. La population d'alligators présente dans ce lac a diminué de façon importante en quelques années, accompagnée d'un déclin du taux d'éclosion d'œufs entre 1983 et 1988. [21-23]

☞ Certaines études ont également mis en évidence une augmentation anormale de grenouilles difformes en Amérique du Nord [26]. Les malformations des membres sont prédominantes avec des malformations des digitations (Figure 14) ou de la musculature, ainsi que des anomalies du système nerveux central et des yeux [109, 110]. En outre, McDaniel et ses collaborateurs ont récemment évalué l'incidence des PE chez les amphibiens vivant dans les étangs de ferme et les drains agricoles dans les zones du sud-ouest de l'Ontario. Ces animaux ont présenté des lésions histologiques au niveau des gonades. L'atrazine et le métolachlore, tous deux pesticides, ont été détectés dans la plupart des échantillons supérieurs à 1 mg/ml pour certains sites [111]. D'autres recherches sont nécessaires afin de s'assurer de l'implication des contaminants environnementaux dans les malformations observées chez ces amphibiens.



Figure 14 : Grenouille léopard (*Rana pipiens*) avec deux pattes surnuméraires : exemple de malformations sévères chez l'amphibien

☞ Chez les poissons vivant à proximité de certaines sources de contamination et dans les zones les plus contaminées, l'exposition à des déversements d'effluents industriels ou urbains entraîne des effets sur les organes reproducteurs [112]. Ainsi, des inductions de la synthèse de vitellogénine (protéine précurseur du jaune d'œuf, produite par les poissons femelles ovipares) ont été rapportées chez des poissons mâles exposés à des effluents d'eaux domestiques usées ; le phénomène d'hermaphrodisme semble également plus fréquent dans

cette population [113]. De même, certaines anomalies du développement des gonades ont été corrélées à cette contamination, telles qu'un retard à la maturité sexuelle [112], et l'apparition d'intersexualité [71].

L'homéostasie chez les poissons et leurs différentes fonctions physiologiques sont étroitement régulées par un système sophistiqué, sous l'influence de la photopériode, du pH et de la température. Au travers de nombreux travaux, il a été démontré que toutes les étapes qui mènent de la synthèse des hormones stéroïdes, jusqu'à la réponse de la cellule cible, peuvent être altérées par les polluants chimiques [26]. Les poissons, cibles des PE et révélateurs de leurs effets, permettent ainsi de surveiller l'environnement ; ils représentent un modèle clé pour les travaux de recherche en endocrinologie.

II. Effets sur l'Homme

L'un des seuls cas clairement établi de perturbation endocrinienne sur l'Homme est celui du diethylstilbestrol (DES), médicament prescrit dans les années 1950-1960 pour éviter l'avortement spontané. Cette molécule découverte en 1938 a montré une activité œstrogénique bien plus importante que toutes celles synthétisées auparavant. Ce n'est qu'au début des années 1970 que le monde scientifique et médical a réussi à faire le lien entre le DES et une série d'anomalies du tractus génital [4, 5]. Ainsi, les filles exposées *in utero* ont développé des anomalies du vagin ou de l'utérus, et des formes inhabituelles de cancer de l'utérus au moment de la puberté. Des études épidémiologiques ont également pu démontrer une augmentation du risque de développement d'hypospadias, de cryptorchidies, de kystes épидидymaires et d'inflammation testiculaire, ainsi qu'une baisse de la quantité et de la qualité de sperme chez les fils de femmes traitées au DES pendant leur grossesse [114, 115]. Enfin, sur la base d'études toxicologiques, l'association entre une exposition au DES au cours de la vie fœtale et des malformations de l'appareil reproducteur fut très vite confirmée (cf. chapitre III, *Exemples de perturbateurs endocriniens induisant une toxicité au niveau de l'appareil reproducteur mâle et du testicule*). Ainsi, le cas tristement célèbre du DES a révélé que le placenta humain n'est pas une barrière impénétrable aux xénobiotiques, que l'exposition aux PE de la mère peut avoir des effets inattendus sur la progéniture, même des décennies plus tard, et que cette exposition peut avoir des conséquences graves sur la santé, incluant la survenue de cancers. L'utilisation du DES a entraîné un problème majeur de santé publique

qui reste d'actualité, plus de trente ans après la fin de l'utilisation de cette molécule chez l'Homme.

L'exposition délibérée des sujets humains à des substances toxiques pour observer les effets nocifs qui pourraient en résulter est impossible pour raison éthique. De ce fait, la majeure partie des données empiriques qui établissent un lien entre des PE et des effets délétères sur la santé, proviennent d'études sur des populations humaines qui ont été accidentellement exposées à des substances toxiques, ou sur des petits groupes de population qui sont exposés à cause de leur travail ou de leur régime alimentaire. Une perturbation du système endocrinien a été relevée dès les années 1940 chez l'Homme, quand il a été observé que les pilotes d'avions d'épandage présentaient une diminution du nombre de spermatozoïdes liée à leur exposition au DDT. Depuis, plusieurs cas sporadiques observés sur des populations en contact avec d'autres PE ont été suspectés, tels que :

☞ L'accident de Seveso en 1976, en Italie, lors duquel d'importantes quantités de dioxines ont été déversées dans l'environnement, s'est traduit quelques années plus tard par une hausse de l'incidence d'hypospadias chez les enfants dont les parents avaient été exposés [116] ;

☞ Une étude réalisée en Belgique en 2002, a démontré une maturation sexuelle retardée chez les adolescents vivant dans des zones contaminées par les PCB et les dioxines [117] ;

☞ Une augmentation de la fréquence des anomalies génitales (cryptorchidie et hypospadias) a été rapportée chez les Norvégiens nés dans des fermes où des pesticides avaient été utilisés [118], ainsi que dans des zones d'utilisation intensive de pesticides (zones agricoles) en Espagne [119] ;

☞ Vers la fin des années 1970, un syndrome associant des troubles neurologiques et une infertilité a été observé chez des ouvriers fabriquant des pesticides, comme le chlordécone (Képone) [120].

Cette liste n'est pas exhaustive. Il apparaît que les PE ont une influence durant tous les stades de la vie (prénatal, néonatal, adolescence et adulte). Enfin, il est également important de préciser que les effets des PE ne se limitent pas seulement à des atteintes au niveau du processus de reproduction : les PE nuisent également au développement, à l'immunité, et induiraient la formation de tumeurs chez certaines espèces.

7. Evaluation de la sécurité des produits chimiques pour l'Homme : détection des perturbateurs endocriniens

A. Généralités

Les études de toxicologie interviennent généralement après la découverte, l'identification de la famille chimique et la sélection de molécules candidates, et précèdent les processus d'homologation et de mise sur le marché des produits. Toute substance peut avoir des effets néfastes étant donné que c'est "la dose [qui] fait le poison" (Paracelse) [121]. L'objectif de la toxicologie est de garantir que de tels effets ne se produiront pas dans les conditions normales (recommandées) d'utilisation des produits.

Afin d'évaluer les risques encourus par l'Homme, les limites d'exposition sont souvent basées sur les données issues d'études de toxicité sur des animaux de laboratoire [122]. L'approche traditionnelle de l'évaluation du risque repose sur le concept qu'il existe une dose seuil à partir de laquelle commence à se manifester des effets toxiques qui deviennent de plus en plus sévères, en fonction de l'augmentation de la dose et de la durée d'administration. En deçà de ce seuil, aucun effet adverse ou toxicologique n'est décelable. L'évaluation du risque est donc dépendante de la caractérisation des effets indésirables, observés dans des études de toxicité, sur des animaux de laboratoire, de sorte que les doses sans effet ou en anglais, les "No Observed (Adverse) Effect Levels" (NO(A)ELs), les "Lowest Observed (Adverse) Effect Levels" (LO(A)ELs), les "No Observed (Adverse) Effect Concentrations" (NO(A)ECs) et/ou les "Lowest Observed Effect Concentrations" (LOECs) puissent être identifiés. En particulier, la NOAEL est définie comme la plus forte dose testée d'un produit chimique, pour laquelle il n'y a statistiquement ou biologiquement pas d'augmentation significative de la fréquence ou de la gravité d'un effet indésirable, chez les individus d'un groupe exposé, par rapport aux individus d'un groupe témoin approprié [122]. A l'inverse, la LOAEL est la dose la plus faible à laquelle a été observé un effet indésirable ou toxique, chez les animaux du groupe exposé à une substance chimique par rapport au groupe témoin. (Figure 15)

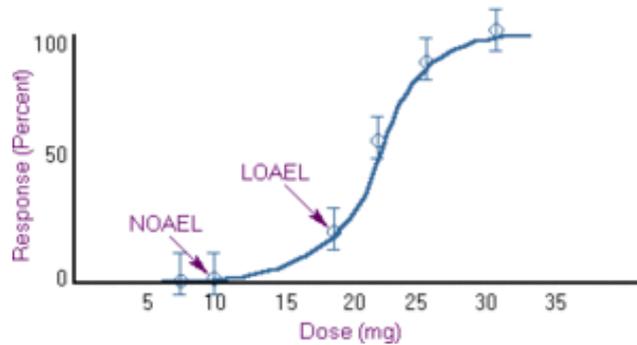


Figure 15 : Courbe de dose-réponse
(D'après Nordberg *et al.*, 2007)

L'observation des données épidémiologiques et expérimentales a montré la nécessité de détecter la présence de produits responsables de la perturbation du système endocrinien. En effet, la persistance de substances chimiques dans notre environnement et l'ensemble des effets observés sur la reproduction en font une question de santé publique. Des tests en laboratoire *in vitro* et *in vivo* ont donc été mis au point pour détecter les substances chimiques ayant des propriétés de PE, mais ne sont toutefois pas requis par les autorités pour leur mise sur le marché.

B. Tests de criblage et modèles in vitro

La lourdeur des essais *in vivo* ne permet de tester qu'un nombre limité de substances. Les tests *in vitro* sont plus rapides, et permettent d'établir des priorités dans les substances à évaluer *in vivo*. En effet, ils sont capables de déterminer l'activité de perturbation endocrinienne d'un composé chimique via un mode spécifique d'action. Les essais décrits ci-dessous sont validés ou en cours de validation par des laboratoires internationaux, et font partie intégrante d'un programme de criblage des PE réalisé par les Etats-Unis (EPA Endocrine Disruptor Screening Program). D'autres tests sont également disponibles (ex. E-Screen : croissance de cellules MCF-7 ou ZR-75 stimulée par les œstrogènes). Il convient toutefois d'interpréter avec réserve les effets et résultats observés *in vitro*, non confirmés *in vivo*.

I. Tests de liaison au récepteur

Les tests de liaison à un récepteur particulier sont utilisés pour détecter les molécules capables d'interagir directement avec un récepteur aux hormones stéroïdes, comme les récepteurs α et β aux œstrogènes ou le récepteur aux androgènes [123-125]. Ces tests permettent de mesurer l'affinité de liaison du récepteur pour les ligands testés. Ils sont basés sur l'étude de la compétition entre la molécule testée non radiomarquée, et un ligand standard radiomarké pour le récepteur. Dans ces essais, la fixation d'une substance test non radiomarquée est démontrée par sa capacité à réduire la quantité d'œstrogènes/androgènes de référence radiomarkés se liant aux récepteurs. La capacité de liaison de nombreux xénobiotiques aux récepteurs œstrogéniques et androgénique a pu ainsi être démontrée. Le défaut principal de ces tests est qu'ils ne fournissent aucune information sur l'activité hormonale du composé testé : ils ne permettent pas de faire la différence entre une activité agoniste ou antagoniste, et ne renseignent pas sur une possible activation du récepteur [126].

II. Tests d'activation transcriptionnelle

Le dosage du produit d'un gène rapporteur est un test qui sert à déceler l'activité transcriptionnelle provoquée par la liaison du produit chimique au récepteur hormonal. Ce test est basé sur le développement de cellules de mammifères ou de levures génétiquement modifiées. Les cellules sont transfectées de façon transitoire ou stable avec un plasmide vecteur portant les séquences ADN d'un élément de réponse à une hormone ("*Hormone response element*" ou HRE), couplé à un gène rapporteur comme celui de la β -galactosidase ou de la luciférase. Ce plasmide peut également contenir la séquence ADN codant pour un récepteur hormonal spécifique (par exemple le récepteur aux œstrogènes ou aux androgènes). Cette séquence est indispensable pour les cellules de mammifères ou de levures qui n'expriment pas le récepteur étudié. L'exposition des cellules à une molécule active vis-à-vis du récepteur hormonal visé provoque une liaison de cette molécule à ce récepteur. Le complexe ligand-récepteur subit alors une translocation vers le noyau où il se fixe sous forme de dimère, qui interagira avec le HRE, entraînant une modulation de la transcription et de l'expression du gène rapporteur. La cellule va donc synthétiser la luciférase par exemple, qui pourra être mise en évidence par une mesure de luminescence après ajout de substrats adéquats. Les substances à effet agoniste vont stimuler cette émission de lumière, tandis que

les substances à effet antagoniste vont éteindre la réponse en présence du ligand naturel, dans les deux cas de manière dose-dépendante. De nombreux tests avec gène rapporteur (basés sur des cellules eucaryotes ou des levures) sont décrits dans la littérature pour les hormones stéroïdes et les dioxines [127-130].

III. Test de stéroïdogénèse sur des cellules H295R

Les cellules H295 sont des lignées immortelles provenant d'un carcinome adrénocortical malin, développé chez une femme. Il s'avère que la lignée cellulaire H295R possède la capacité de synthétiser la plupart des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse [131], ainsi que les hormones sexuelles : testostérone, œstradiol et progestérone. Cette méthode d'essai cellulaire *in vitro* est utilisée pour détecter des modifications dans la synthèse des hormones stéroïdes, sous l'influence d'une substance donnée [132, 133]. La concentration d'hormones est déterminée à l'aide de kits du commerce (ELISA par ex.). Enfin, d'un point de vue moléculaire, il est également possible de mettre en évidence une altération de l'expression de certains gènes codant pour les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse [134, 135] (cf. chapitre IV, *Résultats, article 2*).

IV. Test de l'activité de l'aromatase

Cette approche *in vitro* permet, à partir de microsomes issus de placenta humain [136], de détecter les substances qui inhibent l'activité de l'enzyme aromatase. Brièvement, les microsomes sont incubés en présence de propylène glycol, d'androstènedione marquée au tritium ($[^3\text{H}]\text{ASDN}$), de NADPH, de tampon avec ou sans le produit chimique à tester. L'activité de l'aromatase est mesurée en comptant la radioactivité du $^3\text{H}_2\text{O}$ formé lors de la conversion du $[^3\text{H}]\text{ASDN}$ en estrone. Ce test permet ainsi d'analyser la capacité du produit chimique à inhiber ou non l'activité de l'aromatase. Aussi, son principal défaut est de ne pas permettre la mesure d'une activation de l'aromatase. Enfin, d'autres méthodes peuvent également être citées permettant l'évaluation de l'activité aromatase, dont des approches faisant intervenir des lignées cellulaires de mammifères (ex. MCF-7 [137, 138], ou cellules dérivées de la granulosa tumorale [139]).

C. Etudes in vivo réalisées en toxicologie : détection d'éventuels perturbateurs endocriniens pour l'Homme

L'US-EPA ainsi que l'OCDE ont mis en place des programmes visant à améliorer l'évaluation des PE. Ils ont pour objectif de diffuser les informations et coordonner les activités, d'élaborer de nouvelles lignes directrices pour les essais et de réviser les lignes directrices existantes visant à détecter les PE, ainsi que d'harmoniser les méthodes de caractérisation des dangers et des risques.

Des validations internationales ont, entre autres, été réalisées ces dernières années pour quatre tests *in vivo* permettant de détecter d'éventuels PE chez le rat. Le but est de développer des tests de criblage robustes, reproductibles et pertinents, capables de détecter les composés ayant une activité œstrogénique (ethinylœstradiol [140]), anti-œstrogénique (ex. tamoxifène [141]), androgénique (17alpha-méthyltestostérone [142]) ou anti-androgénique (ex. flutamide [143, 144]).

I. Test utéro-trophique

Ce test est un test *in vivo* de dépistage à court terme, ayant pour but de détecter les substances à activité principalement œstrogénique. Il repose sur les variations du poids de l'utérus induites par les substances testées. La sensibilité du test utéro-trophique exige un dispositif d'essai dans lequel l'axe hypothalamo-pituitaire-ovarien n'est pas fonctionnel, se caractérisant par de faibles niveaux d'œstrogènes endogènes. Cela assure des poids utérins de référence peu élevés, et un éventail le plus large possible de réponses aux œstrogènes administrés. Les rongeurs femelles remplissent ces conditions dans deux cas : (i) femelles immatures, après sevrage et avant la puberté ; (ii) jeunes femelles adultes ovariectomisées, passé le délai nécessaire à la régression des tissus utérins. La substance d'essai est administrée pendant au moins 3 jours, quotidiennement [127]. Un protocole standard international a été mis en place après plusieurs phases de validation [145-147].

II. Test Hershberger

Le test de Hershberger est un essai de dépistage *in vivo* à court terme des agonistes ou antagonistes d'androgènes. Ce test repose sur les variations de poids induites par les substances testées, de cinq tissus sexuels accessoires mâles androgéno-dépendants : la prostate ventrale, la vésicule séminale, le muscle bulbo-caverneux, les glandes de Cowper, voire le gland du pénis dans le cas de rats matures. La sensibilité du test de Hershberger est possible grâce à l'utilisation de mâles immatures ou castrés chez lesquels, la production d'androgènes endogènes est minimale. Dans ce contexte, l'administration d'androgènes durant 10 jours est nécessaire à l'initialisation (mâles immatures) ou à la restauration (mâles castrés) de la croissance des tissus sexuels accessoires. Ainsi, une augmentation de poids statistiquement significative d'au moins deux organes cibles, dans les groupes recevant la substance d'essai comparés au groupe témoin, indique un résultat positif pour la substance d'essai relatif à l'activité androgénique potentielle. A l'inverse, la substance est identifiée comme un anti-androgène lorsqu'elle induit une réduction de la croissance des tissus sexuels accessoires, après co-administration avec un composé à activité androgénique, quand comparée au groupe témoin approprié [127]. A l'heure actuelle, les tests pratiqués sur animaux immatures ou castrés sont en cours d'évaluation au niveau de l'OCDE, afin de s'assurer que ceux-ci soient capables de détecter des composés ayant une activité androgénique ou anti-androgénique [142, 143, 148, 149].

III. Tests pubertaires

Ces tests servent à identifier *in vivo* les produits chimiques qui ont le potentiel d'interagir avec le système endocrinien (essentiellement les gonades), en identifiant les effets sur le développement pubertaire chez le rat femelle ou mâle intact(e) juvénile/péripubertaire. Les rats sont traités au jour 22 ou 23 post-natal, durant une période de 20 ou 30 jours selon qu'il s'agisse de rats femelles ou mâles, respectivement. Ces tests permettent de détecter des produits chimiques ayant des activités androgéniques/œstrogéniques, ou anti-androgéniques/anti-œstrogéniques, ainsi que des agents qui modifient le développement pubertaire. Le principe de ce test consiste entre autres, à analyser l'âge auquel les rats

présentent les premiers signes de puberté, que sont la séparation du prépuce chez les mâles, et l'ouverture vaginale chez les femelles.

IV. Etudes de toxicité après administrations répétées

☞ **L'étude de 28 jours (OCDE, ligne directrice 407 améliorée)** apporte des informations sur les risques potentiels d'un composé sur la santé, à la suite d'une exposition répétée. Ainsi, l'administration de doses répétées est effectuée pendant 28 jours, principalement par voie orale, mais parfois aussi par voie dermale. Les animaux utilisés dans ce test sont sexuellement matures. Cet essai permet le recueil de nombreuses données, comme l'évaluation du poids et l'histologie des tissus et glandes endocrines (tels que ovaires, thyroïde, hypophyse, testicules), les taux sériques des hormones, le déroulement des cycles œstraux, ou la quantité et la qualité spermatique. Enfin, les objectifs de ce type d'études sont : (i) d'identifier le ou les organe(s) cible(s) et les effets critiques/adverses, (ii) d'apporter des informations sur le choix des doses pour les études subchroniques et chroniques, (iii) et de participer à la détermination d'une dose sans effet (ex. NOAEL) [127].

Les validations de ces quatre tests, coordonnées par l'OCDE, ont permis de définir les conditions particulières de réalisation de ces études, mais également de montrer leur sensibilité sur plusieurs molécules de référence. La reproductibilité de ces tests a été démontrée par les travaux provenant de plusieurs laboratoires, et l'ensemble de ces validations a donné lieu à de nombreuses publications. On peut noter que le flutamide a souvent été utilisé comme molécule de référence, notamment dans l'évaluation du test de Hershberger, du test sur rats immatures et de la ligne directrice 407 améliorée [150-152].

Par ailleurs, le dossier d'homologation d'une substance chimique contient une multitude de données supplémentaires provenant de diverses études, dont certaines renseignent également sur les propriétés potentielles de PE. Dans ce contexte, on peut entre autres citer :

☞ Les études de toxicité subchroniques, qui consistent en l'administration de doses répétées pendant 90 jours, et les études de toxicité à long terme. Ces dernières sont de deux types : (i) les études chroniques ayant pour objectif de caractériser le profil toxicologique d'une substance après une administration prolongée (12 mois) ; et (ii) les études de cancérogénèse permettant d'observer les animaux au cours de la majeure partie de leur durée de vie (24 mois). Les objectifs de ce type d'études sont d'identifier le ou les organe(s) cible(s), les effets critiques et signes de toxicité, ainsi que de contribuer à la définition d'une dose sans effet (NOAEL). Certains composés aux propriétés de PE plus subtiles, causant des effets délétères après exposition prolongée (ex. iprodione), peuvent ainsi être identifiés lors de tels essais. Dans le contexte des PE, les organes d'intérêt sont : l'hypophyse, la thyroïde, les surrénales, et les gonades [127].

☞ Les études de toxicité de la reproduction : l'objectif de ces études est de fournir une évaluation satisfaisante d'un niveau de dose sans effet adverse, et une caractérisation des effets potentiels sur la gestation, la reproduction, la parturition, la lactation, et le développement embryo-fœtal et postnatal, comprenant la croissance et le développement sexuel. Ces études sont de trois types : (i) l'étude de toxicité pour le développement prénatal ; (ii) l'étude de toxicité pour la reproduction sur une génération ; (iii) l'étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations [127].

D. Outils utilisés en toxicologie

L'identification de la toxicité d'une molécule chimique s'effectue classiquement par des études éthiques de toxicologie chez l'animal de laboratoire. La toxicologie est étudiée grâce à des paramètres conventionnels ou standards, et à l'aide de nouvelles approches de type " -omiques ". (Figure 16)

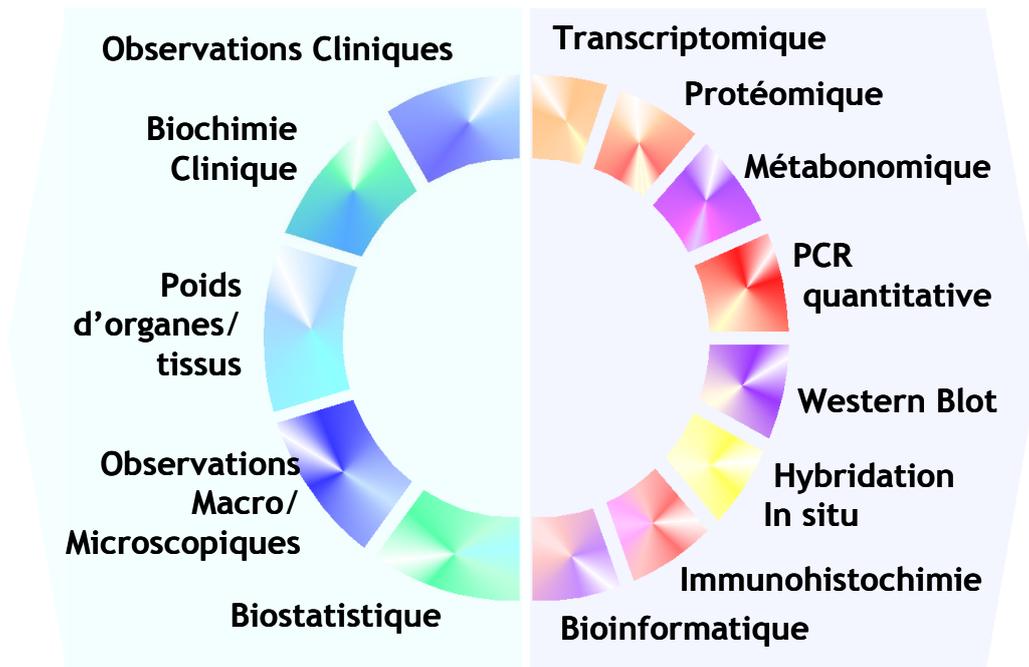


Figure 16 : Outils et méthodes utilisés en toxicologie

I. Outils conventionnels

Les toxicologues évaluent les risques potentiels résultant de l'exposition à un composé par l'observation de paramètres conventionnels tels que les signes cliniques, la consommation alimentaire, les variations du poids de l'individu et de ses organes, les modifications macroscopiques et microscopiques de tissus cibles, les dosages biochimiques et hormonaux. Deux principaux domaines sont distingués en toxicologie constituant l'ensemble des évaluations des paramètres conventionnels :

☞ **Biologie clinique** : les analyses biochimiques (ou chimie clinique), hématologiques et urinaires sont réalisées. Au sein de la chimie clinique sont effectuées les analyses de paramètres sanguins (telles que les dosages hormonaux), ou d'autres fluides corporels. Les résultats de biologie clinique sont corrélés aux observations histopathologiques pour une interprétation globale des données.

☞ **Anatomo-pathologie** : les poids d'organes rapportés au poids corporel sont analysés, et les modifications macroscopiques et microscopiques des organes sont étudiées. L'histopathologie est la discipline médicale destinée à faire un examen par l'étude

microscopique des tissus. C'est l'outil le plus utilisé en anatomo-pathologie en routine pour le diagnostic clinique du cancer et d'autres maladies. L'échantillon de tissu prélevé est préparé par les méthodes classiques de l'histologie : colorants adéquats, immunohistochimie etc.

II. Nouveaux outils "-omiques"...

Les toxicologues évaluent les risques potentiels, résultant de l'exposition à un composé, par l'observation de paramètres conventionnels (décrits ci-dessus). Ces approches donnent des indications sur les conséquences de l'exposition à ce produit chimique, mais n'apportent aucune explication sur la cause de la toxicité, sur les mécanismes d'action de la molécule, ou sur les conséquences moléculaires que peut induire le toxique.

Depuis quelques années, les avancées du séquençage entier du génome de nombreux organismes modèles (Levures, Nématode, Drosophile...), ou encore du génome Humain [153, 154], de la souris [155], et du rat [156], ont été accompagnées par le développement de nouvelles technologies, permettant une analyse au niveau moléculaire. Ces approches dites "-omiques " sont à l'heure actuelle de plus en plus prisées dans le domaine de la toxicologie. Elles se définissent comme suit (Figure 17) :

☞ La **génomique** correspond à l'étude du génome : séquences codantes, non codantes, promoteurs, séquences des microARN, des ARN anti-sens, et leur importance dans la régulation des gènes. La génomique repose principalement sur le séquençage.

☞ La **transcriptomique** ou génomique fonctionnelle (détaillée dans le paragraphe III ci-dessous) correspond à l'étude de l'expression des gènes ou des microARN, dans le but de constituer une signature multigénique. La transcriptomique repose sur les méthodes de RT-qPCR, SAGE et de puces à ADN.

☞ La **protéomique** correspond à l'étude quantitative et qualitative des protéines, s'appuyant sur les technologies de western blot, d'électrophorèse bidimensionnelle (migration en deux dimensions) et de spectrométrie de masse (MALDI-TOF, ESI).

☞ La **métabolomique** (ou métabonomique) correspond à l'étude quantitative et qualitative des métabolites, basée sur la spectrométrie de masse (MS-MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

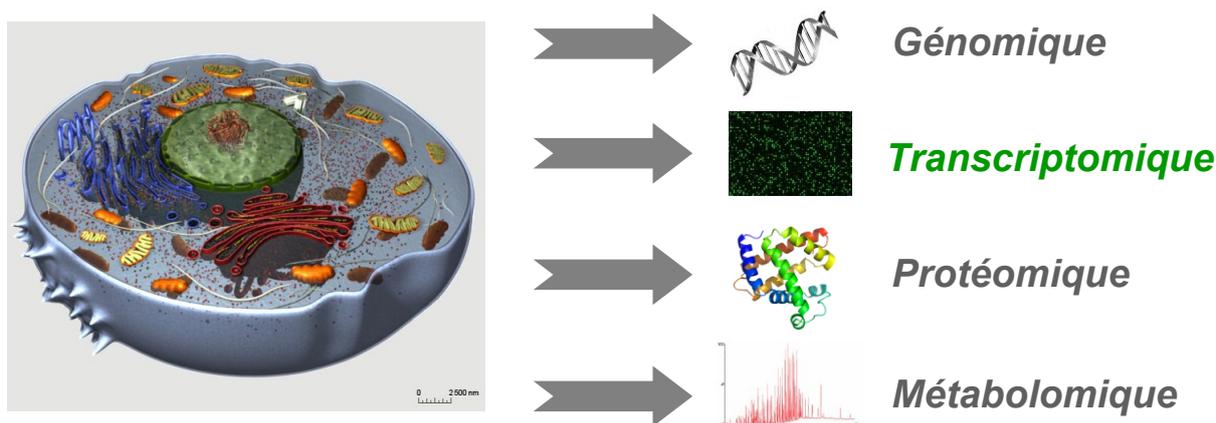


Figure 17 : Les nouveaux outils "-omiques "

III. Dont la toxico-transcriptomique

Le lien entre la recherche toxicologique classique et la transcriptomique a permis l'émergence de la toxico-transcriptomique. Cette discipline étudie les interactions complexes entre la structure et l'activité du génome en réponse à des xénobiotiques. Les principales avancées technologiques dans ce domaine incluent les puces à ADN [157]. Cette technologie permet l'analyse simultanée du niveau d'expression de milliers de gènes, dans différentes conditions physiologiques. En conséquence, l'étude de l'effet global d'un produit chimique au niveau moléculaire, et l'identification des événements moléculaires (perturbation de voies métaboliques) impliqués dans les modifications phénotypiques observées par des méthodes conventionnelles de toxicologie, sont aujourd'hui possibles. Ce type d'approche est basé sur le concept que tout effet toxicologique est la conséquence d'une modification du niveau d'accumulation d'un certain nombre de transcrits. En effet, si le génome est identique dans chacune des cellules d'un organisme donné, en revanche les transcrits, eux, peuvent avoir un niveau d'accumulation spécifique différencié dans le temps (propre à un stade du développement), dans l'espace (propre à un type cellulaire, tissulaire ou organique) ou/et être caractéristique d'un état donné (sain, pathologique ou en réponse à un stimulus particulier).

L'étude du niveau d'accumulation des transcrits à l'aide de puces à ADN consiste à caractériser et quantifier les produits d'expression de l'ADN, correspondant aux ARNm, les séquences actives du génome. Le principe de la puce à ADN repose sur la technique d'hybridation entre une sonde et une cible. Des oligonucléotides (fragments d'ADN simples brins) spécifiques de différents gènes ou d'EST (*Expressed Sequence Tags*), sont greffés sur

un support solide (lame de verre) et constituent les sondes, dont le rôle est de détecter des cibles présentes dans un mélange complexe à analyser. Ces dernières correspondent aux ARNm extraits de cellules, tissus ou organismes entiers, qui sont converties en ARN complémentaires (ARNc) marqués avec des fluorophores spécifiques. Les signaux d'hybridation sont détectés par fluorescence, et quantifiés à l'aide d'un scanner. Les données recueillies après l'application de la technologie des puces sont codifiées par la bio-informatique, à l'aide de technologies de pointe, de manière à faciliter le "data mining" c'est-à-dire l'extraction rapide des paramètres pertinents stockés dans une base de données [157]. L'analyse qualitative et quantitative du transcriptome repose donc sur une technologie pluridisciplinaire intégrant la micro-électronique, la chimie des acides nucléiques, et l'analyse d'images. (cf. chapitre *Matériels et méthodes*)

Les applications de la toxico-transcriptomique peuvent être employées au sein de deux domaines qui sont intimement liés : la toxicologie mécanistique et la toxicologie prédictive. La première se concentre sur l'évaluation des réponses biologiques et biochimiques, dans un cas précis de toxicité, et permet également le recueil d'informations nécessaires à l'évaluation des risques du composé en question. La seconde fait référence au domaine de la toxicologie porté sur l'identification d'un composé potentiellement toxique, et fait intervenir la notion de signature génique et de biomarqueurs. En effet, sur la base d'analogies avec les profils d'expression de produits de référence, il est alors possible de prédire l'effet potentiellement toxique d'une nouvelle molécule [158, 159].

☞ **Toxicologie mécanistique pour les PE, exemple.** L'effet toxique des PE est aujourd'hui bien caractérisé par l'utilisation d'approches conventionnelles, mais leurs mécanismes d'action sont encore mal connus. En conséquence, de plus en plus d'études tentent d'élucider les effets des PE sur l'appareil reproducteur mâle au niveau moléculaire. Par exemple, en comparant le profil d'expression génique du testicule de rats traités *in utero* avec du dibutyl phtalate (DBP) ou avec du flutamide, Shultz et ses collaborateurs ont montré que ces deux composés modulent de façon spécifique, différentes étapes de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig. Le flutamide bloque l'activation du récepteur aux androgènes (AR) ; alors que le DBP induit une diminution de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de la testostérone, qui *in fine* réduit l'activation de l'AR en raison de la faible concentration en testostérone intratesticulaire [160].

➤ **Toxicologie prédictive pour les PE, exemple.** Yamada *et al.* par une double approche (test de Hershberger et étude du transcriptome de la prostate des rats traités) ont pu clairement montrer que le benomyl, fongicide de type benzimidazoles, n'agissait pas en perturbant le système endocrinien : la comparaison des profils d'expression génique induits par ce fongicide avec les profils obtenus après traitement au flutamide et au DDE ont révélé une très faible proportion de gènes communément modulés par ces trois composés, alors qu'un nombre conséquent de gènes étaient à la fois affectés par les traitements au flutamide et au DDE [161].

Enfin, les changements d'expression des gènes sont généralement plus sensibles que les effets mesurés par les outils traditionnels de toxicité [162]. De ce fait, il apparaît également possible d'utiliser la toxico-transcriptomique comme une façon d'explorer le comportement de la courbe "effet-dose" à des niveaux de dose avoisinant la NOAEL, et ainsi actualiser les processus d'évaluation du risque au sein d'études de toxicologie.

CHAPITRE II – L'APPAREIL REPRODUCTEUR MALE

1. Généralités

L'appareil génital mâle est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et du dépôt de celui-ci dans les voies génitales de la femelle. Comme chez les autres mammifères, l'appareil génital mâle chez le rat comprend deux gonades, un système de conduction et des glandes accessoires. [163, 164]

La Figure 18 montre une dissection de la cavité abdominale d'un rat mâle. Sur cette photographie, une partie du système uro-génital à savoir la vessie, les vésicules séminales, les testicules et les épидидymes, est visible.

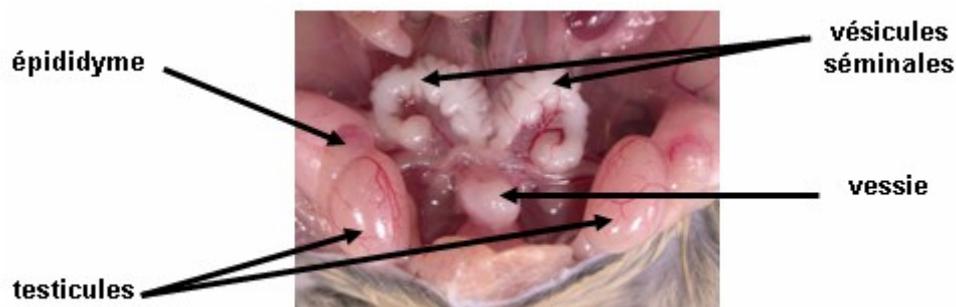


Figure 18 : Photographie de la cavité abdominale d'un rat mâle montrant une partie des organes composant le système uro-génital
(D'après Thèse de Vernet Nadège, Strasbourg I, 2006)

Plus précisément, l'appareil reproducteur mâle (Figure 19) est constitué :

☞ de deux **testicules** (ou gonades mâles) qui assurent deux fonctions essentielles : la production des gamètes mâles ou spermatozoïdes assimilée à une fonction exocrine, et la synthèse/sécrétion d'hormones stéroïdes (androgènes, essentiellement la testostérone) constituant la fonction endocrine ;

☞ du **tractus génital** formé des voies spermatiques intra- et extra-testiculaires (tubes droits et *rete testis*, canaux ou cônes efférents, épидидyme, canal déférent, canal éjaculateur) qui assurent le transport des spermatozoïdes ;

☞ des **glandes annexes** (vésicules séminales, prostate et glandes de Cowper) qui secrètent le liquide de transport et de nutrition des spermatozoïdes, constituant le sperme ;

☞ du **tractus uro-génital** représenté par l'urètre (prostatique, périnéal et pénien), s'ouvrant à l'extérieur par le méat urinaire.

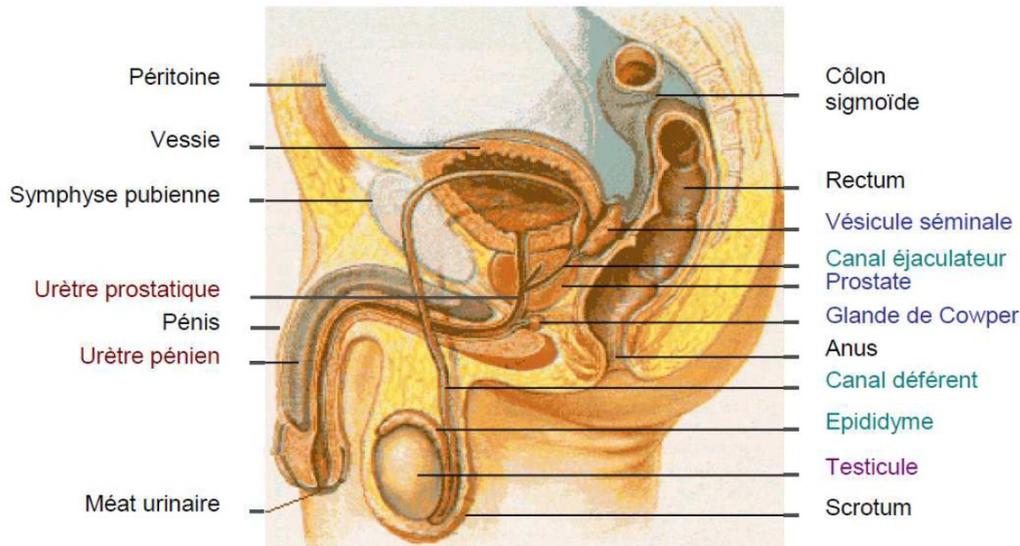


Figure 19 : Structure interne de l'appareil reproducteur masculin chez l'homme
(Modifiée d'après <http://kcampbell.bio.umb.edu/Oct01gifs/Malerepr.gif>, Kenneth L. Campbell)

Les testicules, les épидидymes, les vésicules séminales et la prostate sont des organes dits hormono-dépendants. Ceci signifie que leur développement et leurs fonctions sont contrôlés de manière étroite par les hormones, principalement les androgènes et les œstrogènes.

2. Le testicule

Le testicule (Figure 20) est un organe pair de forme ovale localisé dans la bourse, dont le revêtement cutané est le scrotum. Le scrotum a pour fonction de maintenir les testicules à une température inférieure de 2 °C à celle du reste du corps, condition indispensable pour permettre la production des spermatozoïdes. Chaque testicule est suspendu dans le sac scrotal par le cordon spermatique. Ce dernier est constitué du canal déférent, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des fibres nerveuses.

Le testicule est recouvert de deux tuniques. La tunique superficielle ou tunique vaginale, est formée de deux feuillets et dérive du péritoine. La tunique la plus profonde est l'albuginée, une capsule de tissu conjonctif fibreux. Des projections de l'albuginée forment les cloisons du testicule, qui divisent celui-ci en 200 à 300 compartiments appelés lobules. Chaque lobule renferme de un à quatre tubes séminifères. Ce sont dans ces tubules que se divisent et se différencient les cellules germinales jusqu'à la formation des spermatozoïdes.

Les tubes séminifères contournés de chaque lobule convergent vers un tube séminifère droit qui transporte les spermatozoïdes jusqu'au *rete testis*, un réseau de canaux situé dans la partie postérieure du testicule. Les spermatozoïdes quittent le testicule par les canalicules efférents et pénètrent dans l'épididyme, qui épouse la surface du testicule. C'est au niveau de l'épididyme, grâce à l'activité sécrétoire des cellules qui le constituent, que les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité et deviennent féconds.

Le tissu conjonctif lâche qui recouvre les tubes séminifères contournés renferme les cellules interstitielles du testicule ou cellules de Leydig. Ces cellules synthétisent les androgènes (en particulier la testostérone), et les libèrent dans le liquide interstitiel où elles baignent. Ce sont donc deux populations cellulaires tout à fait distinctes qui produisent les spermatozoïdes et les hormones dans le testicule.

Les testicules sont irrigués par les artères testiculaires, qui naissent de l'aorte abdominale. Les veines testiculaires drainent les testicules. Elles forment un réseau appelé plexus pampiniforme autour de l'artère testiculaire. Ce plexus absorbe la chaleur du sang artériel afin de le rafraichir avant son entrée dans le testicule. Il s'agit d'un moyen pour maintenir la basse température nécessaire à la physiologie normale des testicules. [165]

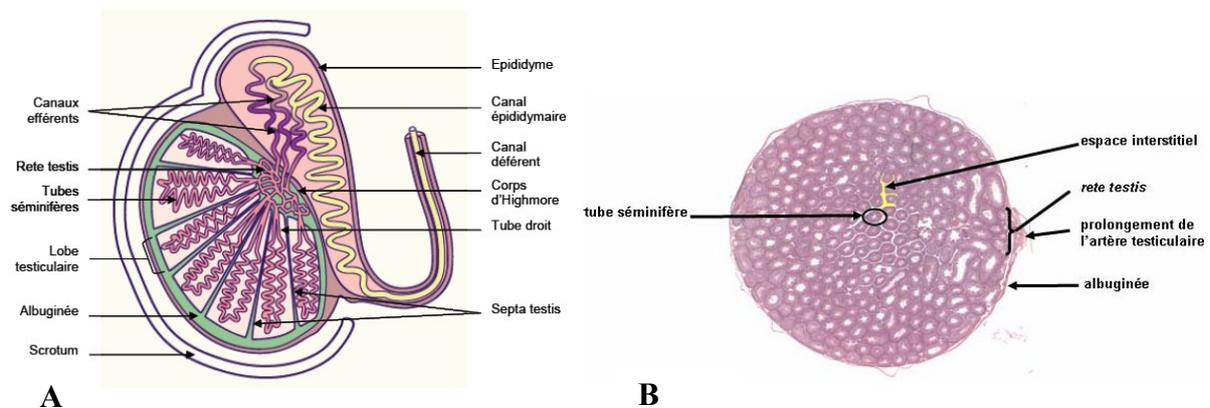


Figure 20 : Coupes internes du testicule
A. Coupe longitudinale ; B. Coupe transversale

Afin de comprendre le fonctionnement du testicule, la fonction exocrine sera tout d'abord présentée via la description de la structure du tube séminifère, ainsi que du processus de spermatogenèse qui se déroule en son sein. L'implication des cellules de Sertoli sera également abordée compte tenu de leur rôle majeur dans le soutien des cellules germinales au cours de la spermatogenèse. Dans une seconde partie, la fonction endocrine sera exposée au travers de la description des espaces interstitiels et en particulier des cellules de Leydig, siège de la stéroïdogénèse. Nous en profiterons pour détailler le métabolisme des androgènes, et leurs actions au niveau de l'organisme par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique : le récepteur aux androgènes.

A. Compartiment tubulaire et fonction exocrine

I. La spermatogenèse au sein des tubes séminifères

i. Structure des tubes séminifères

Les tubes séminifères sont de longues structures à l'intérieur des testicules, délimitées par une gaine tubulaire mince (lamina propria) formée de la membrane basale, de fibroblastes, de fibres de collagène et de cellules myoïdes [166]. Ces dernières cellules, de par leur activité contractile, participent à l'évacuation des spermatozoïdes non mobiles dans le testicule [167].

L'épithélium séminifère est formé par l'association de deux types de cellules majoritaires : les cellules germinales à différents stades de leur développement qui participent au processus de spermatogenèse, et les cellules de Sertoli, cellules somatiques jouant le rôle de cellules de soutien aux cellules germinales. Au niveau de l'épithélium séminifère, les cellules germinales logées dans les invaginations des cellules de Sertoli, sont hautement organisées et suivent une maturation dite "centripète". Les cellules les moins différenciées sont situées du côté basal, c'est-à-dire en périphérie du tube séminifère ; tandis qu'au cours de leur maturation les cellules différenciées se dirigent vers le côté apical de ce tube, c'est-à-dire vers la lumière (Figure 21). [166, 168]

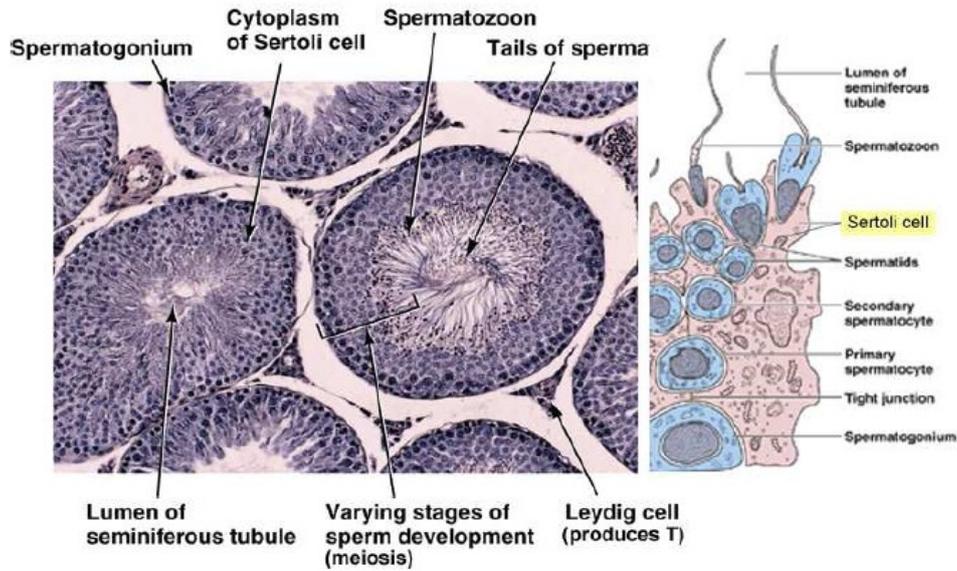


Figure 21 : Structure des tubes séminifères

(D'après <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/image/figure20f.jpg>)

ii. *La spermatogenèse*

⌘ Phases de la spermatogenèse

La spermatogenèse consiste en une série d'évènements qui se déroulent dans les tubes séminifères et mènent à partir de cellules germinales diploïdes, les spermatogonies souches, à la production des gamètes mâles haploïdes, les spermatozoïdes. Sur le plan fonctionnel, la spermatogenèse peut être scindée en trois phases : la phase proliférative, la phase méiotique et la spermiogenèse. Ces phases sont représentées Figure 22, et impliquent des types de cellules germinales différents. [166, 168, 169]

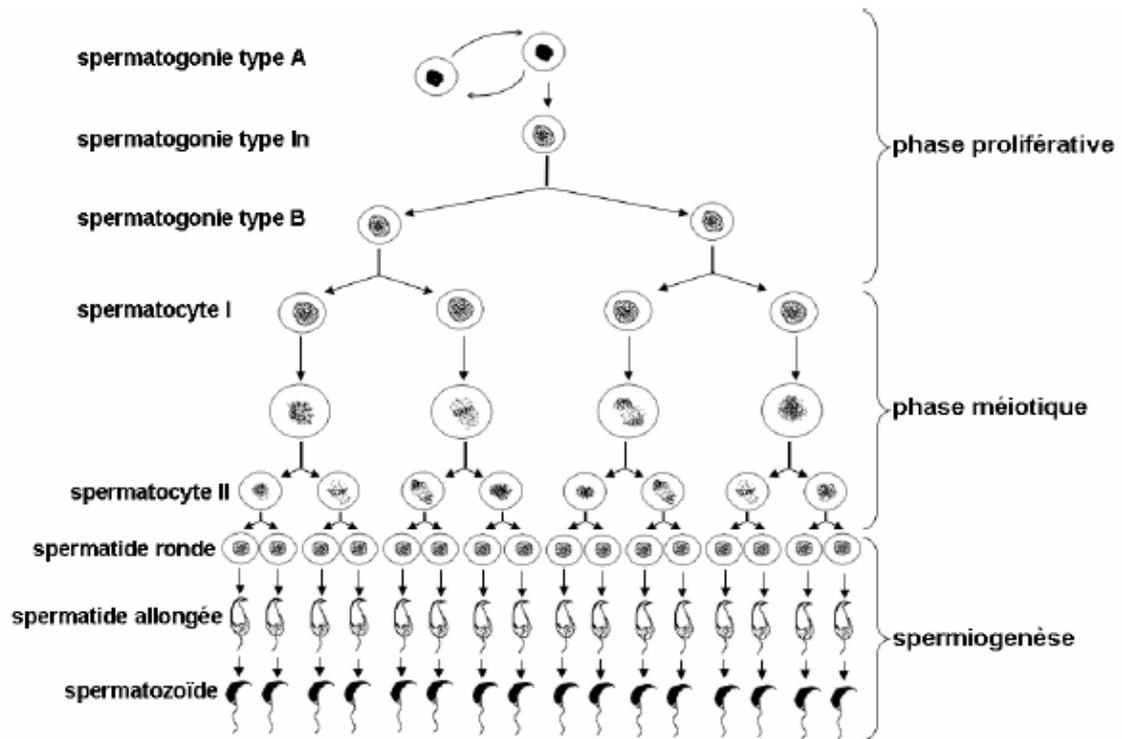


Figure 22 : Phases de la spermatogenèse chez le rat ; types de cellules germinales concernés
(D'après Thèse de Vernet Nadège, Strasbourg I, 2006)

☞ **La phase proliférative.** C'est la première phase de la spermatogenèse, reposant sur une mitose classique à partir de cellules germinales souches : les spermatogonies. Parmi ces cellules germinales initiales se distinguent les spermatogonies A, dont un certain nombre se divise par mitose mais ne se différencie pas, permettant ainsi le maintien et le renouvellement de l'épithélium séminifère. Une partie de ces cellules cesse de se multiplier, et se différencie en spermatogonies de type B, qui vont subir l'évolution. La division mitotique finale des spermatogonies B donne naissance aux spermatocytes primaires préleptotènes. [170, 171]

☞ **La phase méiotique.** La production de gamètes chez les mammifères requière le processus de méiose, constitué d'une succession de deux divisions cellulaires. Une première division méiotique (méiose I) ou division réductionnelle, permet de passer de spermatocytes primaires (spermatocytes I) diploïdes ($2n$ chromosomes, 2 chromatides) à des spermatocytes secondaires (spermatocytes II) haploïdes (n chromosomes, 2 chromatides). Elle comporte une prophase I au cours de laquelle les chromosomes homologues doubles de chaque paire apparaissent sous forme de longs filaments (stade leptotène), s'alignent (stade zygotène) puis se raccourcissent, et s'épaississent (stade pachytène). Durant cette prophase, les échanges/recombinaisons chromosomiques assurent le brassage des gènes [172]. La

métaphase I et l'anaphase I se réalisent ensuite pendant lesquelles se séparent les chromosomes homologues, puis la télophase I. Une seconde division méiotique (méiose II) ou division équationnelle, a lieu après une intercinèse très brève, au cours de laquelle chaque chromatide se répartit dans les cellules filles grâce à la division des centromères. A l'issue de la télophase II, deux cellules filles à n chromosomes et une chromatide sont obtenues : les spermatides rondes. [173, 174]

☞ **La spermiogenèse.** Cette phase de différenciation se divise en 19 étapes chez le rat. Chaque étape est associée à un aspect caractéristique de l'acrosome, une formation adhésive coiffant le noyau élaborée par l'appareil de Golgi. Il renferme notamment des enzymes protéolytiques nécessaires à la fécondation [175, 176]. Au cours de cette phase, les spermatides rondes immatures se différencient en spermatozoïdes : en effet, chaque spermatide possède le nombre de chromosomes adéquat (n) pour la fécondation, mais n'est pas motile. Elle doit encore subir un processus de profilage qui lui fera perdre la majeure partie de son cytoplasme superflu, la dotera d'une queue, et réorganisera ses organites cytoplasmiques (condensation du noyau qui va occuper la tête du spermatozoïde, formation de l'acrosome et regroupement des mitochondries au niveau de la pièce intermédiaire) [177]. Le spermatozoïde ainsi constitué se divise en trois régions, la tête, la pièce intermédiaire et la queue, qui sont respectivement ses régions génétique, métabolique et locomotrice. Au cours de la spermiogenèse, la tête des spermatides fait face au compartiment basal des tubes séminifères, et la dernière étape consiste en la translocation des spermatozoïdes de la partie adluminale du tube séminifère vers la lumière. Cette phase de libération durant laquelle les spermatozoïdes matures se détachent de la cellule de Sertoli dans la lumière du tube séminifère, est appelée spermiation [166]. Ils sont alors transportés par le liquide séminal à travers les tubes droits.

☞ Cycle de la spermatogenèse

La durée du cycle spermatogénique correspond au temps nécessaire pour qu'une spermatogonie ayant entamé sa méiose parvienne au stade de spermatozoïde mature. Un cycle de spermatogenèse dure 74 jours chez l'homme, 35 chez la souris et 53 chez le rat [178]. Les cycles spermatogéniques sont répétés, formant des vagues séquentielles et ordonnées de spermatogenèse. Plusieurs générations de spermatogenèse sont enroulées en spirale, les unes sur les autres [179]. En périphérie du tubule et en début de spirale se trouvent les

spermatogonies ; à la fin de la spirale, les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière tubulaire. La Figure 23 permet de comprendre pourquoi on rencontre toujours plusieurs générations de cellules sur une section de tube.

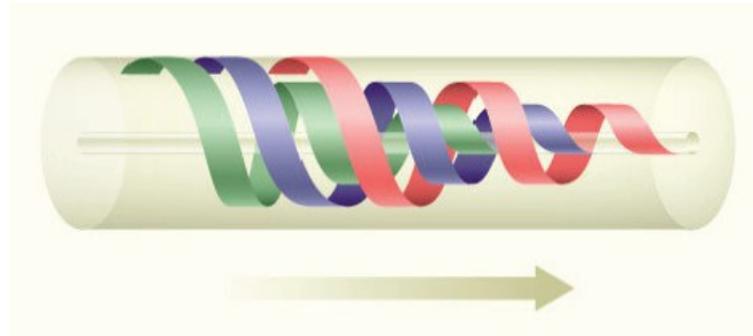


Figure 23 : Représentation de trois vagues successives de générations de spermatogénèse
(D'après <http://www.med.uottawa.ca/>)

Un cycle de l'épithélium séminifère est divisé en stades spermatogéniques, définis par les associations spécifiques entre cellules de Sertoli et cellules germinales à différentes phases de maturation ; c'est grâce à l'état de différenciation des cellules germinales qu'il est possible de distinguer ces stades [180]. Le nombre de stades peut varier d'une espèce à l'autre [178] : 12 (I à XII) chez la souris, 14 (I à XIV) chez le rat et 6 (I à VI) chez l'homme. La Figure 24 présente les différents stades morphologiques de la spermatogénèse décrits chez le rat. Sur une section de testicule, les quatorze stades de spermatogénèse ne sont pas également représentés : ceux qui durent le plus longtemps sont généralement observés.

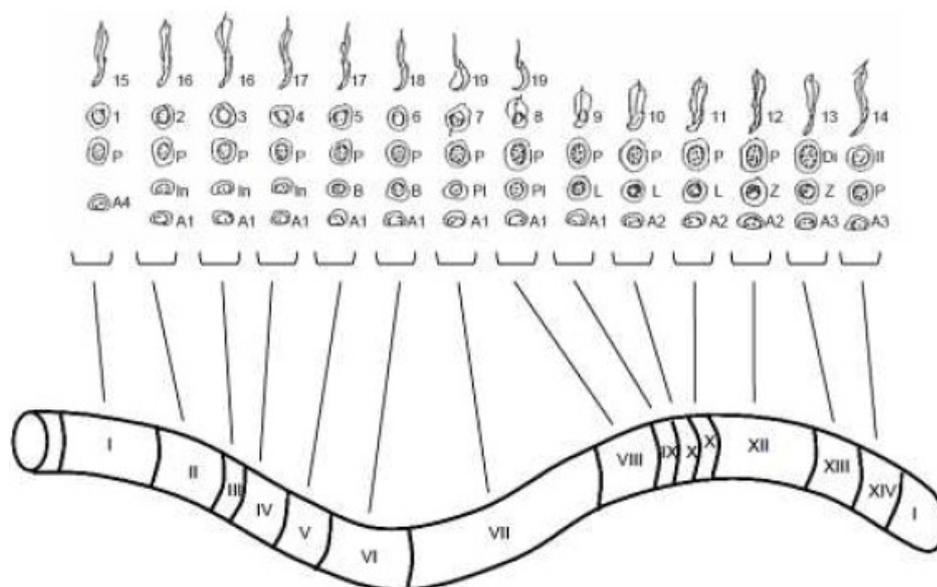


Figure 24 : Représentation schématique des stades spermatogéniques chez le rat
(D'après Thèse de Léo Meunier, Lyon I, 2010)

Chez le rat, l'ensemble des stades spermatogéniques se déroulent de façon séquentielle le long de l'axe longitudinale d'un tube séminifère. De ce fait, un même stade occupe toute la section transversale d'un tube séminifère (Figure 24). En revanche, chez l'homme, les cellules germinales au même stade de différenciation sont arrangées le long d'un tube séminifère selon un patron hélicoïdal ou spiralé, et progressent vers la lumière du tube [181].

En conséquence, chez la plupart des animaux, l'initiation de la spermatogenèse a lieu à des intervalles réguliers dans une zone donnée, la durée de chaque étape est constante, et dans chaque zone, de nouvelles séries d'initiation commencent pendant la spermiogénèse des précédentes. De ce fait, le processus de spermatogenèse ne se faisant pas simultanément en tous points du tube séminifère, la production de spermatozoïdes a lieu de façon permanente et continue.

Il a également été établi qu'un phénomène de dégénérescence des cellules germinales s'effectuait lors de la spermatogenèse. L'un des rôles majeurs de l'apoptose est de permettre l'élimination des cellules dangereuses, anormales ou devenues inutiles, et de maintenir l'homéostasie au sein des tissus et des organes [182, 183].

II. La cellule de Sertoli

i. Généralités et structure de la cellule de Sertoli

C'est en 1865 qu'Enrico Sertoli décrivit pour la première fois les cellules qui portent aujourd'hui son nom. Dès 1871, ce chercheur italien reconnut la fonction nourricière et sécrétoire de ces cellules somatiques, fonction dont le rôle central est aujourd'hui connu dans le contrôle du processus spermatogénique.

Les cellules de Sertoli occupent 17 à 19% du volume de l'épithélium séminifère chez le rat adulte. Ce sont des cellules cylindriques s'étendant de la lame basale jusqu'à la lumière du tube séminifère. On en dénombre environ $4 \cdot 10^7$ par testicule chez le rat adulte [184]. Leur forme irrégulière, via l'existence de nombreuses expansions cytoplasmiques ramifiées, permet d'enserrer les cellules germinales en développement. Les cellules germinales et les cellules de Sertoli sont donc extrêmement enchevêtrées et en communication permanente. Le ratio est d'une cellule de Sertoli pour 50 cellules germinales au sein du testicule de rat adulte. Les cellules de Sertoli voient leur structure varier au cours du cycle de l'épithélium séminifère, de

manière à optimiser l'adhérence des cellules germinales avec lesquelles elles sont en contact, et ainsi permettre leur mouvement. La Figure 25A illustre la structure d'une cellule de Sertoli au stade V de l'épithélium séminifère. Les points d'ancrage où se logent les cellules germinales sont indiqués par des flèches. Deux types de cellules de Sertoli peuvent être décrits : Sertoli de type A présentant des cryptes cytoplasmiques dans lesquelles se trouvent les spermatides matures prêtes à être relarguées dans la lumière du tube séminifère, et Sertoli de type B chez lesquelles les cryptes sont peu visibles voire absentes.

Le noyau de la cellule de Sertoli, situé du côté basal du tube séminifère, est irrégulier avec de profonds replis, mais tend à prendre une forme ovale (Figure 25B). Sa chromatine est fine et son nucléole bien visible, caractéristique de cellules à activité métabolique élevée. Le cytoplasme contient du réticulum endoplasmique lisse et rugueux, des mitochondries, des lysosomes, des gouttelettes lipidiques, un appareil de Golgi bien développé et un riche cytosquelette (vimentine, actine, microtubules). [184, 185]

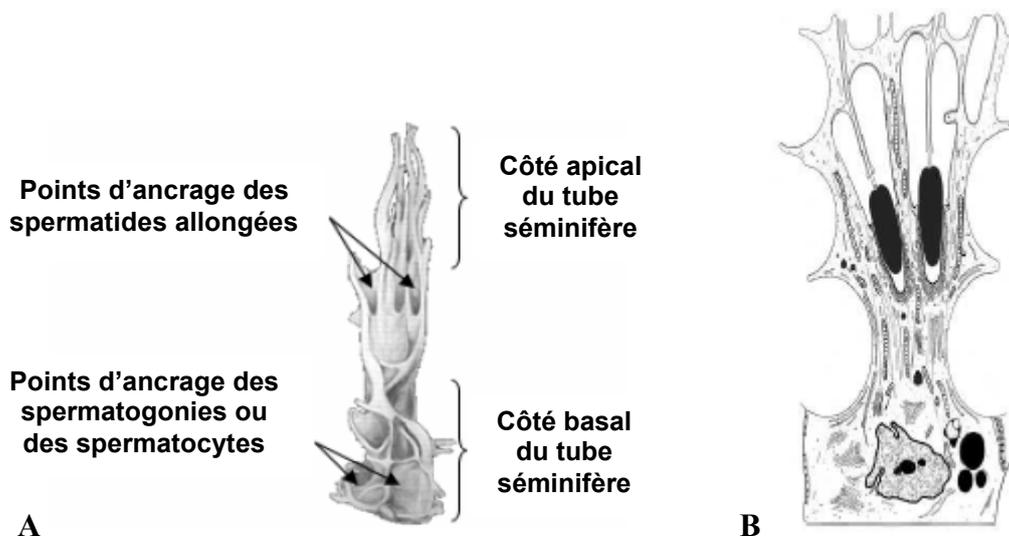


Figure 25 : Structure de la cellule de Sertoli

(D'après A- Russell *et al.*, 1993, cellule de Sertoli au stade V de l'épithélium séminifère ; B- D'après Hess & França, 2005 ; nucléole visible au sein de la cellule de Sertoli)

ii. *Fonctions de la cellule de Sertoli, cellule de soutien pour la spermatogenèse*

Les fonctions majeures des cellules de Sertoli au niveau de l'épithélium séminifère, contrôlées par l'hormone hypophysaire FSH, sont toutes en lien avec leur rôle de cellules de soutien des cellules germinales :

☞ **Rôle de structure** : les cellules de Sertoli enveloppent les cellules germinales en développement et constituent un support physique, type "échafaudage", permettant le maintien des cellules germinales dans le compartiment adluminal. Elles participent également à la constitution de la matrice extracellulaire en entraînant la formation de jonctions cellulaires spécialisées, et maintiennent l'architecture de l'épithélium séminifère [185, 186] ;

☞ **Rôle dans la barrière hémato-testiculaire** : le contact entre les faces basolatérales des cellules de Sertoli forme un complexe de jonctions continues essentiellement composé de jonctions serrées. Au niveau du tiers basal de l'épithélium séminifère, elles créent une véritable barrière avec le flux sanguin : c'est la barrière hémato-testiculaire [187, 188]. Cette barrière sépare le tube séminifère en deux compartiments, le compartiment basal et le compartiment apical. Les cellules du compartiment basal sont en contact avec le milieu extérieur du tube séminifère, alors que les cellules du compartiment apical en sont isolées. Les spermatogonies de type A et B, ainsi que les spermatocytes I jusqu'au stade préleptotène, sont localisés dans le compartiment basal (Figure 26). Les jonctions serrées s'ouvrent afin que les spermatocytes leptotènes rejoignent le compartiment apical. Enfin, toutes les autres cellules plus matures sont localisées dans ce dernier compartiment : spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes (Figure 26). [189]

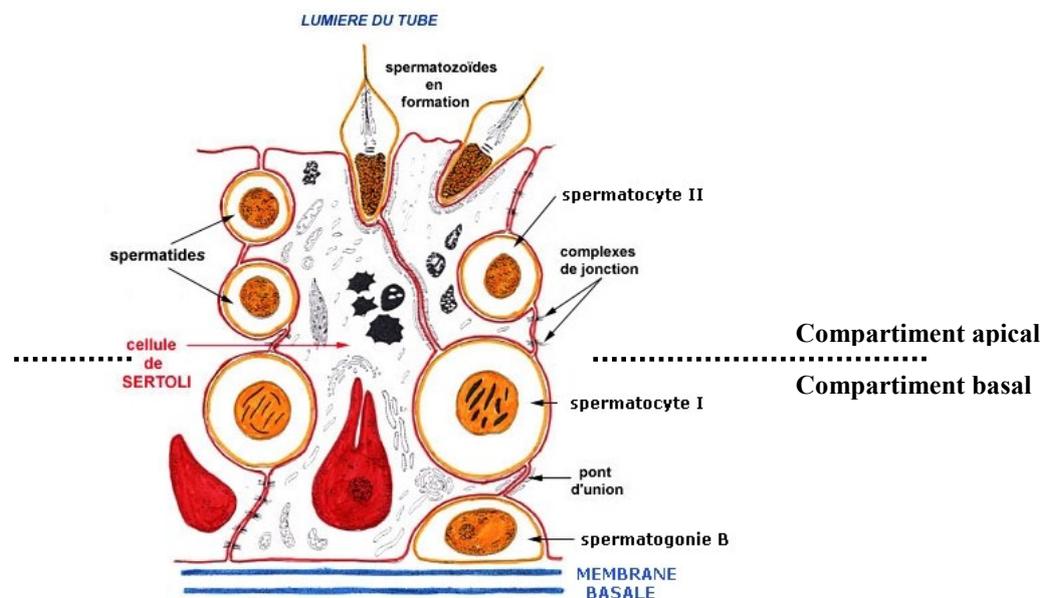


Figure 26 : Schéma d'une cellule de Sertoli : étroite interaction avec les cellules germinales
(Modifiée d'après <http://e-sante.futura-sciences.com>, Nicole Vacheret)

La mise en place des jonctions serrées formant la barrière hémato-testiculaire permet de maintenir un environnement spécialisé et adéquat pour assurer le développement des cellules germinales. En conséquence, les cellules de Sertoli sont dans l'obligation de délivrer un ensemble de molécules nécessaires à la croissance et à la différenciation des cellules germinales [190]. La barrière possède un rôle de filtration et de régulation : par perméabilité sélective, elle contrôle l'accès des substances dans le compartiment adluminal du tube. Les substances provenant des espaces interstitiels passent donc obligatoirement par le cytoplasme des cellules de Sertoli. Cette barrière est perméable à l'eau, aux acides aminés, aux ions et aux sucres. Elle empêche le passage des grosses molécules hydrophiles comme les protéines. Par la mise en jeu d'un mécanisme de diffusion facilitée, elle permet la pénétration intra-tubulaire des stéroïdes. La barrière hémato-testiculaire joue donc deux rôles : elle contrôle le transit des composants du sang vers le compartiment adluminal, et elle protège l'organisme des réactions immunitaires que pourraient induire les cellules germinales, porteuses d'antigènes spécifiques. Cette notion est importante, car le système immunitaire général ne tolère pas les antigènes des spermatozoïdes, et peut alors développer des anticorps anti-spermatiques pouvant être responsables d'une orchite (inflammation des testicules) auto-allergique, et donc d'une stérilité [191] ;

✎ **Rôle dans la phagocytose et la pinocytose** : les cellules de Sertoli sont capables de phagocytose, et interviennent dans l'élimination des cellules germinales en dégénérescence lors de la spermatogenèse [192], telles que les corps résiduels issus des spermatozoïdes lors de la spermiation [193]. De plus, elles sont capables de pinocytose ou d'endocytose au niveau apical [194]. Enfin, elles suppriment les complexes de jonctions qui sont sans cesse renouvelés ;

✎ **Rôle dans le mouvement des cellules germinales et dans la spermiation** : les cellules de Sertoli jouent un rôle dans le mouvement des cellules germinales en développement, ainsi que dans le relargage des spermatides matures de l'épithélium séminifère dans la lumière du tube (spermiation). Par des modifications au niveau de leur cytoplasme, elles vont promouvoir l'encapsidation individuelle des spermatides par des processus cytoplasmiques, l'expulsion des spermatides allongées des cryptes Sertoliennes dans la lumière du tube, le relargage des têtes de spermatides de la région apicale des cellules de Sertoli, le détachement, et la rétention des spermatozoïdes [195] ;

☞ **Rôles sécrétoires** : Les cellules de Sertoli possèdent une activité de sécrétion essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse, qui leur permet de communiquer directement et simultanément avec les autres cellules, leur conférant un rôle prépondérant dans le contrôle de l'activité de l'épithélium séminifère. Les cellules de Sertoli sécrètent notamment le fluide testiculaire, des nutriments, des protéines ainsi que différents facteurs de croissance [185] :

✓ **Fluide testiculaire** : il joue un rôle important dans la distribution des éléments nutritifs aux cellules germinales en maturation, dans le relargage des spermatozoïdes et dans le transport des facteurs régulateurs enrôlés dans la communication entre les deux parties du tube séminifère. Il permet l'acheminement des spermatozoïdes du tube séminifère vers le *rete testis*, les canaux efférents et l'épididyme.

✓ **Nutriments** : les prolongements cytoplasmiques des cellules de Sertoli apportent des nutriments (acides aminés, glucides, lipides, vitamines et ions métalliques) aux cellules germinales en développement, isolées par les jonctions serrées [185]. Le lactate est le substrat énergétique le plus utilisé par les cellules germinales. Pour cela, les cellules de Sertoli captent le glucose dans le sang, le transforment en pyruvate par glycolyse, puis en lactate grâce à une enzyme spécifique : la lactate déshydrogénase [196]. Elles assurent également le transport des déchets métaboliques vers les systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques entourant les tubes séminifères.

✓ **Protéines et facteurs de croissance** : les cellules de Sertoli sont les cellules pivots autour desquelles s'organise toute l'activité fonctionnelle du testicule. Elles synthétisent environ soixante protéines différentes nécessaires à la spermatogenèse [190, 197]. L'ABP (*androgen binding protein*) fut la première à être caractérisée, permettant le transport de la testostérone depuis la partie basale vers les cellules germinales [198]. Les protéines sécrétées par les cellules de Sertoli peuvent être regroupées en quatre grandes classes :

- Les protéines de transport et de liaison sont responsables de l'acheminement de nutriments, vitamines et hormones vers les cellules germinales. Parmi celles-ci, on peut citer des protéines liant les métaux (transferrine, ceruloplasmine), les lipides (clusterine, saposine) ou les hormones (protéines de liaison aux androgènes ou à l'acide rétinoïque) [199, 200] ;
- Les protéases (cathepsine-D, -L et -S, métalloprotéases) et inhibiteurs de protéases (cystatin C) jouent un rôle dans les processus de remodelage tissulaire, au cours de la spermiation par exemple, ou nécessaires à la migration des cellules germinales vers la lumière du tube séminifère. Pour cela, les protéases digèreraient les complexes de jonctions formées entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales [185, 201] ;

- Les composants de la membrane basale, tels que le collagène et la laminine [202], contribuent à l'intégrité de la structure de l'épithélium séminifère [185] ;
- Les facteurs de croissance et autres facteurs de régulation cellulaire incluent les facteurs de croissance transformant, les interleukines, le MIS (*Müllerian inhibiting substance*) et l'inhibine. Certains d'entre eux sont capables de contrôler la prolifération des spermatogonies ainsi que les productions hormonales [185]. En effet, une régulation mettant en œuvre l'inhibine, l'activine et la follistatine permet d'interférer sur le niveau de FSH [203-205] :

› L'inhibine B est l'isoforme majeure sécrétée chez le mâle, principalement par les cellules de Sertoli en réponse à la FSH. La concentration de cette hormone constitue un indicateur de l'état de la spermatogenèse. Lorsque le nombre de spermatozoïdes est élevé, la sécrétion d'inhibine augmente, réprimant directement la synthèse/libération de FSH par l'adénohypophyse, et inversement. La synthèse d'inhibine B serait également dépendante du nombre de cellules de Sertoli présentes ;

› Les différentes isoformes d'activine dont l'activine A produite par les cellules de Sertoli, ont la capacité de stimuler la sécrétion de FSH au niveau de l'adénohypophyse ;

› La follistatine est synthétisée par les cellules de Sertoli, les cellules germinales et les cellules pituitaires. Elle est capable de se lier à l'activine, et de neutraliser ses effets en prévenant sa fixation au récepteur. De ce fait, la follistatine est capable d'inhiber la sécrétion de FSH par les cellules hypophysaires.

III. Contrôle endocrinien de la spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus cyclique complexe comprenant des divisions mitotiques et méiotiques, ainsi qu'une différenciation terminale. Elle se déroule dans le tube séminifère, et elle est sous le contrôle très précis de gonadotrophines hypophysaires et de facteurs locaux.

i. Contrôle par les hormones

⌘ Les gonadotrophines hypophysaires

Des rats hypophysectomisés présentant une perte de FSH, de LH, et par voie de conséquence de testostérone, présentent un arrêt de la spermatogenèse au niveau méiotique (perte du nombre de spermatides rondes et allongées) [206]. Ceci démontre que la FSH tout comme la LH sont nécessaires au maintien de la spermatogenèse.

☞ **FSH.** Dans le testicule, les récepteurs de la FSH sont localisés au niveau des cellules de Sertoli. La FSH agit sur ces cellules cibles, stimulant la spermatogenèse. Précisément, son intervention au niveau du récepteur active la protéine CREB, qui initie à son tour la transcription de gènes essentiels à la différenciation des cellules germinales au niveau de la cellule de Sertoli [207]. Parmi ces gènes se trouvent les proto-oncogènes *c-fos* et *jun-B*, l'*α-inhibine*, et l'*abp* dont les produits vont agir sur les cellules germinales [208], ainsi que d'autres gènes dont *Fabp5*, *Tesc*, *Scara5*, et *Aqp5* [209]. Des pathologies humaines ainsi que des études de mutation génétique ont été rapportées, précisant le rôle de la FSH dans la spermatogenèse :

Le cas de deux hommes possédant une mutation au niveau du gène *fsh* codant la sous-unité β (la sous-unité α étant commune à la FSH et LH) a été publié, pour lesquels azoospermie et testicules de taille réduite ont été observés [210, 211]. Un homme homozygote pour une mutation inactivant le récepteur à la FSH n'a présenté ni azoospermie, ni infertilité absolue, malgré de nombreux défauts au niveau de la spermatogenèse [212]. Chez la souris, des mutations affectant la sous-unité β de la FSH, ainsi que le *KnockOut* du récepteur à la FSH (FORKO), ont permis de démontrer que la FSH est essentielle au maintien de la taille testiculaire, du volume des tubes séminifères, ainsi que du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité [213, 214]. Enfin, les souris surexprimant la FSH sont infertiles, malgré une spermatogenèse et une différenciation testiculaire normales [215].

Finalement, une récente étude de mutagenèse a établi les effets directs de la FSH sur la spermatogenèse, démontrant : (i) son rôle principal dans le contrôle du nombre de cellules de Sertoli [216] ; (ii) son implication dans l'augmentation du nombre de spermatogonies et l'entrée de ces cellules en méiose ; et (iii) son absence d'effet direct dans l'achèvement de la méiose [217].

☞ **LH.** La LH (récepteurs présents au niveau des cellules de Leydig) joue également un rôle important dans la maturation sexuelle mâle et la fertilité. Un exemple clinique a démontré que

l'hypogonadisme d'un homme de 30 ans, relié à un retard de puberté et à une infertilité, était corrélé à une absence de LH circulante. Cet homme présentait une mutation anti-sens sur le gène codant pour la sous-unité β de la LH, mutation qui abroge l'hétérodimérisation et la sécrétion de cette hormone. Un traitement par l'hCG (hormone chorionique gonadotrope) a finalement permis l'augmentation du taux de testostérone circulante, provoquant une virilisation associée à une concentration normale des spermatozoïdes [218, 219]. Par ailleurs, il a été rapporté que l'inactivation complète du récepteur à la LH chez des patients induisait des dysfonctionnements testiculaires comme les pseudohermaphrodismes, associés à une hypoplasie des cellules de Leydig [220].

Les souris n'exprimant pas de LH fonctionnelle présentent un hypogonadisme et une infertilité [221]. L'invalidation du gène codant pour le récepteur à la LH (LHRKO) conduit quant à lui, à un arrêt de la spermatogenèse au niveau des spermatides rondes, à une cryptorchidie (absence de l'un des deux testicules dans le scrotum) et à une atrophie des organes sexuels [222, 223]. Toutefois, le nombre de cellules de Sertoli reste le même que celui des souris "sauvages", bien que le nombre de spermatocytes tardifs soit diminué, le nombre de spermatides rondes soit dramatiquement bas et les spermatides allongées absentes. Les actions de la LH relayée par la testostérone seraient donc nécessaires à l'achèvement de la spermatogenèse [224].

La testostérone

Les récepteurs aux androgènes (AR) sont présents dans les cellules de Leydig, les cellules péricubulaires et les cellules de Sertoli. Il est connu que la testostérone intervient dans le maintien de la spermatogenèse, cependant les mécanismes par lesquels elle agit ne sont pas encore définis.

En effet, la réduction du taux de testostérone testiculaire après hypophysectomie, l'administration d'anti-androgènes ou la destruction des cellules de Leydig sont responsables du détachement des spermatides en développement de la cellule de Sertoli, et de l'arrêt de la spermatogenèse au cours du processus de la méiose ou de la spermiogénèse chez le rat [225]. Des études réalisées avec des souris n'exprimant pas l'AR ont également confirmé que la testostérone était nécessaire au maintien de la spermatogenèse. En l'absence d'AR, la spermatogenèse est bloquée au niveau de la méiose [226]. Similairement, chez la souris dont le gène codant ce récepteur a été invalidé sélectivement dans les cellules de Sertoli (souris SCARKO), la spermatogenèse progresse rarement au-delà du stade spermatocyte diplotène

[227, 228]. Le fait que les souris invalidées pour l'AR spécifiquement au niveau des cellules de Sertoli soient infertiles, suggère que le rôle de la testostérone dans la spermatogenèse est relayé par les cellules de Sertoli [229]. Par ailleurs, ces études ont révélé que l'AR est nécessaire au maintien de l'intégrité des complexes de jonction qui composent la barrière hémato-testiculaire [230, 231]. Des conclusions analogues ont été obtenues par déplétion en testostérone chez les rats [232]. Un mécanisme a été proposé pour expliquer ce phénomène : la disparition de la testostérone provoquerait des changements dans l'adhésion entre les cellules de Sertoli et les spermatides associées [233], consécutifs à des modifications au niveau des composants intracellulaires des cellules de Sertoli : l'actine et la vinculine [234]. La perte d'adhésion empêcherait donc la maturation nécessaire à la spermatogenèse. Ceci souligne donc le rôle majeur de la testostérone dans la progression de la spermatogenèse et l'achèvement de la méiose [229].

↳ L'œstradiol

Ce stéroïde est considéré comme un nouveau régulateur local de la spermatogenèse [235, 236]. L'importance de cette hormone dans le maintien des fonctions testiculaires a été illustrée par de nombreuses expériences, qui se répartissent en trois catégories : i) la localisation de l'aromatase et du récepteur cible des œstrogènes (ER- α et ER- β) dans les tissus de l'appareil génital mâle ; ii) l'analyse des phénotypes des testicules chez les souris transgéniques déficientes en aromatase, ER- α et/ou ER- β ; et iii) l'étude des effets de produits chimiques aux propriétés œstrogéniques sur la reproduction masculine [237].

› De récentes études ont démontré que l'aromatase tout comme les ER sont exprimés par les cellules germinales dont les spermatocytes, les spermatides, et les cellules de Leydig et de Sertoli [238]. Ceci suggère que les cellules présentes dans l'épithélium séminifère sont capables de produire des œstrogènes à partir de testostérone afin de réguler la spermatogenèse [239] ;

› Les souris déficientes en ER α présentent de sévères atteintes de la spermatogenèse, et sont infertiles. La dégénérescence progressive du tissu testiculaire, la dilatation des tubes séminifères, l'augmentation du niveau de testostérone plasmatique et l'apparition de problèmes dans le comportement sexuel, représentent les conséquences d'une telle mutation [240]. L'invalidation du gène *Cyp19* codant pour l'aromatase entraîne aussi des altérations de la spermatogenèse chez les souris adultes, notamment des arrêts de la spermatogenèse en parallèle à une augmentation de l'apoptose, se traduisant par une diminution du nombre de

spermatides [241, 242]. De la même façon, des hommes possédant le gène de l'aromatase altéré, ou un ER non fonctionnel, présentent une fonction testiculaire altérée [243-245].

› L'exposition *in utero* de mâles (rongeur et humain) à divers composés œstrogéniques affecte leur fertilité à l'âge adulte [246] (cf. chapitre III, *Exemples de perturbateurs endocriniens induisant une toxicité* pour plus de détails).

Ces observations suggèrent un rôle pivot des œstrogènes lors de la spermatogenèse, et il est maintenant clairement admis qu'ils peuvent influencer la prolifération, la différenciation et la fonction des cellules testiculaires [239].

🔗 La prolactine

Des taux élevés de PRL ont pour conséquence une infertilité chez l'homme [247, 248]. D'autre part, les cellules de Sertoli expriment les récepteurs à la PRL [249], et la fixation de celle-ci stimule leur croissance, la sécrétion de lactate et la synthèse de nombreuses protéines nécessaires à la spermatogenèse [250].

ii. *Régulation paracrine ou contrôle local*

🔗 L'androgen binding protein

L'ABP est produite dans les tubes séminifères par les cellules de Sertoli, puis sécrétée dans le fluide interstitiel et le fluide des tubes séminifères [251]. Elle possède une grande affinité pour la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). Cette protéine intervient dans le transport et la distribution de ces androgènes au niveau du testicule. La testostérone, synthétisée dans le compartiment interstitiel, peut ainsi être transportée de façon spécifique et agir au niveau des cellules germinales, capables de lier les complexes testostérone-ABP.

Actuellement, la plus forte suggestion de l'implication de l'ABP testiculaire dans le contrôle de la spermatogenèse vient des expériences de surexpression de cette protéine dans les testicules de souris [252, 253]. Ces animaux ont montré une hypofertilité due à un dysfonctionnement spermatogénique. Dès lors, il est envisagé que de forts taux d'ABP peuvent capter les androgènes, les empêchant ainsi d'agir sur les cellules germinales.

Les cytokines

☞ **SCF.** Le SCF (*stem cell factor*) est synthétisé et sécrété par les cellules somatiques, dont la nécessité au bon déroulement de la spermatogenèse a été clairement établie [254]. Son récepteur c-kit est présent sur la membrane des cellules germinales [255]. Des expériences sur des rongeurs ont permis de mettre en évidence que le système SCF/c-kit est un système pivot pour la différenciation des spermatogonies [256-258], ainsi que pour leur survie et prolifération [259]. En effet, le blocage de l'interaction SCF/c-kit *in vivo* augmente l'apoptose des spermatogonies et des spermatoocytes [260]. D'autre part, il est apparu que le récepteur c-kit et le SCF interviennent dans l'adhésion des cellules de Sertoli avec les spermatoocytes [261].

☞ **TNF.** Le TNF (*Tumor Necrosis Factor*) semble avoir plusieurs rôles dans les communications cellulaires entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales, intervenant dans l'inhibition de la production de testostérone et d'inhibine, et l'augmentation de facteurs de croissance tels que l'IGFBP3. Il est également responsable de l'augmentation de la production de lactate, contrôle la production de transferrine, et participe au maintien de l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire en régulant la synthèse de metalloprotéases contrôlant l'ouverture des jonctions serrées [262]. De plus, il interviendrait dans les interactions avec le système immunitaire et la spermatogenèse [263].

☞ **IL-1 α .** Des études sur l'interleukine-1 α ont montré qu'elle joue un rôle important dans la synthèse d'ADN des spermatogonies et des cellules méiotiques du rat [264-266]. L'IL-1 α semble aussi impliquée dans le développement des cellules germinales, via le contrôle du métabolisme énergétique (glucose) [267].

Les facteurs de croissance

☞ **Inhibine et activine.** Des études sur les rongeurs ont établi que l'inhibine et l'activine modulent le nombre de spermatogonies et de cellules de Sertoli : les inhibines exercent un effet inhibiteur/répresseur alors que les activines présentent un effet stimulateur [203].

☞ **BMP.** Certains membres de la famille TGF- β , tels que les protéines BMP, ont été décrits comme permettant une initiation et un maintien de la spermatogenèse [268]. En particulier, BMP-8A et BMP-8P procurent des signaux de survie aux spermatoocytes [260].

Cette liste n'est pas exhaustive puisque de nombreux facteurs supplémentaires sont impliqués dans le maintien de la spermatogenèse [260] : (i) régulant la phase de prolifération des spermatogonies (GDNF, LIF, EGF, TGF- β) ; (ii) contrôlant la phase de méiose des cellules germinales (TGF- β , EGF) ; (iii) intervenant durant la phase de spermiogenèse (EGF) ; (iv) et engagés dans les processus de survie et d'apoptose des cellules germinales (LIF, interleukine 4, FGF, TRAIL, TGF- β).

B. Compartiment interstitiel et fonction endocrine

I. L'interstitium

Les tubes séminifères dans lesquels se déroule la spermatogenèse sont séparés par un tissu conjonctif lâche : l'espace interstitiel (Figure 27).

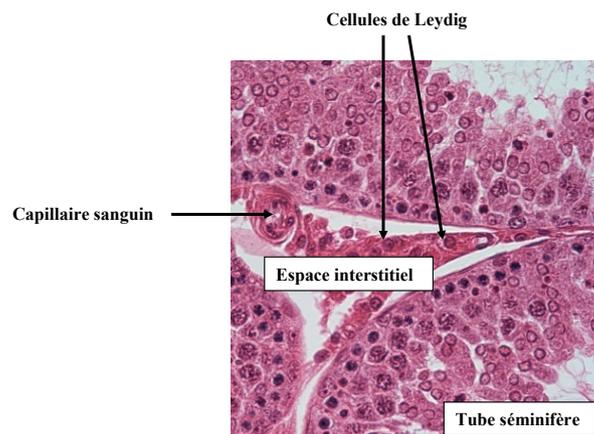


Figure 27 : Coupe de testicule de rat sur laquelle figure l'espace interstitiel entre les tubes séminifères

L'espace interstitiel contient plusieurs types cellulaires et composants : les cellules de Leydig, les cellules périlitubulaires, les macrophages, les artérioles et les fibroblastes [269].

› Les cellules de Leydig sont les cellules majoritaires de l'interstitium chez le rat. Elles représentent moins de 5% des cellules du testicule. Elles sécrètent des androgènes essentiellement sous forme de testostérone, de DHT ainsi que des œstrogènes. L'activité de ces cellules est sous le contrôle de la LH antéhypophysaire [270] ;

› Les cellules périlitubulaires myoïdes relayent quelques effets de la testostérone, ainsi que d'autres hormones et facteurs de croissance sur les cellules de Sertoli et les cellules germinales [167] ;

- › Les macrophages jouent un rôle primordial dans la régulation de la fonction endocrine des cellules de Leydig. En effet, ces cellules via la sécrétion de cytokines (ex. IL-1, TNF- α) sont capables d'inhiber la synthèse des stéroïdes et d'intervenir dans le contrôle de la prolifération et le développement des cellules de Leydig [271]. Les macrophages phagocytent également les cellules de Leydig qui dégènèrent ;
- › Des artérioles et un grand nombre de capillaires délivrent les facteurs de régulations endocrines, en particulier la FSH et la LH, aux cellules cibles du testicule. Enfin, le tissu interstitiel contient des fibroblastes [272, 273].

i. Biosynthèse, production et action des androgènes par les cellules de Leydig

⌘ Généralités et structure de la cellule de Leydig

La cellule de Leydig a été décrite pour la première fois en 1850 par Franz Leydig. C'est seulement en 1903 que Bouin et Ancel apportent les premiers éléments montrant que la cellule de Leydig est une cellule glandulaire endocrine, contrôlant le développement des caractères sexuels secondaires mâles.

La cellule de Leydig est une cellule polygonale au noyau ovoïde proéminent. Elle possède une ultrastructure caractéristique des cellules synthétisant des stéroïdes : cytoplasme riche en citernes de réticulum endoplasmique lisse, mitochondries de taille variable et peu nombreuses garnies de crêtes généralement lamellaires, et enclaves lipidiques abondantes dans le cytoplasme des cellules matures. Les cellules de Leydig sont soit isolées, soit groupées en amas autour des capillaires sanguins, et entourées par une lame basale discontinue. La proximité de ces cellules avec les tubes séminifères facilite la sécrétion de fortes concentrations de testostérone, qui sont nécessaires à l'initiation et au maintien de la spermatogenèse [270, 274].

Dans la plupart des espèces, deux générations de cellules de Leydig ont été décrites au cours du développement : (i) une population fœtale qui, sous l'influence stimulatrice d'hCG, produit de la testostérone au cours du développement fœtal, essentielle à la formation de la gonade mâle et des progéniteurs, à la différenciation et morphogénèse du tractus génital mâle, et à la masculinisation et différenciation sexuelle au niveau du système nerveux central ; (ii) une génération adulte, dont la production de testostérone est stimulée par la LH à partir de la

puberté, et permet le maintien de la spermatogénèse et des caractères sexuels secondaires mâles [275].

La stéroïdogénèse

Chez le mâle, 95% de la testostérone présente dans le sang provient du testicule. Les 5% restants résultent d'une production surrénalienne et de la conversion périphérique de l'androstènedione. Il s'avère que la cellule de Leydig présente dans le testicule est le seul type cellulaire qui possède l'ensemble des enzymes nécessaires à la synthèse des hormones sexuelles stéroïdes [276].

La stéroïdogénèse est l'ensemble des réactions nécessaires à la synthèse des hormones stéroïdes dont la principale hormone sexuelle mâle, la testostérone, à partir de cholestérol. Le cholestérol-substrat utilisable pour la biosynthèse des stéroïdes peut provenir de différentes sources (Figure 28) [277].

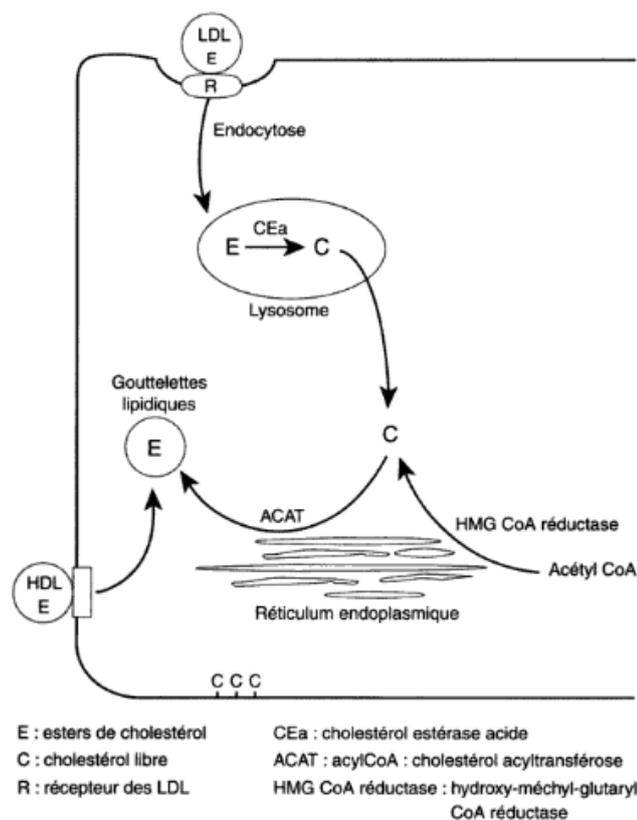


Figure 28 : Sources de cholestérol-substrat nécessaire à la stéroïdogénèse dans la cellule de Leydig (D'après Médecine et Biologie de la Reproduction : des gamètes à la conception, par Samir Hamamah, 2004)

Le cholestérol peut être fourni par les lipoprotéines circulantes (*high and low density lipoprotein* : HDL et LDL) [278]. Dans les espèces humaine et porcine, il provient majoritairement de l'endocytose des esters de cholestérol contenus dans les lipoprotéines de basse densité ou LDL. Après liaison à un récepteur membranaire, les LDL sont internalisées puis dégradées dans les lysosomes. Le cholestérol initialement estérifié y est alors hydrolysé en cholestérol libre par une cholestérol estérase acide [277]. Ce cholestérol libre est ensuite à nouveau estérifié par une enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique, l'Acyl CoA:cholestérol acyltransférase (ACAT), avant d'être stocké sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules. La nature exacte de ces gouttelettes lipidiques est encore mal connue. Stockées de façon similaire, les lipoprotéines de haute densité (HDL) constituent la source majeure d'esters de cholestérol chez le rat. Le site de liaison des HDL sur la membrane plasmique n'est pas encore caractérisé, mais il semble que cette liaison soit suivie d'un transfert direct des esters de cholestérol dans le cytoplasme où ils s'accumulent sous la forme de gouttelettes lipidiques. Si le cholestérol estérifié stocké dans les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques constitue généralement la principale source de cholestérol, il a été montré que le cholestérol libre présent dans les membranes cellulaires peut aussi contribuer à la stéroïdogénèse [278-280]. D'autre part, les cellules de Leydig sont capables d'effectuer la synthèse *de novo* du cholestérol à partir de l'Acétyl CoA par l'intermédiaire de l'hydroxyméthylglutaryl CoA réductase (HMG CoA réductase), enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique [281]. Cette capacité est cependant limitée et ne couvre que 25% des besoins de la cellule [282].

Dans la cellule de Leydig, la stéroïdogénèse est initiée par la LH. En se liant à son récepteur couplé à la protéine G situé sur la membrane plasmique [283], la LH stimule l'adénylate cyclase qui catalyse la transformation d'ATP en AMPc [284]. L'AMPc ainsi généré, active alors une protéine kinase A qui phosphoryle une cholestérol estérase neutre cytosolique. Son activation hydrolyse finalement les esters de cholestérol stockés dans les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques.

La liaison de la LH à son récepteur conduit non seulement à la mobilisation du cholestérol libre vers la mitochondrie, mais aussi à son utilisation par cet organite [285]. C'est en effet dans la mitochondrie que se déroule la première étape de la stéroïdogénèse, la conversion du cholestérol (C27) en prégnénolone (C21). Cette réaction est catalysée par le cytochrome P450_{scc} (*side-chain cleavage*) ou Cyp11a1, localisé dans la membrane

mitochondriale interne (Figure 29) [286, 287]. Elle implique deux hydroxylations en C20 et C22, et un clivage de la liaison C20-C22. Les intermédiaires formés au cours de ces réactions sont le 22R-hydroxycholestérol, le 20 α -hydroxycholestérol et le 20 α , (22R)-dihydroxycholestérol. Etant donné la grande efficacité de la conversion du cholestérol en prégnénolone, ces métabolites ne sont présents qu'en très faible quantité dans les mitochondries. Les électrons nécessaires à chacune des réactions sont fournis par le NADPH [286, 287].

Il a été établi que la conversion mitochondriale du cholestérol en prégnénolone constitue l'étape limitante de la stéroïdogénèse. Néanmoins, le contrôle par les hormones trophiques (telles que la LH) ne s'exerce pas sur l'activité même du cytochrome P450_{scc}, mais sur la disponibilité en cholestérol pour cette enzyme. Cette disponibilité est limitée par le fait que le cytochrome P450_{scc} est localisé dans la membrane interne, ce qui implique pour le cholestérol une translocation à travers l'espace aqueux intermembranaire. La diffusion aqueuse du cholestérol étant extrêmement lente, il est rapidement apparu que le rôle des hormones trophiques serait de faciliter cette translocation. Plusieurs protéines interviennent dans ce transport du cholestérol ; la plus importante et étudiée, étant la protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) [288], qui permet la translocation du cholestérol par son domaine C-terminal (Figure 29) [289].

Les étapes ultérieures à l'action du cytochrome P450_{scc} ont lieu dans le réticulum endoplasmique lisse [290]. Le mécanisme par lequel la prégnénolone transite de la mitochondrie vers le réticulum endoplasmique reste encore inconnu dans les gonades. Il existe deux voies d'obtention de la testostérone [291], qui diffèrent selon les espèces. Le rat utilise préférentiellement la voie dans laquelle la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase-isomérase (3 β -HSD) convertit la prégnénolone en progestérone (C21) [292]. Puis, la conversion de stéroïdes en C21 en stéroïdes en C19, met en œuvre deux réactions : une hydroxylation en C17 et un clivage de la liaison C17-C20. Ces deux réactions sont catalysées par une même enzyme : le cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20 lyase ou Cyp17a1 (ou P450c17) [293]. Chez le rat, l'activité de cette enzyme aboutit à l'obtention de la 17 α -hydroxyprogestérone et ensuite de l'androstènedione. Le rapport entre les deux activités hydroxylase et lyase est variable d'un tissu à l'autre. Dans les gonades, l'activité 17,20-lyase est très élevée. Enfin, l'androstènedione est convertie en testostérone sous l'action de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase, 17 β -HSD [294]. (Figure 29)

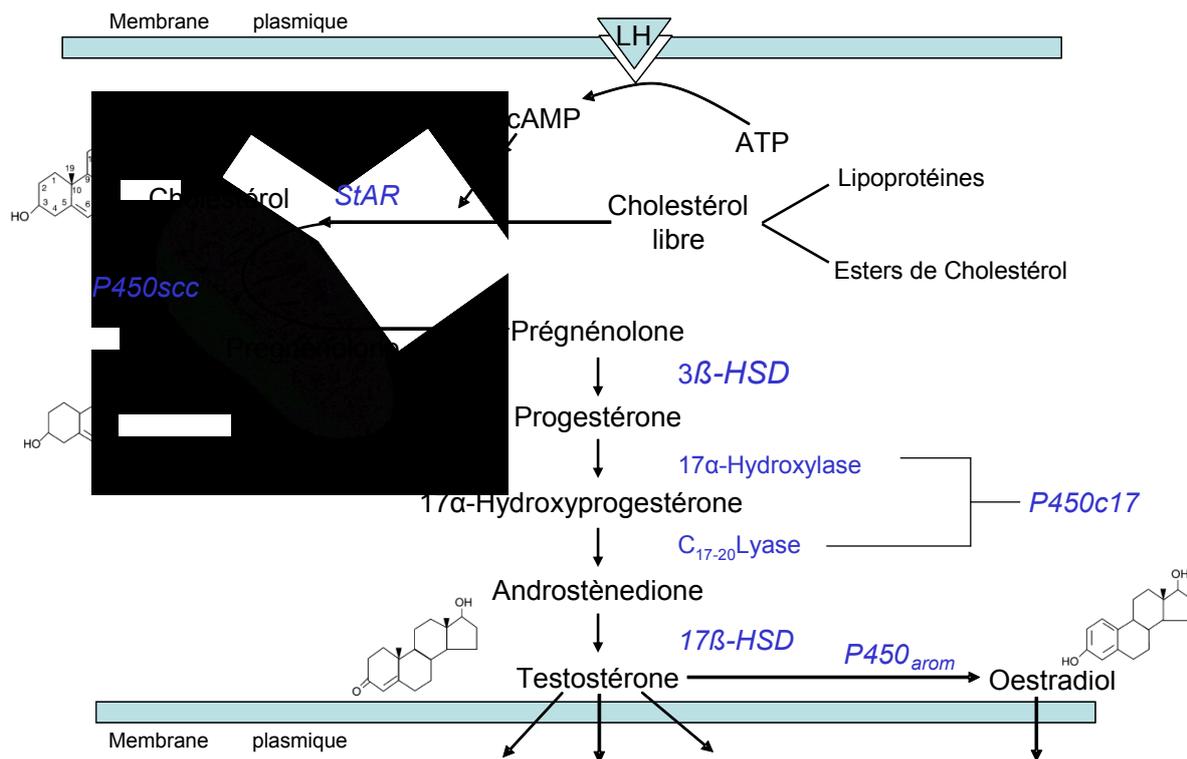


Figure 29 : Biosynthèse de la testostérone chez le rat, régulation de la stéroïdogénèse testiculaire

Cette voie de biosynthèse nommée delta 4 (prégnénolone → progestérone → androstènedione → testostérone) fut la première identifiée chez le rat [295], et elle est considérée comme la voie préférentielle chez cette espèce [292]. On peut noter qu'il existe une voie parallèle (delta 5) prédominante chez l'homme [296], conduisant à la formation d'un intermédiaire, la déhydroépiandostérone (DHEA) à partir de la prégnénolone.

🔗 Métabolisme des androgènes

La sécrétion globale de testostérone est de 5 à 7,5 mg/jour chez un homme adulte normal. Elle exerce une action quasi ubiquitaire dans l'organisme de l'homme, directement ou par l'intermédiaire de sa bioconversion en un œstrogène puissant, l'œstradiol, ou en un androgène plus puissant, la DHT.

En effet, sous l'action d'une cytochrome P450 aromatase codée par le gène Cyp19/P450arom, la testostérone (Figure 29) et l'androstènedione peuvent être métabolisées de façon irréversible en œstrogènes [297, 298]. Au sein du testicule de rat, la localisation de l'expression de la P450 aromatase est variable en fonction de l'âge : préférentiellement au niveau des cellules de Sertoli pour les animaux immatures, et dans les cellules de Leydig et germinales pour les adultes (spermatocytes pachytènes, spermatides rondes et

spermatozoïdes) [297]. Un profil d'expression similaire a été mis en évidence chez l'homme [238]. Le testicule est responsable de 15% de la production totale d'œstrogènes, la majeure partie étant produite au niveau des tissus périphériques (graisse, tissu osseux et cerveau) [299].

La testostérone peut également être irréversiblement métabolisée en un dérivé plus actif, la DHT, par les 5 α -réductases de type 1 et 2 [300], enzymes membranaires microsomales NADPH-dépendantes (Figure 29). La production de DHT est réalisée dans certains tissus cibles qui possèdent l'une ou l'autre des isoformes, ou les deux. Ces deux protéines, bien qu'assurant la même fonction sur le même substrat, ne présentent que 55% d'homologie [301, 302]. Elles se distinguent sur le plan fonctionnel par leur expression tissulaire et l'ontogénie de leur expression. Chez le rat et l'homme, la 5 α -réductase de type 1 de faible affinité pour les stéroïdes présente une expression ubiquitaire, mais plus élevée dans les follicules pileux, les glandes sébacées de la peau et le foie. La 5 α -réductase de type 2 possédant une affinité plus forte pour les stéroïdes, est quant à elle exprimée majoritairement dans les tissus de l'appareil reproducteur (prostate, épididyme et vésicules séminales) [303].

Ces métabolites ont, tout comme la testostérone, diverses fonctions physiologiques au niveau de l'appareil reproducteur mâle.

🔗 Rôles de la testostérone et de ses dérivés

Les stéroïdes comme la testostérone diffusent librement à travers la membrane des cellules de Leydig. Dans le plasma, la grande majorité des hormones stéroïdes (98%) circule sous trois formes : 2% sous forme libre, seule forme utilisable directement par les tissus, 45 à 75% sont liées à la protéine de transport des stéroïdes sexuels SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*), et 30 à 55% liées à l'albumine [304, 305]. La testostérone liée à la SHBG, à l'inverse de la fraction liée à l'albumine, se dissocie difficilement et n'est pas disponible pour l'utilisation tissulaire. La testostérone disponible représente donc la somme de la testostérone libre et de celle liée à l'albumine, soit 40 à 50% de la testostérone totale [306]. Enfin, les protéines de liaison empêchent la rapide métabolisation des hormones par le foie. Lorsque le taux de testostérone libre baisse, une partie de la fraction liée se dissocie de l'albumine et de la SHBG afin de maintenir un taux constant de testostérone libre.

🔗 Le contenu en **testostérone** du testicule de l'homme adulte est d'environ 1 $\mu\text{g/g}$ de testicule. La testostérone agit par fixation directe à l'AR, dont localement au niveau du

testicule sur les cellules de Sertoli, afin de participer à la régulation de la spermatogenèse ; elle permet aussi la différenciation, la croissance et le fonctionnement des organes reproducteurs [229, 307].

A la puberté, la testostérone provoque le début de la spermatogenèse, et cible tous les organes annexes – les conduits, les glandes et le pénis – qui croissent et assument leurs fonctions adultes. La testostérone est également responsable du développement et du maintien des caractères sexuels secondaires masculins. Ces caractères apparaissent à la puberté, qui est marquée par l'apparition des poils pubiens, axillaires et faciaux, ainsi que par l'augmentation de la croissance des poils de la poitrine. La peau s'épaissit et devient plus grasse, les os croissent et leur densité augmente, et les muscles squelettiques sont plus gros et plus lourds. Chez les hommes adultes, la concentration normale de la testostérone est nécessaire à l'entretien des organes sexuels : si la testostérone est absente ou pas assez abondante, les organes annexes s'atrophient, le volume du sperme diminue fortement, puis l'érection et l'éjaculation deviennent impossibles. La testostérone accélère aussi la vitesse du métabolisme basal, stimule l'érythropoïèse, et influe sur le comportement. Elle constitue également la base de la pulsion sexuelle chez les hommes et les femmes [308]. Plus spécifiquement, cette hormone intervient dans la progression de la spermatogenèse et l'achèvement de la méiose [229], dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire, dans la formation des connections entre les cellules de Sertoli et l'adhésion cellules de Sertoli/spermatides, ainsi que dans le relargage des spermatozoïdes matures (cf. chapitre II, *Contrôle endocrinien de la spermatogenèse*) [231, 309, 310]. Enfin, la testostérone exerce sa propre régulation par un mécanisme de rétrocontrôle sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse (cf. chapitre II, *Axe cérébro-testiculaire*).

☛ La **DHT** et la testostérone agissent par fixation au même récepteur, mais participent à différentes fonctions physiologiques. Ceci est probablement dû au fait que la DHT possède une affinité beaucoup plus importante pour l'AR que la testostérone [311]. En effet, ce récepteur forme avec la DHT un complexe enzyme-récepteur plus stable [312], et entraîne une transactivation par le récepteur plus efficace que ne le fait la testostérone [313].

La DHT est impliquée dans le développement des organes génitaux externes lors de l'embryogenèse, ainsi que dans la pilosité et la croissance prostatique. Le rôle de la 5 α -réductase de type 2 semble prépondérant puisque son inactivation par mutation chez l'homme entraîne des anomalies du développement des organes génitaux externes à la naissance (pseudohermaphrodisme masculin) [314, 315], une virilisation plus ou moins normale à

l'adolescence selon les individus, accompagnée d'une absence de développement de la prostate et des vésicule séminales. Il a également été remarqué chez ces individus, une absence d'acné chez l'adolescent, un système pileux peu développé chez l'adulte et aucune calvitie, même tardive [316].

☛ Les **œstrogènes** ont un rôle central dans le contrôle de la reproduction et de la fertilité, que cela soit chez les mâles [237] ou les femelles. L'importance et la fonction de l'œstradiol chez l'homme ont pu être précisées par des explorations chez des sujets masculins ayant un déficit en aromatasase ou une mutation d'ER- α : ces hommes sont généralement infertiles, ils présentent des taux élevés de LH et de testostérone, sont de grande taille en raison d'un retard de soudure des cartilages et souffrent d'ostéopénie [243, 245, 317]. Par ailleurs, des modèles de souris *KnockOut* pour le gène ER- α , ER- β , ou les deux formes (ERKO) [240, 318, 319], ainsi que pour le gène Cyp19a1 (ARKO), ont également démontré l'importance des œstrogènes sur la spermatogenèse et la fertilité [239] (cf. chapitre II, *Contrôle endocrinien de la spermatogenèse*). Il semble que ce soit plus spécifiquement l'invalidation de l'ER- α qui soit responsable des altérations observées [320], puisque seules les souris invalidées pour l'ER- β sont fertiles [321]. En outre, les œstrogènes sont impliqués dans le développement du système nerveux central, dans l'homéostasie du squelette et du système cardio-vasculaire [317]. Ils sont nécessaires à la masculinisation du cerveau et impliqués dans le comportement sexuel ; ils ont également des effets sur le foie et le tissu adipeux [299], et interviennent dans la croissance de la prostate et des glandes mammaires [317].

☛ Mécanisme d'action des androgènes

Les effets des androgènes sont exercés par le biais d'un récepteur nucléaire (RN) : l'AR. Les RNs sont une des classes les plus abondantes de régulateurs transcriptionnels chez les animaux. Ils se fixent sur des séquences d'ADN spécifiques, situées au niveau du promoteur des gènes qu'ils régulent. D'un point de vue physiologique, ces facteurs transcriptionnels sont directement impliqués dans le contrôle de grandes fonctions comme la reproduction, la différenciation cellulaire, l'apoptose ou l'homéostasie [322, 323]. Aujourd'hui, le séquençage du génome humain a permis d'identifier 48 RN distincts, chacun caractérisé par un rôle spécifique et non redondant dans la régulation de nombreux processus biologiques [324]. De par leur origine commune, tous les RN partagent une structure similaire qui sera détaillée par la suite pour l'AR. Basée sur leur homologie de séquences, leur

phylogénie, et leur mode de dimérisation, sept sous-familles de taille inégale ont été définies au sein de la superfamille des RN. L'AR, qui a un intérêt particulier pour ces travaux, appartient à la classe III avec les autres récepteurs des hormones stéroïdes comme le récepteur des glucocorticoïdes [325-327]. Les récepteurs des hormones stéroïdes forment des homodimères ; chacun des monomères se fixe sur un demi-site de l'élément de réponse. Ce site se définit par la répétition inversée de la séquence 5'-AGAACA-3' séparée par trois nucléotides : 5'-GAACAnnnTGTTCT-3', nommé IR3.

Le récepteur aux androgènes

Chez le rat, l'AR est largement distribué dans l'organisme, et il est exprimé en grande quantité dans les organes sexuels (testicules, prostate, vésicules séminales, épидидymes). Dans le testicule, l'AR est localisé au niveau des cellules de Sertoli, des cellules de Leydig, mais aussi dans les cellules myoïdes situées autour des tubes séminifères [328, 329]. L'AR est un récepteur nucléaire ligand inductible qui, après liaison avec la testostérone ou la DHT, s'homodimérise et se fixe sur des séquences d'ADN spécifiques situées en amont des gènes cibles, les éléments de réponse aux androgènes (ARE), permettant ainsi l'activation (ou la repression) de la transcription de ces gènes.

Le clonage de l'ADN complémentaire du gène de l'AR date de 1988 [326, 327], et son séquençage de 1989 [330]. C'est le dernier des récepteurs aux hormones stéroïdes à avoir été cloné. Chez l'homme, le gène codant pour l'AR est localisé sur le bras long du chromosome X en position q11.12 et contient huit exons [327, 331]. Le promoteur de ce gène contient des éléments de réponse à plusieurs molécules, comme le CRE (*c-AMP response element*), des éléments de réponse à SRY, SF-1, ER, NF-κB, et à l'AR lui-même, formant ainsi une boucle d'autorégulation [332]. L'AR est une protéine de 919 acides aminés et d'un poids moléculaire de 110 kDa [326, 333].

L'AR, comme les autres RN, est structuré en quatre domaines (Figure 30) [334], dont la fonction a pu être précisée par de très nombreuses expériences de mutations et délétions :

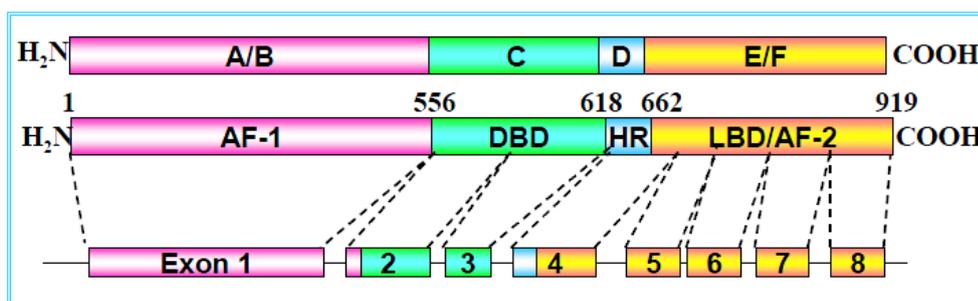


Figure 30 : Structure du récepteur aux androgènes

☞ **Domaine N-terminal (NTD)** : composé des régions A et B, il est codé par l'exon 1 et représente plus de 50% de la protéine. C'est la région de l'AR la moins conservée parmi les récepteurs aux hormones stéroïdes. De longueur variable (polymorphisme), il comprend un domaine AF-1 (domaine transactivateur principal, Figure 31 C) possédant un fort pouvoir activateur de la transcription [335]. Lorsque celui-ci est en contact avec des facteurs de transcription tels que TFIIF, il subit des modifications conformationnelles conduisant à une forme plus compacte et active. Cette dernière permet le recrutement de corégulateurs complémentaires afin de continuer le processus de transcription [336]. La fonction de l'AF-1 nécessite seulement quelques régions conservées, les autres séquences divergentes servant au repliement protéique. Sa transactivation est relayée par deux domaines majeurs d'activation de la transcription : Tau-1 localisé entre les acides aminés 100 et 370, et Tau-5 localisé entre les acides aminés 360 et 526 [337], séquence cible de la kinase PRK1 (*PKC related kinase1*) qui permet une suractivation du récepteur. Un motif polyglutamine ((Gln)_n) situé au niveau du NTD (Figure 31 C) joue un rôle important dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle [334, 338]. Chez l'homme, la longueur de ce segment polyglutamine (variant de 9 à 26 résidus [339]) est inversement corrélée à la capacité de liaison de l'AR avec ses coactivateurs, et exerce donc un effet négatif pour l'androgénicité [340]. Adjacents à ce motif, des sites consensus pour les protéines kinase Serine-Proline dirigées, sont présents (Ser⁸¹ et Ser⁹⁴ : Figure 31 E), nécessaires à la phosphorylation du récepteur [341]. Cependant, la phosphorylation basale et régulée du récepteur, ainsi que son implication biologique, n'ont pas encore été totalement élucidées. Enfin, une spécificité de l'AR est de montrer une forte interaction entre le NTD et le LBD [342].

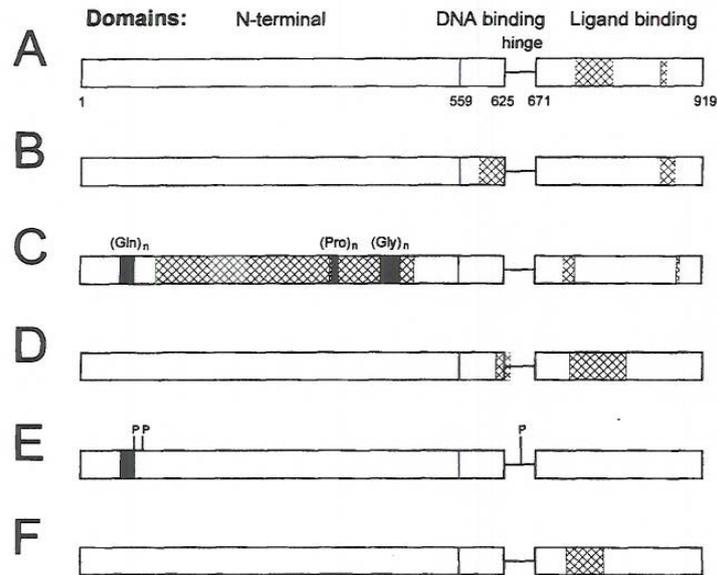


Figure 31 : Localisation des domaines fonctionnels au niveau du récepteur aux androgènes
 (A. Régions impliquées dans la formation de la poche de liaison ; B. Sites de dimérisation ; C. Domaines de transactivation ; D. Régions impliquées dans la localisation nucléaire ; E. Résidus Sérine de phosphorylation ; F. Sites de liaison des Hsp90)
 (D'après MacLean *et al.*, 1997)

☞ **Domaine de liaison à l'ADN (DBD)** : codé par les exons 2 et 3 (région C, Figure 30), ce domaine central multifonctionnel se présente comme la région la plus conservée parmi les récepteurs aux hormones stéroïdes avec 59 à 82% d'homologie de séquences [343, 344]. Le DBD joue un rôle très important au sein de l'AR, puisque c'est lui qui va déterminer les séquences à reconnaître pour induire l'expression des gènes cibles. Chaque exon code pour une structure en doigt de zinc, dans laquelle quatre cystéines sont centrées autour d'un ion zinc (Zn^{2+}) (Figure 32). La structure en doigt de zinc codée par l'exon 2 (séquence 100% conservée) est responsable de l'interaction entre le complexe AR-ligand et l'ADN du gène cible androgénosensible. En particulier, les acides aminés à la base de la structure en doigt de zinc, Gly⁵⁷⁷, Ser⁵⁷⁸ et Val⁵⁸¹ (boîte P) déterminent l'orientation et la spécificité de liaison du récepteur [334, 345-347]. La structure en doigt de zinc codée par l'exon 3 possède un rôle stabilisateur de cette interaction, via des interactions hydrophobes avec la première structure, et contribue à la spécificité de la liaison à l'ADN [348, 349] ainsi qu'à la dimérisation du récepteur (boîte D, Figure 31 B) [350]. Par ailleurs, bien que les séquences des éléments de réponse aux récepteurs stéroïdes soient similaires, les récepteurs les reconnaissent avec une spécificité différente. Cette spécificité et reconnaissance avec une grande affinité des séquences résident en partie dans la présence de l'extension C-terminale située à la fin du

DBD [349, 351]. Enfin, ce domaine comprend aussi un signal de localisation nucléaire (NLS, Figure 31 D), ainsi qu'un signal d'export nucléaire (NES).

Les acides aminés impliqués dans la liaison à l'ADN (boite P), et ceux impliqués dans la dimérisation de l'AR (boite D) sont représentés encadrés, Figure 32. Apparaissent également les deux hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (en bleu) présentes dans le domaine DBD, ainsi que la région d'extension C-terminale nécessaire pour une grande affinité de liaison de l'AR à ses éléments de réponse [349]. Le NLS constitué de deux parties est encadré en rouge sur la figure, et le NES encadré en violet.

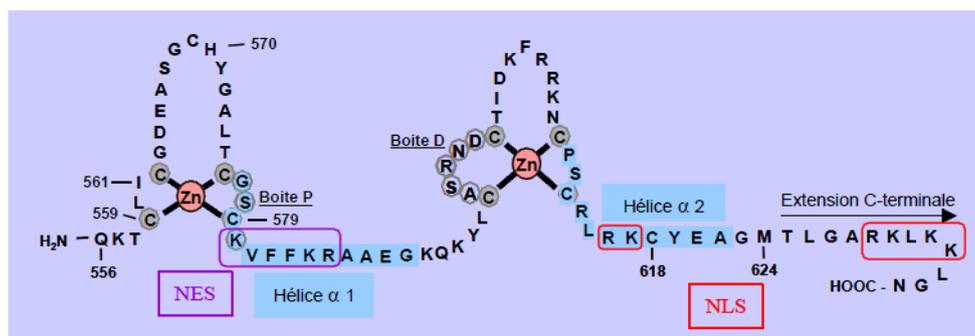


Figure 32 : Représentation du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes
(D'après Thèse de Monge Audrey, Strasbourg I, 2008)

☞ **Domaine charnière** : Situé entre la dernière hélice α du DBD et la première hélice α du LBD, il est codé par la portion 5' de l'exon 4 (région D, Figure 30). Il est reconnu à l'heure actuelle que ce domaine permet une certaine flexibilité de l'AR. En effet, son rôle principal consiste en l'induction d'un changement conformationnel du récepteur après fixation des androgènes [324]. Ce domaine abrite également un signal de localisation nucléaire (Figure 31 D) [352, 353] responsable du transfert dans le noyau du complexe AR-ligand, ainsi qu'un site de phosphorylation au niveau de la sérine 650 (Figure 31 E) [341] qui jouerait un rôle dans la translocation. De plus, il a récemment été démontré que cette région est impliquée dans d'autres fonctions de l'AR, à savoir, la liaison à l'ADN, le recrutement de cofacteurs et l'interaction entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal de l'AR [354].

☞ **Domaine de liaison au ligand (LBD)** : Codé par la portion 3' de l'exon 4 et les exons 5 à 8, il représente le tiers de la protéine totale (régions E et F, Figure 30). Il a pour fonction de fixer le ligand (testostérone ou DHT), mais aussi des protéines inhibitrices de son activation comme les protéines de choc thermique Hsp90 (Figure 31 F) [355]. Ces dernières

maintiennent l'AR dans une conformation stable et répriment sa transactivation [356]. Treize acides aminés situés dans la partie C-terminale du LBD, apparaissent essentiels à la liaison du ligand [357]. En outre, il contient une fonction de transactivation (AF-2, Figure 31 C) dépendante de la liaison du ligand ; une surface impliquée dans le processus de dimérisation (Figure 31 B) ; une poche de liaison au ligand (Figure 31 A) ; et une surface d'interaction avec des corégulateurs qui permettent de moduler positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle de l'AR [324, 332]. Pour tous les récepteurs nucléaires, la plupart des coactivateurs contiennent des motifs conservés riches en leucine (L) selon la séquence LXXLL (X, acide aminé quelconque). Celle-ci apparaît nécessaire et suffisante à la liaison récepteur/coactivateur [358]. Toutefois, l'AR diffère des autres récepteurs nucléaires car son LBD se lie préférentiellement à des motifs FXXLF (F, phénylalanine), y compris la séquence 23-FQNLF-27 présente dans le domaine NTD [359]. Le LBD a également une influence sur le DBD en stabilisant sa liaison à l'ADN [360]. Enfin, cette région comprend aussi un signal de localisation nucléaire hormono-dépendant (NLS, Figure 31 D) [361].

Mode d'action du récepteur aux androgènes

La signalisation des androgènes peut passer par la voie transcription-dépendante (génomique) et/ou la voie transcription-indépendante (non génomique). Ceci dépend de la nature des androgènes, des tissus cibles et de la localisation cellulaire de l'AR dans ces tissus [362].

☞ La **voie génomique** de transactivation de l'AR comprend les étapes communes à tous les récepteurs nucléaires (Figure 33). Ce mode d'action exige habituellement au moins 30 à 40 minutes pour modifier l'expression des gènes, et des heures pour produire des niveaux élevés de protéines nouvellement exprimées [363]. Il consiste en la translocation active du récepteur vers le noyau après stimulation par les androgènes où, sous forme d'homodimère et en collaboration avec différents cofacteurs transcriptionnels, il va contrôler la transcription de gènes possédant des ARE dans leurs régions régulatrices.

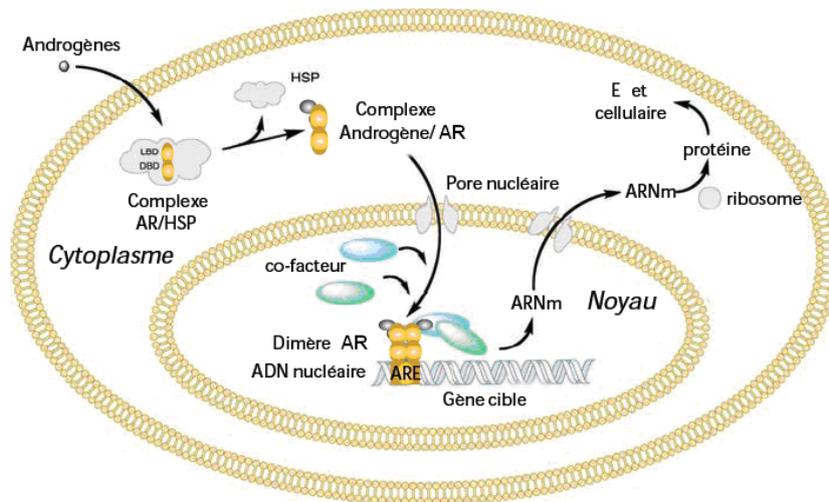


Figure 33 : Mode d'activation génomique du récepteur aux androgènes

L'AR sous sa forme inactive, donc non lié au ligand, est situé dans le cytoplasme [353]. Il y est maintenu dans un état conformationnel stable et favorable à la liaison avec un androgène par des protéines chaperonnes, telles que les protéines de choc thermique Hsp90, Hsp70 et Hsp56 [364], via le LBD. En effet, l'une des fonctions primaires du LBD est d'inhiber l'activation des gènes cibles en l'absence d'hormone. La liaison des androgènes (après diffusion à travers la membrane plasmique) à l'AR permet de lever l'inhibition imposée sur le LBD. Le changement de conformation de l'AR induit par cette liaison, provoque alors la dissociation de certaines protéines chaperonnes qui démasquent les sites de dimérisation et le signal de localisation nucléaire, et permettent l'exposition du DBD [365, 366]. Suite à cette interaction, l'AR s'homodimérise et est phosphorylé au niveau des résidus sérine [367-369]. Il transloque ensuite dans le noyau à l'aide de différentes protéines ; la translocation apparaît complète 60 minutes après activation par l'hormone [370].

La translocation nucléaire de l'AR est cruciale pour assurer sa fonction. Ce transport est sélectif, actif et nécessite un ou plusieurs NLS. La première étape consiste en la liaison du complexe aux pores nucléaires, étape indépendante de l'énergie. Au cours de la seconde étape, la séquence NLS de l'AR recouvrant le domaine DBD et la région charnière, est reconnue dans le cytoplasme par l'importine α . Le complexe cargo importine α / β associé à l'AR se déplace ensuite à travers les pores nucléaires dans le noyau [371].

La translocation est suivie de la fixation du dimère à l'ADN au niveau de séquences spécifiques du promoteur des gènes cibles, appelées ARE. Il est admis que les AR se lient à l'ADN sous forme d'homodimères, chaque monomère se liant à un demi-site de l'ARE par le biais d'un de ses deux motifs en "doigt de zinc" présents au niveau du DBD. Les activités

transcriptionnelles de l'AR sont modulées par sa capacité à interagir avec de nombreux corégulateurs. Ces derniers peuvent être classés selon leurs fonctions : (i) les corégulateurs de type I agissent essentiellement avec les récepteurs nucléaires au niveau du promoteur du gène cible pour faciliter l'occupation de l'ADN, le remodelage de la chromatine, ou le recrutement de facteurs de transcription généraux associés à l'ARN polymérase II ; (ii) les corégulateurs de type II ont pour fonction principale de permettre aux récepteurs nucléaires d'être compétents au niveau de l'expression du gène cible, en modulant la conformation appropriée de l'AR et la liaison du ligand [372].

Il est également intéressant de mentionner que l'AR peut être activé en l'absence d'hormone par des facteurs de croissance tels que l'IGF-1 (*insulin growth factor*), le KGF (*keratinocyte growth factor*), et l'EGF (*epidermal growth factor*) dans des cellules prostatiques cancéreuses [373]. Cette voie d'activation n'est pas encore bien comprise et reste à explorer.

☞ Les **actions non génomiques** définissent une signalisation rapide. Associées aux voies de signalisation membranaire, elles se déroulent dans les secondes voire les minutes qui suivent la stimulation par le ligand. La signalisation rapide des récepteurs aux hormones stéroïdes a été décrite pour la première fois il y a 30 ans, et est aujourd'hui admise comme un mode d'action alternatif de presque tous les récepteurs stéroïdiens, incluant les deux ER et l'AR [374]. Toutefois, l'ensemble des processus engagés dans cette voie de signalisation, ainsi que leurs implications n'ont pas encore été pleinement élucidés. En ce qui concerne l'AR, ce mode d'action a été décrit dans les oocytes, les cellules musculaires squelettiques, les ostéoblastes et les cellules prostatiques cancéreuses [343].

Les actions non génomiques relayées par la transduction d'un second messager activent différentes voies de signalisation impliquant la Protéine Kinase A (PKA), la Protéine Kinase B (PKB/Akt) ou encore les MAPK [375-379].

› Les androgènes sont capables de stimuler la voie des MAPK/ERK (*Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular-signal-Regulated Kinase*) en se complexant à l'AR et à la tyrosine kinase c-Src. Les MAPK activées transloquent au niveau nucléaire pour directement phosphoryler et activer l'AR et ses coactivateurs, et moduler la transcription de gènes cibles.

› L'AR peut être localisé dans des compartiments cellulaires particuliers qualifiés de rafts lipidiques, présents au niveau des invaginations membranaires des cellules, à partir desquels une activation des voies de signalisation PI-3K/AKT a été observée. Certaines données

suggèrent que l'AR active PI-3K en se complexant à sa sous-unité p85 α au niveau des invaginations membranaires.

› Les androgènes peuvent directement agir au niveau du récepteur des hormones sexuelles (SHBGR), et induire une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Cette induction entraîne l'activation de la PKA, ou alternativement influe sur un second messenger comme le calcium, et active la PKC. Ceci a pour conséquence une modulation de l'activité des facteurs de transcription et/ou des corégulateurs de l'AR.

Cas particulier de la testostérone

La testostérone a été décrite comme agissant via deux mécanismes d'action non génomiques dans les cellules de Sertoli afin de réguler la spermatogenèse : induction d'un influx de calcium dans la cellule ou activation de la cascade MAPK entraînant la phosphorylation du facteur de transcription CREB [225] :

✓ **Influx Ca²⁺**. Dans des cultures primaires de cellules de Sertoli, la testostérone est responsable d'une augmentation transitoire de la concentration en calcium intracellulaire dans les 20 secondes suivant la stimulation [380]. Des études complémentaires ont précisé que la stimulation par la testostérone cause l'activation d'une protéine G non identifiée, couplée à un récepteur, ainsi que l'activation de la phospholipase C (PLC). Cette dernière vient alors hydrolyser le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) dans la membrane plasmique pour produire l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). La diminution de la concentration en PIP2 induit finalement la dépolarisation de la cellule en affectant l'activité des canaux K⁺_{ATP}, permettant l'ouverture des canaux Ca²⁺ [381]. Cette régulation opérée par la testostérone auraient des effets non négligeables sur la transcription des gènes dans les cellules de Sertoli, la sécrétion de produits nécessaires aux cellules germinales et la stabilité du cytosquelette [381]. (Figure 34)

✓ **Activation de Src, EGFR, la cascade MAPK et CREB**. La stimulation par la testostérone de cellules de Sertoli isolées chez le rat provoque la phosphorylation du facteur de transcription CREB (*cAMP responsive Element Binding Protein*) et d'ERK1/2 MAPK. La rapidité de l'activation suggère l'existence d'un mécanisme dit "non génomique". La phosphorylation de CREB n'est pas affectée en présence d'inhibiteurs de synthèse protéique ou d'ARN, renforçant l'idée d'un tel mode d'action. La voie de signalisation proposée après de multiples expériences est la suivante : l'activation par phosphorylation de la protéine Src

par le complexe AR/testostérone [382], provoque la phosphorylation et la stimulation du récepteur EGF (EGFR). Celui-ci agit en aval de Src pour activer la voie des MAPK, dont les kinases ERK, Raf et MEK [382]. ERK vient ensuite stimuler la kinase p90Rsk connue pour phosphoryler CREB [383]. CREB activée vient finalement induire la transcription de gènes, dont certains sont nécessaires au bon déroulement de la spermatogenèse [384]. (Figure 34)

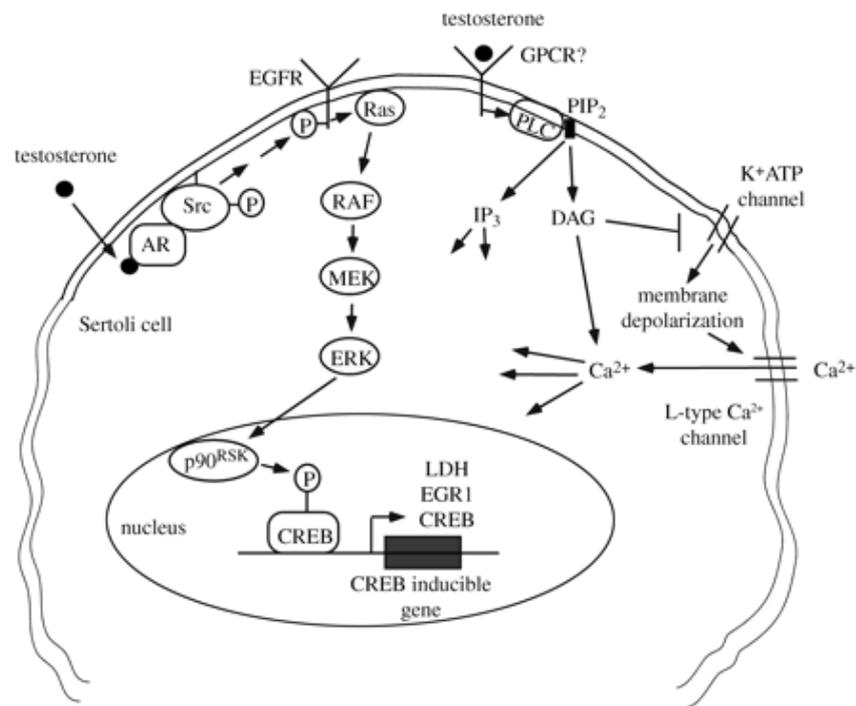


Figure 34 : Voies de signalisation non-génomiques de la testostérone dans les cellules de Sertoli
(D'après Walker *et al.*, 2010)

🔗 Catabolisme et élimination des androgènes

Dans les tissus (foie, rein, intestin, muscle et tissu adipeux), les voies de dégradation des androgènes dépendent du profil enzymatique local. Néanmoins, l'élimination des androgènes s'effectue principalement au niveau du foie. Une saturation des molécules effectuée par des oxydases hépatiques (métabolisme de phase I), suivie par une conjugaison avec des sulfates ou des glucuronates (métabolisme de phase II), les rendent suffisamment hydrosolubles et permettent leur excrétion [385]. La testostérone précisément, est convertie en androgènes faibles et inactifs : la DHEA, l'androstérone et l'étiocholanolone éliminés dans l'urine et la bile [343]. L'ensemble métabolique précité est très actif puisque la testostérone plasmatique a une demi-vie de l'ordre de 30 à 100 minutes chez l'homme, ce qui implique une fabrication permanente par le testicule [385].

II. Contrôle endocrinien de la stéroïdogénèse

i. Contrôle par les hormones

Les gonadotropines hypophysaires

L'observation de pathologies humaines, ainsi que des expériences de mutagenèse dirigée pour les gènes codant pour les gonadotrophines (LH et FSH) et leurs récepteurs (LH-R et FSH-R), mettent en évidence leur rôle dans le processus stéroïdogénique [386].

☞ **LH.** La LH est, sans nul doute, l'hormone la plus importante régulant la fonction des cellules de Leydig. La LH est capable de contrôler la production et la sécrétion de testostérone via son récepteur situé à la surface de ces cellules [387]. La libération de la LH dans la circulation générale suite à un pic de GnRH, induit la stimulation des cellules de Leydig, et plus spécifiquement la transcription des gènes codant pour de nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse de la testostérone.

Des mutations inhibitrices au sein du gène LH-R ont été constatées chez des patients présentant un pseudohermaphrodisme congénital, associé à une sévère hypoplasie des cellules de Leydig, et par conséquent à un faible niveau de testostérone [220, 388]. D'autre part, des mutations inhibitrices de la sous-unité β de la LH aboutissent à une absence histologique des cellules de Leydig, à un non déclenchement de puberté, et à une azoospermie chez les adolescents pourtant phénotypiquement mâles [389]. Au contraire, les patients porteurs d'une mutation activatrice (gain de fonction) constitutive du récepteur à la LH, déclarent quant à eux une puberté précoce [390].

Des souris *KnockOut* pour le récepteur à la LH, ainsi que des souris invalidées pour le gène codant la sous-unité β de la LH ont été générées afin d'étudier l'implication de cette hormone dans les fonctions Leydigiennes. Ces animaux présentent des phénotypes quasi similaires : les mâles mutants sont viables, mais une hypotrophie parallèle à une hypoplasie des cellules de Leydig est observée [221, 391]. En conséquence, le taux de testostérone apparaît considérablement diminué, de même que l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, dont StAR et Cyp17a1 [221, 392]. A l'inverse, il a été démontré qu'une stimulation continue de LH induit, chez le rat mâle adulte, une hypertrophie et une hyperplasie des cellules de Leydig [393].

☞ **FSH.** Des mutations au niveau du gène codant pour la FSH sont également responsables de troubles de la stéroïdogénèse chez les rongeurs et les humains (ex. puberté retardée, niveau

de testostérone diminué) [386]. Etant donné que les cellules de Leydig ne possèdent pas de récepteur à la FSH, ce résultat suggère une interaction paracrine entre les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig. Par conséquent, la FSH agirait sur la régulation de la stéroïdogénèse de façon indirecte. Des études montrent ainsi que la FSH stimule les cellules de Sertoli pour la sécrétion de divers facteurs capables d'agir en synergie avec la LH, activant des enzymes et protéines impliquées dans la stéroïdogénèse (ex. [394, 395]).

☞ **GH.** Le rôle de l'hormone de croissance dans le processus de stéroïdogénèse est à prendre en compte, puisque la déficience en GH est associée à une faible réponse des cellules de Leydig à la LH/hCG chez le rongeur [396].

☞ L'œstradiol

La production de testostérone est inhibée chez les animaux traités aux œstrogènes, alors que le taux sérique de LH n'est pas modifié [397, 398]. En parallèle, des études *in vitro* ont mis en évidence sur des tissus testiculaires murins totaux, ainsi que sur des cellules de Leydig de rat, une diminution de la production de testostérone induite par les œstrogènes [399, 400]. Il a finalement été établi que les œstrogènes ont une influence inhibitrice directe sur la stéroïdogénèse des cellules de Leydig matures par plusieurs mécanismes : i) la réduction du nombre de récepteurs à la LH au niveau des cellules de Leydig [401] ; ii) l'inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de testostérone [402] ; et/ou iii) la limitation du développement et de la prolifération des cellules de Leydig [402]. Toutefois, les mécanismes d'action des œstrogènes ne sont que partiellement élucidés à l'heure actuelle. Enfin, il est important de préciser que le récepteur aux œstrogènes chez le rat est notamment localisé au niveau des cellules de Leydig [328].

☞ La prolactine

La prolactine régule la fonction des cellules de Leydig chez plusieurs espèces [403-406]. Par exemple, des hyperprolactinémies cliniques ou induites, chez des hommes ou des rongeurs respectivement, sont souvent associées à une diminution de la production en testostérone [406]. En revanche, le traitement de rats ayant subi une hypophysectomie avec de la prolactine augmente la réponse de la testostérone à la LH [407]. Cette modulation biphasique de la prolactine a également été observée *in vitro*. En effet, à de faibles concentrations, elle amplifie la réponse des cellules de Leydig vis-à-vis de la LH, et

inversement à de plus fortes concentrations [406]. Enfin, une forte stimulation par la prolactine entraîne la diminution du nombre de récepteurs à la LH au niveau des cellules de Leydig ; et inversement, la stimulation par la LH induit une diminution du nombre de récepteurs à la prolactine [405, 408].

ii. *Contrôle par les facteurs non stéroïdiens*

⌘ L'inhibine et l'activine

L'inhibine et l'activine semblent être impliquées dans la régulation de la stéroïdogénèse. Des études *in vitro* montrent que l'inhibine stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig, alors que l'activine A l'inhibe [409, 410]. Toutefois, aucun changement significatif de la production de testostérone n'a été observé *in vivo* chez les souris invalidées pour les gènes des sous-unités d'inhibine ou d'activine [204]...

⌘ Les cytokines

La synthèse de testostérone peut également être modulée par de nombreux facteurs locaux comme les cytokines inflammatoires, TNF α (*tumor necrosis factor α*) et IL-1 β (*interleukin-1 β*), sécrétées par les macrophages. Ainsi, de fortes concentrations sériques en TNF α et IL-1 β ont été constatées chez des patients présentant de sévères hypogonadismes et de faibles taux plasmatiques de testostérone [411-413]. Par ailleurs, une inhibition de l'activité stéroïdogénique a été observée à la suite d'un traitement systémique avec le TNF α [414], ou lorsque l'IL-1 β a directement été livrée dans le sérum [415, 416] de rats. L'un des mécanismes d'action décrit pour le TNF α consiste en l'inhibition rapide de l'expression de la protéine StAR dans les cellules de Leydig [417, 418]. Il régule notamment la production des stéroïdes par le testicule en diminuant la production de testostérone par les cellules de Leydig via la voie NF κ B, en bloquant l'expression et/ou la production des enzymes impliquées [419, 420], ainsi qu'en stimulant l'expression de l'aromatase [421, 422].

Les facteurs de croissance

Certains de ces facteurs régulent la synthèse de testostérone à différents niveaux, en modulant : la disponibilité en cholestérol, l'expression d'enzymes clé de la stéroïdogénèse, et/ou l'expression du récepteur à la LH.

Par exemple, l'EGF (*epidermal growth factor*) et le TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) produits par les cellules de Sertoli, sont capables de moduler la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig, en régulant directement l'expression des enzymes impliquées [423, 424]. L'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) sécrété par les cellules de Sertoli sous influence de la FSH, et par les cellules de Leydig sous influence de la LH [425, 426], joue également un rôle important dans les fonctions Leydigiennes. Ce facteur accroît le nombre de récepteurs à la LH, par augmentation de la quantité des transcrits [424] du fait de l'allongement de la demi-vie des ARNm [427]. En outre, l'IGF-1 stimule l'expression de gènes codant pour certaines enzymes de la stéroïdogénèse, ainsi que l'activité de celles-ci, parmi lesquelles la 3 β HSD [424, 428].

3. Axe cérébro-testiculaire

L'existence et le rôle de l'axe cérébro-testiculaire (ou axe hypothalamo-hypophysaire testiculaire) ont été suspectés dès le début du siècle, par l'étude de syndromes humains qui associaient des troubles génitaux à des troubles métaboliques, et ont été confirmés expérimentalement. En 1909, Cushing réalisait l'hypophysectomie d'un chien et constatait, entre autres symptômes, l'arrêt des fonctions gonadiques. Cet événement a été vérifié par la suite dans toutes les espèces où l'hypophysectomie a été pratiquée. Plus particulièrement, les rats hypophysectomisés présentent une absence de LH, de FSH, et par conséquent de testostérone. Ceci a pour effet d'entraîner un arrêt de la spermatogenèse au niveau méiotique, qui peut être rétablie par l'administration de LH et de testostérone [206].

Les fonctions gonadiques sont principalement régulées par des interactions endocriniennes entre l'hypothalamus, l'hypophyse, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig. Ces interactions constituent l'axe cérébro-testiculaire. La Figure 35 représente la succession des phénomènes qui forment cet axe [429, 430] :

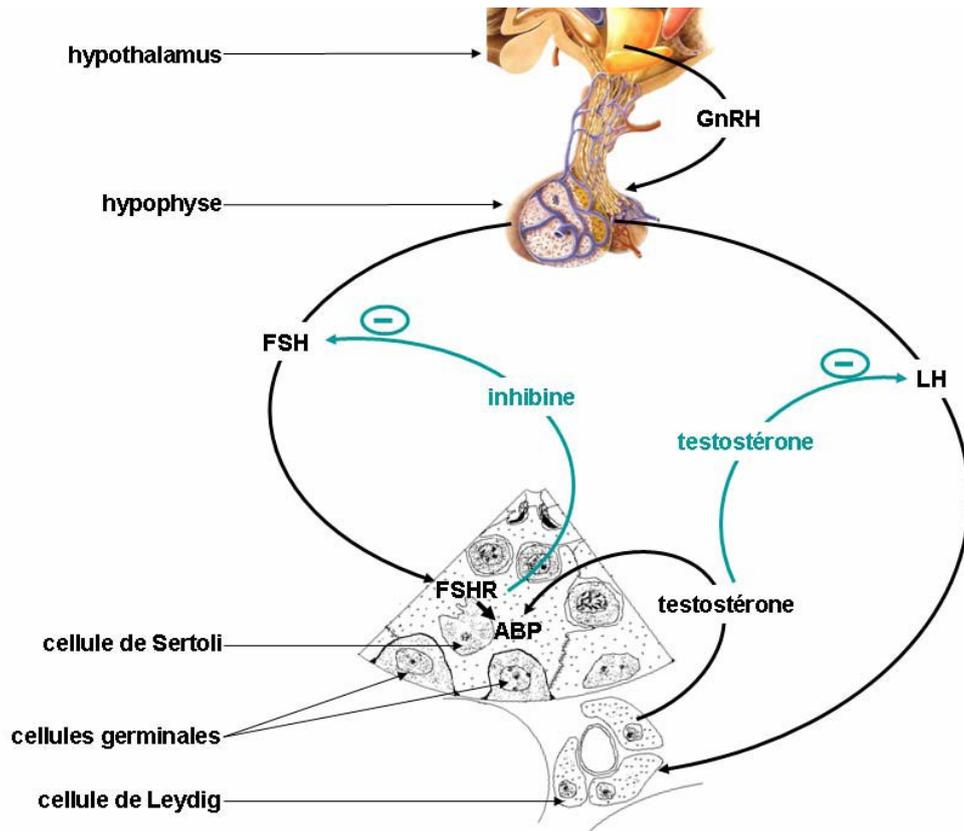


Figure 35 : Mécanismes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique

- ☞ L'hypothalamus sécrète la GnRH qui est transportée jusqu'à l'adénohypophyse par le sang circulant dans le système porte hypophysaire ;
- ☞ La liaison de la GnRH aux cellules hypophysaires entraîne la libération de FSH et de LH dans la circulation générale ;
- ☞ La LH se lie spécifiquement aux cellules interstitielles et les stimule pour qu'elles sécrètent la testostérone (et faiblement des œstrogènes). Les grappes de cellules interstitielles contiennent de nombreux vaisseaux lymphatiques, qui contribuent à la forte concentration locale de testostérone dont bénéficient les tubes séminifères contournés. Le taux de testostérone local est le facteur qui déclenche finalement la spermatogenèse. La testostérone qui entre dans la circulation sanguine produit également plusieurs effets dans d'autres régions de l'organisme (cf. chapitre II, *Biosynthèse, production et action des androgènes par les cellules de Leydig*) ;
- ☞ La FSH stimule la spermatogenèse dans les testicules, mais n'influence toutefois pas directement les cellules germinales. En effet, elle agit sur les cellules de Sertoli qui sécrètent alors l'ABP. L'ABP se lie à la testostérone et permet le maintien d'une concentration élevée

de cette hormone dans les tubes séminifères contournés. La testostérone va se lier aux AR localisés au niveau des cellules de Sertoli et favoriser la poursuite de la méiose et de la spermatogenèse. La FSH contribue donc à rendre les cellules réceptives aux effets stimulateurs de la testostérone ;

☞ L'hypothalamus et l'adénohypophyse peuvent subir l'action inhibitrice de certains facteurs présents dans le sang, dont l'inhibine (cf. chapitre II, *Fonctions de la cellule de Sertoli, cellule de soutien pour la spermatogenèse*) ou les hormones gonadiques. En effet, ces dernières peuvent moduler la sécrétion des gonadotrophines LH et FSH, à la fois en diminuant la synthèse/sécrétion de la GnRH par l'hypothalamus, et/ou en affectant la capacité de la GnRH à stimuler la synthèse/sécrétion des gonadotrophines par l'adénohypophyse [431].

Ainsi, la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig est capable d'exercer un rétrocontrôle inhibiteur sur l'hypothalamus. Ce rétrocontrôle régule à la baisse la sécrétion hypothalamique de GnRH, ce qui conduit à une réduction de la libération de FSH et de LH [432]. L'œstradiol régule également la sécrétion et l'action de la GnRH. Elle agit au niveau de l'hypothalamus pour inhiber la sécrétion de GnRH, et au niveau de l'adénohypophyse pour inhiber les réponses à la GnRH [433]. Enfin, l'œstradiol comme la testostérone est capable d'inhiber directement la libération de LH par l'adénohypophyse [434, 435].

En conclusion, la régulation hormonale de la spermatogenèse et de la production d'androgènes testiculaires peut être interprétée, en première analyse, comme résultant d'un contrôle exercé par l'hypophyse et les gonades. En réalité, on constate que les schémas régulateurs sont plus complexes : (i) d'une part, du fait de l'existence de mécanismes indépendants du système hypothalamo-hypophysaire, impliquant le testicule lui-même ; (ii) et d'autre part, du fait des rétrocontrôles qui s'exercent sur le système hypothalamo-hypophysaire.

CHAPITRE III – TOXICITE TESTICULAIRE

1. Généralités

Compte tenu de la diversité fonctionnelle de l'appareil reproducteur mâle et de la complexité de sa régulation, les substances chimiques ont la possibilité d'affecter de nombreuses cibles, et d'induire un éventail de lésions toxicologiques, primaires comme secondaires. Les cibles de ces effets toxiques comprennent notamment les testicules, les épидидymes, la prostate, les spermatozoïdes, ainsi que le système hormonal. Les conséquences peuvent être multiples : une réduction de la sécrétion en testostérone par les testicules, une altération dans le transport des spermatozoïdes, une malformation génitale, ou encore une atteinte spermatique.

En particulier, l'action de perturbateurs sur le système endocrinien peut entraîner des modifications physiologiques importantes, et avoir un rôle néfaste sur la fonction de reproduction. Devenus un problème potentiel de santé publique, les PE alimentent de nombreux débats et sujets de recherche car ils soulèvent plusieurs problématiques : *Quels sont-ils ? Comment les caractériser et les détecter ? Présentent-ils des propriétés qui leur sont spécifiques ?...* Pour tenter de répondre à ces questions, les profils de toxicité testiculaire établis pour des PE chez le rat peuvent être comparés à ceux de substances, dont la toxicité testiculaire n'est pas médiée par le système endocrinien (toxiques à "action directe"), démarche entreprise durant cette thèse. Ainsi, ce dernier chapitre présente l'essentiel des éléments indispensables à une bonne compréhension de la toxicité testiculaire et des substances étudiées au cours de ce travail. Dans un premier temps, nous rapporterons les altérations induites par les PE au niveau du testicule, puis celles causées par les composés présentant un mode d'action cellulaire direct. Enfin, nous détaillerons plusieurs substances, dont celles utilisées dans ce projet, pour lesquelles la toxicité testiculaire a été largement rapportée dans la littérature.

2. Toxicité testiculaire et perturbateurs endocriniens

A. Contexte et syndrome de dysgénésie testiculaire

Depuis une trentaine d'années déjà, la question d'un déclin de la qualité du sperme humain a été posée [17]. Le débat a été relancé en 1992, après la publication du groupe Danois de Skakkebaek [7]. Il s'agissait d'une méta-analyse reprenant les données de 61 publications traitant de la qualité du sperme durant la période 1940-1990. Selon ces auteurs, il existerait une baisse significative du volume du sperme, et de la concentration en spermatozoïdes passant de 113 millions/ml en 1940 à 66 millions/ml en 1990. Sceptiques quant aux résultats de cette méta-analyse, une étude rétrospective vient renforcer l'hypothèse du déclin de la qualité spermatique en France [14]. Une dizaine d'autres travaux sur le sujet ont été publiés, rapportant une diminution de la qualité du sperme (concentration spermatique, mobilité et caractéristiques morphologiques des spermatozoïdes) dans divers pays, tels qu'en Ecosse [16], en Belgique [436] et en Grèce [13].

En parallèle au déclin de la quantité et qualité spermatique, les fréquences des anomalies du système reproducteur mâle ont connu une hausse importante dans la période 1970-1990, et restent à un niveau élevé [437, 438] (Figure 36). Ainsi, l'incidence du cancer du testicule s'est accrue de façon régulière au cours des trente dernières années, dans tous les pays dans lesquels des études ont été réalisées [438]. C'est également le cas du cryptorchidisme qui est observé chez 2 à 4 % des nouveau-nés, et de l'hypospadias qui atteint 0.3 à 0.7 % des garçons à la naissance. Divers arguments laissent penser que ces affections sont liées entre elles. Il est clairement établi que le cryptorchidisme est un facteur de risque des trois autres anomalies, et que l'hypospadias et l'oligospermie sont des facteurs de risque du cancer testiculaire [439]. Ces quatre altérations correspondraient vraisemblablement à différents symptômes d'un même syndrome : le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) [8, 440].

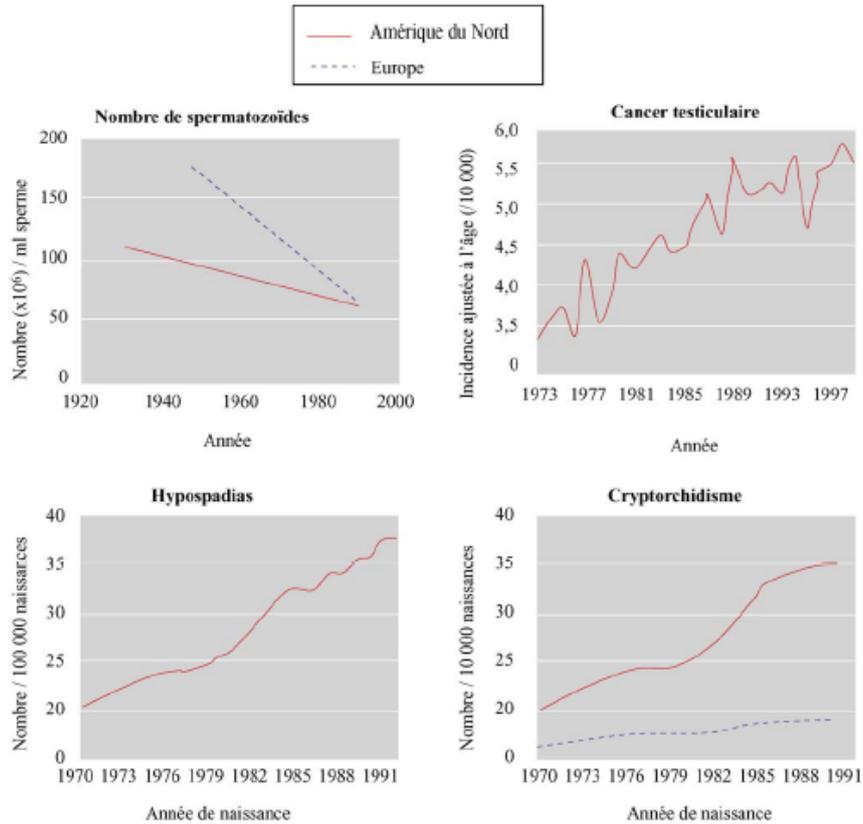


Figure 36 : Évolution du nombre de spermatozoïdes et des anomalies de l'appareil reproducteur masculin au cours des dernières décennies, en Amérique du Nord et en Europe
(D'après Habert *et al.*, 2006)

Deux étiologies ont été évoquées pouvant être à l'origine du TDS : génétique et environnementale. Dans le cas des formes sévères de TDS, les causes premières sont génétiques ; ceci concerne les individus présentant un caryotype 45X/46XY, des mutations au niveau de l'AR, ou encore des mutations du gène *SRY* (*sex determining region Y*) [441]. Cependant, l'augmentation de la fréquence du TDS dans la population générale est incompatible avec le taux de mutations spontanées. En conséquence, l'hypothèse de l'action de facteurs environnementaux est à prendre en considération.

Concernant l'étiologie environnementale, les scientifiques ont donc émis l'hypothèse que les individus développant certaines ou toutes les caractéristiques du TDS ont probablement été en contact avec des substances perturbant le système hormonal pendant la vie fœtale ou néonatale. De nombreuses observations et expériences effectuées au cours des vingt dernières années confortent cette hypothèse, initialement formulée par Sharpe et Skakkebaek en 1993 [442].

Les principaux polluants environnementaux incriminés sont les PE à activité œstrogénique (xéno-œstrogènes) ou à effet anti-androgénique. Il s'agit entre autres de pesticides, d'agents plastifiants, de surfactants, et de phyto-œstrogènes. Le premier argument en faveur de cette hypothèse concerne l'étude de la faune sauvage. Des publications ont relaté des effets délétères consécutifs à l'exposition d'animaux dans leur milieu naturel, à de fortes concentrations de polluants chimiques à propriétés œstrogéniques (cf. chapitre I, *Conséquences potentielles résultant de l'exposition à des perturbateurs endocriniens*). Les atteintes observées varient de changements subtils à des altérations permanentes de la fonction de reproduction, telles que la féminisation ou des changements du comportement sexuel [443]. Chez l'Homme, des données très convaincantes proviennent de la comparaison récente de l'incidence de la cryptorchidie, au cours de ces quarante dernières années, chez les nouveau-nés dans les maternités de Berlin-Est et Ouest [444]. La fréquence de cette anomalie était d'environ 3 à 4 % pendant la période 1965 à 1971 dans les deux parties de la ville. Ce niveau s'est maintenu à Berlin-Est pendant la décennie suivante, alors qu'il a chuté en-dessous de 1 % pendant la même période à Berlin-Ouest. Pendant la décennie 1987–1997, cette incidence décroît dans les deux parties de la ville, soit moins de 0,5 % à Berlin-Ouest et moins de 2 % à Berlin-Est. La corrélation avec l'utilisation du DDT permet d'expliquer l'évolution de ces statistiques. Le DDT et son métabolite le DDE, sont connus pour posséder des activités œstrogénique et anti-androgénique. Le DDT a été largement utilisé en tant que pesticide dans les deux parties de la ville depuis 1960 jusqu'en 1970. Il a été arrêté à Berlin-Ouest dès 1972, alors qu'il était poursuivi à Berlin-Est jusque dans les années 1980, avant d'être définitivement arrêté lors de la réunification de l'Allemagne.

Enfin, les hypothèses émises par Skakkebaek sont étayées par les données obtenues sur des modèles expérimentaux d'exposition fœtale (ou néonatale) de rongeurs aux PE, dont les phénotypes à l'âge adulte reproduisent tout ou une partie des caractéristiques du TDS (cf. paragraphe suivant, *Exemples de perturbateurs endocriniens induisant une toxicité au niveau de l'appareil reproducteur mâle et du testicule*). Ainsi, les données épidémiologiques et expérimentales sont autant d'arguments supportant le concept de programmation précoce des altérations de la qualité spermatique, ou des malformations du tractus génital mâle.

Le déclin spermatique a été discuté dans cette première partie. Les trois autres symptômes constituant le TDS vont être présentés dans les prochains paragraphes : hypospadias, cryptorchidie et cancer du testicule [8]. Dans le cadre de notre travail appréciant les effets délétères qui résultent d'une exposition à l'âge adulte, notre attention se portera majoritairement sur cette dernière atteinte. Un point supplémentaire traitera également des phénomènes de tumeurs et d'hyperplasie des cellules de Leydig induits par certains composés aux propriétés de PE, dont le flutamide, l'un des principaux modèles d'étude exploité au cours de cette thèse. Enfin, plusieurs exemples de PE seront décrits, pour lesquels la toxicité au niveau du testicule a été largement démontrée.

B. Cryptorchidie

Au cours de la vie fœtale, le testicule subit un mouvement de descente, passant d'une position fœtale (abdominale) à une position scrotale [445]. Lors de non descente du testicule dans le scrotum, on parle de cryptorchidie. Dans le cas de testicules non descendus, il est habituel de distinguer deux aspects anatomiques : (i) les testicules cryptorchides vrais, en arrêt sur leur trajet de migration, qui peuvent selon le niveau de cet arrêt, être abdominaux, intracanaux, ou se situer en aval de l'orifice inguinal superficiel ; ou (ii) les testicules cryptorchides ectopiques, plus rares, qui se définissent par la présence du testicule en dehors de son trajet normal de migration (Figure 37). L'anomalie peut être bilatérale. Les testicules inguinaux ou intra-abdominaux seront incapables d'assurer une spermatogenèse normale, en raison d'une température plus élevée en ces endroits que celle régnant dans le scrotum.

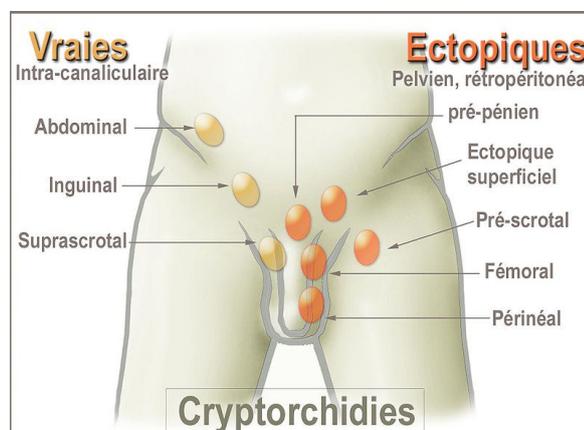


Figure 37 : Différentes formes de cryptorchidie, selon la position du testicule
(D'après <http://fr.wikipedia.org>, Lamiot)

La cryptorchidie est la plus courante des anomalies du nouveau-né. Son incidence varie de 2 à 4%. La cryptorchidie survient lorsque le gubernaculum, formation ligamentaire, n'arrive pas à se développer ou à entraîner le testicule dans le scrotum. Les données disponibles indiquent que l'étiologie de ce désordre serait consécutive à un défaut d'action des androgènes au niveau du gubernaculum. Cette carence de l'activité androgénique peut résulter d'un défaut de développement, n'importe où le long de l'axe cérébro-testiculaire. En effet, une incapacité d'origine hypothalamique fœtale à stimuler les sécrétions gonadotropes au cours du troisième trimestre (syndrome de Kallman et de Prader-Willy, anencéphalie), un défaut de sécrétion testiculaire androgénique (dysgénie gonadique), une absence de conversion de la testostérone en DHT au niveau des tissus cibles (déficience en 5 α -réductase), ou une inefficacité des AR (syndrome d'insensibilité aux androgènes), peuvent tous entraîner une cryptorchidie. Des études complémentaires suggèrent que la migration transabdominale du testicule pourrait être contrôlée par l'Insl3 (*Leydig insulin-like hormone 3*). Cette hormone est sous le contrôle de l'hCG et de la LH [446], et aurait une action sur la prolifération du gubernaculum [447]. En effet, des souris *KnockOut* pour Insl3 présentent une cryptorchidie intra-abdominale bilatérale, mais une androgénisation normale des organes génitaux internes et externes [448]. La cryptorchidie résulterait donc d'anomalies de production ou d'action, de l'Insl3 ou d'androgènes produits par les cellules de Leydig. L'hormono-dépendance de la descente testiculaire a conduit à suspecter le rôle des PE dans l'augmentation de la cryptorchidie [438].

Hosie *et al.* (2000) ont par exemple mis en évidence un taux élevé d'organochlorés dans le tissu adipeux, chez les enfants présentés pour une chirurgie correctrice de la cryptorchidie [449]. Par ailleurs, un certain nombre d'études épidémiologiques corrélient l'apparition d'anomalies du tractus génital mâle, comme la cryptorchidie, à une exposition à des pesticides [118, 119]. Plusieurs PE aux propriétés anti-androgéniques ou œstrogéniques apparaissent également responsables de phénomènes de cryptorchidie chez des animaux de laboratoire. C'est le cas de fongicides tels que la vinclozoline, qui agissent comme antagonistes des AR [450], ou des esters de phtalates comme le phtalate de dibutyle (DBP), qui perturbent la biosynthèse des androgènes [451, 452]. Enfin, certains métabolites des PBDE (polybromodiphényléthers) induisent une augmentation de l'activité de l'aromatase [453], un autre mécanisme conduisant à un ratio déséquilibré androgènes/œstrogènes.

C. *Hypospadias*

L'hypospadias est le développement anormal du pénis sur lequel l'orifice, ou méat urétral, ne se localise pas à l'extrémité du gland pénien. Si l'anomalie d'implantation du méat urétral est l'élément définissant théoriquement l'hypospadias, il faut plutôt considérer cette anomalie comme une hypoplasie des tissus constituant la face ventrale du pénis, dans laquelle il existe une malformation de l'urètre. On retrouve pratiquement toujours une malformation du prépuce qui n'est développé que sur la face dorsale du pénis, laissant à nu la face ventrale du gland. De même, une courbure est souvent identifiée, surtout évidente en érection, habituellement en rapport avec une hypoplasie cutanée ventrale. Dans 70 à 80% des cas, il s'agit d'un hypospadias antérieur, dont la courbure est modérée (Figure 38).

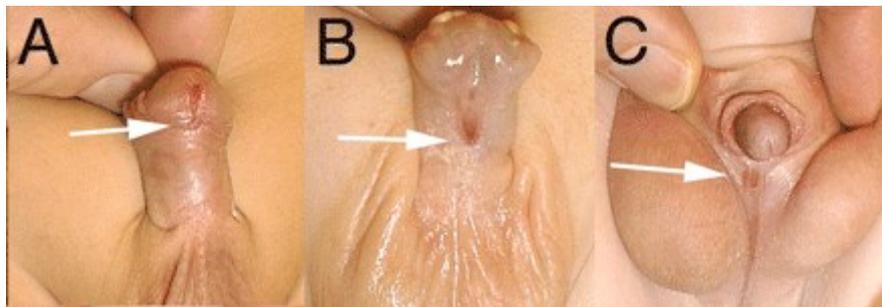


Figure 38 : Exemples d'hypospadias chez l'homme : (A) antérieure, (B) coronale ou (C) distale
(D'après Wang et al., 2008)

L'hypospadias représente la seconde malformation congénitale de l'appareil reproducteur mâle la plus fréquente après la cryptorchidie, actuellement estimée à 1 pour 300 naissances masculines [454]. Une prédisposition génétique non mendélienne à l'hypospadias existe. Toutefois, son incidence a augmenté ces quinze dernières années dans la majorité des pays occidentaux, notamment en Angleterre, au Pays de Galles [455], en Hongrie [456], ou encore en Suède [457]. Une étude réalisée aux Etats-Unis a montré un doublement de la fréquence des hypospadias entre 1968 et 1993 [458]. Puisque la différenciation de l'urètre pénien dépend de la DHT, le phénomène d'hypospadias peut être associé à une altération de l'AR, et/ou du métabolisme de la testostérone.

Ceci suggère donc une implication possible des PE [459-461]. La littérature regorge d'expériences démontrant l'effet de ces substances sur le système reproducteur mâle, capables d'induire des phénomènes d'hypospadias. Cette malformation apparaît généralement chez des rats ou souris mâles, après traitement *in utero* par des substances : (i) à pouvoir œstrogénique

(ex. DES), (ii) inhibant la 5 α -réductase (ex. finastéride), (iii) antagonisant l'AR (ex. vinclozoline), (iv) modulant l'activité des cytochromes P450 impliqués dans la stéroïdogénèse (ex. prochloraz), ou (v) altérant la différenciation des cellules de Leydig fœtales (ex. les phtalates dont le DBP, le diéthylhexylphtalate (DEHP), et le benzyl butyl phtalate (BBP)) [462].

D. Cancers testiculaires

Le cancer du testicule est un cancer rare puisqu'il ne représente que 1 à 2 % des cancers humains ; néanmoins, il constitue le cancer le plus fréquent chez l'homme entre 20 et 35 ans. Deux éléments majeurs caractérisent ce cancer : (i) l'âge de survenue, c'est un cancer qui touche surtout le sujet jeune ; et (ii) l'excellent pronostic, avec un taux de guérison proche de 90 % voire supérieur.

Les cancers testiculaires peuvent toucher un testicule, ou les deux. Selon les cellules atteintes, plusieurs types de cancers, possédant des différences marquées au niveau de leur pronostic (en termes de développement de la maladie et taux de survie) et de leur traitement, sont distingués. Parmi les cancers issus des cellules germinales (95 % des cas), deux types sont généralement décrits :

☞ Les tumeurs séminomateuses, qui représentent 30 à 40 % des cancers du testicule, sont souvent localisées dans le testicule. Elles sont constituées par la prolifération anarchique de cellules dérivées des cellules germinales et présentent un aspect histologique homogène. Ces tumeurs séminomateuses, composée d'un seul contingent séminomateux, se classent en trois catégories : (i) les séminomes typiques ou classiques (80 %) ; (ii) les séminomes anaplasiques (10 %), plus agressifs que les précédents ; et (iii) les séminomes spermatocytaires ;

☞ Les tumeurs non séminomateuses (tumeurs embryonnaires) représentent 60 à 70 % des tumeurs testiculaires. Elles ne sont localisées au niveau du testicule que dans 30 % des cas uniquement. Plusieurs types histologiques sont regroupés dans ce cadre et peuvent être retrouvés, isolés ou associés, au sein d'une même tumeur. Elles comprennent les carcinomes embryonnaires, les tumeurs du sac vitellin (souvent observées chez les enfants de moins de 5 ans), les choriocarcinomes, les tératomes, et les polyembryomes. Un autre type a également été décrit : les tumeurs mixtes. Elles sont souvent composées de plusieurs contingents. Ces

tumeurs mixtes peuvent également être une fusion de composants séminomateux et non-séminomateux. [463]

Les tumeurs non germinales (5% des cas) sont principalement des tumeurs à cellules de Leydig (cf. partie suivante), ou à cellules de Sertoli.

Un certain nombre d'évidences indique que l'incidence du cancer des testicules a augmenté de manière significative ces cinquante dernières années. En s'appuyant sur les données des registres des cancers, l'accroissement de leur fréquence est avéré dans beaucoup de pays dans le monde, comme en Grande-Bretagne [464] ou en Australie [465]. De même, au Danemark, l'incidence du cancer testiculaire a augmenté de 2 à 4% par an chez les hommes âgés de moins de 50 ans [438, 466]. Toutefois, de grandes différences demeurent entre les pays et les ethnies.

Les cancers du testicule sont, suivant les statistiques, quatre fois plus fréquents quand le testicule n'est pas descendu à sa place normale (testicule ectopique ou cryptorchidie) avant l'âge de 6 ans [467, 468]. Un autre facteur favorisant l'apparition de cancer du testicule est l'atrophie testiculaire, qui peut s'observer après les oreillons, après un traumatisme, ou dans les cas de certains syndromes génétiques (syndrome de Klinefelter correspondant à un désordre chromosomique). L'infection par le VIH, l'exposition aux rayons X, aux champs électromagnétiques ou à la chaleur, semblent aussi favoriser la survenue d'un cancer du testicule. L'infertilité représente également un facteur de risque : 1% des patients infertiles développent une tumeur testiculaire [469]. Sur le plan expérimental, l'exposition à des substances œstrogéniques durant la vie fœtale chez l'animal est associée, dans de nombreuses études, à la genèse de tumeurs germinales testiculaires [442, 470]. En effet, l'exposition intra-utérine au diethylstilbestrol (DES) entraîne la survenue de tumeurs testiculaires chez la souris [471]. Cependant, même si l'exposition *in utero* au DES est incriminée dans la survenue de cancer testiculaire chez l'homme [438, 472], aucun lien direct n'a pu être établi entre l'exposition *in utero* aux PE environnementaux et le cancer testiculaire.

En conséquence, la cause de l'augmentation de l'incidence du cancer des testicules n'est pas connue, mais il semblerait que la perturbation du système endocrinien mâle durant le développement fœtal puisse notamment être à l'origine de cette pathologie. Les arguments en faveur de cette hypothèse sont multiples, dont le fait que les cellules tumorales proviendraient de gonocytes ne s'étant pas différenciés normalement en spermatogonies [8]. D'autre part, des

CIS (carcinoma *in situ*) ont été découverts chez des enfants âgés de quelques mois, renforçant l'hypothèse d'une origine fœtale des cellules cancéreuses [473].

E. Hyperplasie et tumeurs des cellules de Leydig

I. Les hyperplasies à cellules de Leydig

Les hyperplasies à cellules de Leydig (HCL) sont marquées par une augmentation du nombre et de la taille de ces cellules, dont les nucléoles sont souvent élargis ou multiples, et les cristalloïdes de Reinke (inclusions éosinophiles) rares. Elles sont non tumorales, et focales ou diffuses. Ce syndrome endocrinien précède souvent le syndrome tumoral. La production locale excessive de testostérone par l'HCL peut expliquer une maturation effrénée des tubes séminifères constatée par certains auteurs [474]. Les limites avec les tumeurs à cellules de Leydig (TCL) sont imprécises. De nombreuses données de la littérature s'appliquent aux TCL, peu de données étant consacrées spécifiquement aux HCL. Par conséquent, il n'existe aucun consensus permettant de différencier HCL et TCL dans les cas difficiles. Les critères de distinction sont fondés principalement sur la taille de la lésion, plutôt que sur les caractéristiques morphologiques ou biologiques. Ainsi, des lésions prolifératives des cellules interstitielles plus petites que le diamètre d'un tube séminifère sont considérées comme une hyperplasie locale. Quelques auteurs ont toutefois souligné l'intérêt de l'analyse ultra-structurale. Les cellules de Leydig des HCL présentent des anomalies permettant de les distinguer des cellules de Leydig normales et des cellules de TCL : les cellules de Leydig des HCL sont dédifférenciées, ressemblant à leurs précurseurs.

L'étiologie est discutée : secondaire, primitive ou congénitale [475]. Les formes secondaires sont rencontrées au cours de l'évolution de pathologies variées : cryptorchidie, syndrome de Klinefelter, insensibilité aux androgènes, hyperplasie congénitale des surrénales, tumeurs productrices de LH ou d'hCG, traitements hormonaux (hCG, anti-œstrogènes). Les formes primitives sont encore appelées autonomes ou idiopathiques. Par ailleurs, il existe entre 14-18 semaines de gestation, une phase d'HCL liée au status hormonal fœtal (hCG, LH) pendant laquelle les cellules de Leydig peuvent constituer jusqu'à la moitié du volume testiculaire [476]. Certains auteurs soulignent que cette période d'HCL est cruciale pour le développement du testicule fœtal, et donc propice à l'apparition d'HCL congénitale [477].

II. Les tumeurs du testicule à cellules de Leydig

Les TCL sont des tumeurs rares chez l'homme, et représentent 1 à 3% de l'ensemble des tumeurs du testicule. Uni- ou bilatérales, elles surviennent dans 75% des cas environ, chez l'adulte. 10 à 15% de ces formes chez l'adulte sont des formes malignes, plus spécialement chez les sujets âgés. Histologiquement, les TCL sont des tumeurs de petit volume constituées uniquement de cellules de Leydig monomorphes, possédant des anomalies cytonucléaires rares (cytoplasme avec vacuoles et inclusions éosinophiles), comprimant occasionnellement les tubes séminifères. Ces tubules ne contiennent le plus souvent que des cellules de Sertoli. Les cellules de Leydig tumorales produisent de la testostérone qui est immédiatement aromatisée en œstradiol, l'activité aromatasé étant significativement augmentée par rapport aux cellules de Leydig normales. L'élévation des taux sériques d'œstradiol entraîne alors par rétrocontrôle négatif, la diminution des gonadotrophines. L'inhibition de la spermatogenèse qui est observée de façon quasi-constante dans les TCL, serait donc consécutive à un mécanisme à la fois endocrine (diminution des gonadotrophines), et paracrine (élévation de la concentration locale en œstradiol).

L'étiologie des TCL demeure inconnue, bien que les phénomènes de cryptorchidie semblent être prédisposant à leur développement dans 5 à 10% des cas [478]. Des troubles associés à une oligospermie seraient également propices au développement de TCL. Par ailleurs, de telles lésions ont été décrites initialement chez des patients porteurs d'un syndrome de Klinefelter avec une élévation des concentrations de LH endogène, chez des patients ayant reçu des injections de hCG, ou ayant une tumeur germinale produisant de l'hCG. [479]

III. Informations supplémentaires

Chez la souris, il a été démontré une filiation "exposition aux œstrogènes-HCL-TCL". Chez l'homme, cette relation est possible mais n'a jamais été démontrée. Un certain nombre de produits chimiques augmentent l'incidence d'HCL et de TCL, en particulier dans les études de toxicité chronique chez le rat. Les mécanismes d'induction demeurent inconnus pour de nombreux composés, cependant certaines généralisations peuvent être faites concernant leurs activités. Elles impliquent principalement des effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire testiculaire ou des interférences avec l'ADN. Parmi les composés n'interagissant pas

directement avec l'ADN, plusieurs modes d'action semblent affecter le contrôle hormonal de la croissance des cellules de Leydig : i) l'antagonisme des AR (ex. flutamide, linuron, et vinclozoline) ; ii) l'inhibition de la biosynthèse de testostérone (ex. lansoprazole, felodipine et isradopine) ; iii) l'inhibition de la 5 α -réductase (ex. finastéride) ; iv) l'inhibition de l'aromatase (ex. aminoglutéthémide) ; et v) l'action d'œstrogènes, de substances GnRH-like ou dopamine-like. Enfin, d'autres composés n'affectant pas l'axe cérébro-testiculaire, apparaissent également capables d'induire des HCL et TCL, tels que les agents responsables de la prolifération des peroxisomes [480, 481].

Les TCL et HCL sont fréquentes chez le rat (souche Fischer 344 en fin de vie : 100%), qu'elles soient spontanées ou provoquées, alors qu'elles sont plus rarement rapportées chez l'homme. D'importantes différences entre l'homme et le rat existent pouvant expliquer ce phénomène, dont le nombre ou la présence de récepteurs à la LH ou à la GnRH, au niveau des cellules de Leydig (14 fois plus de récepteurs à la LH chez le rat que l'homme, absence de récepteur à la GnRH au niveau des cellules de Leydig humaines). Ceci rend sans doute les cellules de Leydig de rat plus sensibles aux modifications des taux circulants de LH/GnRH que celles de l'homme, d'où une évaluation du risque pour la santé humaine peu pertinente [481].

F. Exemples de perturbateurs endocriniens induisant une toxicité au niveau de l'appareil reproducteur mâle et du testicule

∞ Le cas du **diethylstilbestrol (DES)**, molécule prescrite dans les années 1950-1960 pour limiter les risques de fausse-couches et d'accouchements prématurés, offre une démonstration claire de l'effet d'une substance agissant comme un PE. Le DES est un dérivé non stéroïdien du stilbène avec une activité œstrogénique comparable à un œstrogène naturel, tel que le 17 β -œstradiol. Dans la fin des années 1950, il a été très largement prescrit en cures répétées à des doses croissantes aux femmes enceintes, en cas de déficience en œstrogènes, ou chez l'homme lors de traitements de tumeurs prostatiques. Outre le fait que de nombreuses publications ont rapporté des effets délétères chez la progéniture femelle, des anomalies de l'appareil reproducteur de la descendance mâle ont aussi été mises en évidence [115, 482, 483]. Des études épidémiologiques ont ainsi pu démontrer une augmentation du risque de développement d'hypospadias, de cryptorchidies, de kystes épидидymaires, d'inflammations

testiculaires et d'hypospermies chez les fils de femmes traitées au DES pendant leur grossesse [114, 115]. L'ensemble des données sur l'Homme constitue le seul lien établi de façon indiscutable entre une exposition à un PE au cours de la gestation et des effets délétères sur la santé humaine, notamment au niveau de l'appareil reproducteur. De ce fait, l'utilisation du DES a été interdite en 1977.

Les effets et les mécanismes d'action du DES ont été largement décrits sur des modèles animaux et *in vitro*. Ainsi, l'exposition prénatale de souris mâles au DES induit des effets néfastes comparables à ceux observés chez l'homme comme la non-descente testiculaire, l'apparition de kystes épидидymaires, la rétention des canaux Müllériens et des perturbations de la spermatogenèse [484, 485]. L'exposition néonatale au DES chez le rongeur induit des altérations au niveau de l'appareil reproducteur mâle caractérisées par une chute du poids des testicules, des épидидymes, des vésicules séminales, ainsi que de fortes altérations de la spermatogenèse par apoptose des cellules germinales [486-488]. Le DES possède également une forte affinité pour l'ER- α : ce récepteur jouerait un rôle central dans la médiation des effets du DES *in vivo*, via l'altération de l'expression des gènes *Hox* et *Wnt*. Enfin, le DES a été décrit comme capable d'affecter la stéroïdogénèse. En effet, l'accumulation du transcrite codant le cytochrome P450scc, impliqué dans les premières étapes de cette voie de biosynthèse, est diminuée de façon dose-dépendante après traitement au DES [489, 490].

☞ La **vinclozoline** est un fongicide dicarboximide utilisé dans les cultures viticoles, de fruits, de légumes, et de céréales ou pour les plantes ornementales. Les effets de la vinclozoline au niveau du système hormonal sont dus à ses deux métabolites, M1 et M2, qui sont capables de se lier à l'AR et l'antagoniser [491, 492]. Ils peuvent ainsi inhiber la transactivation de l'AR, faciliter la dégradation des androgènes et inhiber l'expression des gènes androgéno-dépendants [492]. Au regard de son mécanisme d'action, l'exposition à la vinclozoline pourrait vraisemblablement causer des anomalies chez l'homme, mais actuellement aucune étude épidémiologique fiable n'a encore établi de lien avec la pathologie humaine. La majeure partie des informations proviennent donc des modèles expérimentaux animaux.

Des études ont mis en évidence les effets délétères de la vinclozoline chez des rats mâles exposés *in utero*. Une apparition quasi-systématique de malformations du tractus reproducteur a été rapportée, en comparaison aux rats contrôles chez lesquels aucune malformation n'a été observée. Ces atteintes sont diverses : hypospadias avec pénis fendu, apparition d'une poche vaginale, atrophie de l'épididyme, ectopie testiculaire ou

cryptorchidie, et retard de la séparation prépuçiale [493-496]. Par ailleurs, l'exposition fœtale à la vinclozoline induit une apoptose des cellules germinales, ainsi qu'une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes à l'âge adulte [497-500]. Des rats immatures soumis à une exposition à la vinclozoline présentent un retard dans le démarrage de la puberté, ainsi qu'une augmentation du niveau de LH et de testostérone plasmatiques [494, 501]. Enfin, une administration de vinclozoline à des rats matures entraîne une hyperplasie des cellules de Leydig, des atteintes hormonales (augmentation du niveau de testostérone, LH et FSH), une atrophie de la prostate et des vésicules séminales, ainsi qu'une réduction de la production spermatique [152, 502].

☞ Les **phtalates**, très largement utilisés comme plastifiants depuis les années 1930, entrent dans la composition d'une grande variété de produits : emballages de laits infantiles ou de cosmétiques, peintures et jouets en PVC pour enfants. Etant donné que les phtalates ne sont pas liés de façon covalente à la matrice dans laquelle ils sont ajoutés, ils peuvent progressivement être libérés avec le temps. Ainsi, l'Homme est continuellement exposé aux phtalates par voie orale, cutanée et par inhalation [503]. Les phtalates les plus largement utilisés sont le di(2-ethylhexyl) phtalate (DEHP) et le dibutyl phtalate (DBP). Certaines études ont pu corrélérer la concentration urinaire en phtalates chez la mère avec une diminution de la distance anogénitale chez les fils, caractéristique d'un effet anti-androgénique [504] ; ou encore associer la concentration urinaire de certains phtalates chez des hommes à une réduction de la qualité spermatique ou de la fertilité [505, 506].

L'exposition de rats à divers phtalates au cours de la différenciation sexuelle entraîne de nombreuses anomalies de l'appareil reproducteur, qui incluent notamment : une diminution de la distance anogénitale, une rétention des aréoles et mamelons, des phénomènes de cryptorchidie et d'hypospadias, une atrophie testiculaire, une diminution de la production spermatique, une hyperplasie ou adénomes des cellules de Leydig, ou encore une diminution du poids de la prostate [493, 503, 507, 508]. Ces lésions sont à relier à une action anti-androgénique, dont les mécanismes restent à déterminer. En effet, les phtalates ne se lient pas aux AR, mais induiraient une diminution de la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig, et donc une diminution du taux de testostérone pendant la vie fœtale, période critique de différenciation de l'appareil génital [509]. Ces composés ont également été décrits comme pouvant affecter le système reproducteur chez l'animal adulte. Par exemple, le DEHP induit une atrophie des testicules de rat, mécanisme qui passerait par l'intermédiaire des cellules de Sertoli [510]. De plus, l'administration de DBP provoque une augmentation du niveau de LH

et une diminution du niveau de testostérone plasmatique, mais aucun effet au niveau des organes génitaux n'est observé [152].

G. *Modèle de perturbateur endocrinien : un anti-androgène, le Flutamide*

Le flutamide [2-méthyl-N-(4-nitro-3-(trifluorométhyl)phényl)propanamide] est un anti-androgène non stéroïdien, appartenant à la catégorie des hormones de synthèse (Figure 39). Il est utilisé notamment dans le traitement des cancers de la prostate avec métastases, dans le cadre d'une thérapie dite de privation androgénique en association avec une castration médicale ou chirurgicale [511, 512]. Il est également préconisé lors d'hirsutisme majeur chez la femme (apparition d'une pilosité de type masculine).

Le flutamide est rapidement absorbé et métabolisé en 2-hydroxyflutamide dans le foie (Figure 39). Chez l'homme, le pic plasmatique du flutamide est atteint en 2 heures environ, et la demi-vie plasmatique de son métabolite est d'environ 6 heures chez le jeune sujet, et de 8 heures chez le sujet âgé.

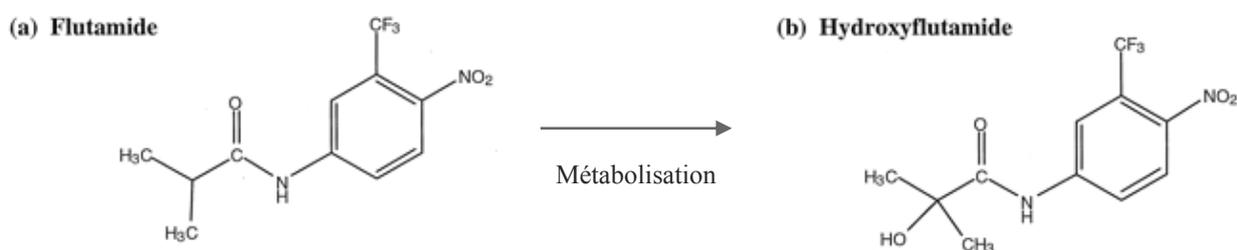


Figure 39 : Structure chimique du flutamide et de son métabolite actif

Les effets du flutamide passent principalement par son métabolite, l'hydroxyflutamide, qui est capable de se lier à l'AR au niveau des cellules cibles [513] avec une affinité supérieure à celle du flutamide. De façon compétitive, il va inhiber la liaison des androgènes (testostérone et DHT) à leur récepteur, et empêcher ainsi la liaison de l'AR au niveau des éléments de réponse aux androgènes (ARE) [514, 515]. Il module donc la transcription des gènes androgéno-dépendants [516]. Le flutamide est également capable de bloquer le rétrocontrôle de la testostérone au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Ceci induit une augmentation de sécrétion de LH, provoquant une augmentation de

production et de sécrétion de testostérone, ainsi qu'une stimulation des cellules de Leydig entraînant leur hyperplasie [517].

La production d'androgènes pendant la vie fœtale est maximale et absolument nécessaire au développement normal de l'appareil reproducteur. De ce fait, des rats mâles exposés au flutamide pendant cette période développent un certain nombre d'anomalies génitales à l'âge adulte, caractéristiques d'une exposition à un anti-androgène. Parmi ces effets délétères, cryptorchidie, atrophie de la prostate, féminisation des organes génitaux externes, rétention des mamelons [518-523], diminution du poids des testicules, et altérations de la spermatogenèse [520] peuvent être observés chez le rat adulte. Les anomalies affectant les cellules germinales observées chez ces animaux, seraient liées à une activation chronique de l'apoptose. Celle-ci touche spécifiquement les spermatocytes et les spermatides au sein des tubes séminifères en stades androgéno-dépendants VI-VIII [524-526]. Ce phénomène semble être la conséquence d'un défaut d'activité des cellules de Sertoli après traitement [527]. A noter que les animaux exposés prénatalement au flutamide présentent des taux de testostérone, de FSH et LH normaux à l'âge adulte [519].

Un traitement néonatal de rongeurs par le flutamide induit au niveau du testicule pré-pubère des anomalies des tubes séminifères, une hyperplasie des cellules de Leydig et une diminution du poids des testicules, associées à une augmentation du taux de testostérone intra-testiculaire [528]. De récentes études montrent également que le flutamide après cette même exposition, est capable de perturber la spermatogenèse, et plus spécifiquement l'étape de spermio-genèse. Il altère les jonctions spécialisées entre les cellules de Sertoli et les spermatides, ainsi que l'acrosome et le noyau des spermatides [529, 530].

L'administration de flutamide à des rats mâles adultes engendre un dérèglement de la balance hormonale, par augmentation du niveau de LH et de testostérone. Une diminution du poids des organes androgéno-dépendants (prostate, vésicules séminales, épидидymes) et une hyperplasie des cellules de Leydig sont également observées [150, 151]. En réduisant la dose de flutamide administrée [531] ou la durée d'exposition [532, 533], les mêmes atteintes sont constatées de façon moins sévère. Dans la littérature, plusieurs études rapportent également l'effet du flutamide au niveau de la spermatogenèse chez le rat adulte. Une dégénérescence des spermatocytes et une diminution du nombre de spermatides rondes et allongées ont ainsi été identifiées [517]. Par conséquent, l'exposition d'animaux adultes à des doses quasi comparables à celles utilisées *in utero* cause des effets similaires au niveau du testicule (ex.

apoptose des cellules germinales). Toutefois, alors qu'une exposition fœtale provoque une apoptose chronique des cellules germinales adultes, une exposition chez l'adulte provoque des altérations testiculaires réversibles après arrêt du traitement [524].

Enfin, certaines études ont montré qu'à différentes fenêtres d'exposition, le flutamide était capable d'induire une modulation de l'expression de gènes androgéno-dépendants [534-537], parmi lesquels les gènes codant le P450scc (Cyp11a1), la 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase de type I (3 β HSD), la protéine StAR, la lactose déhydrogénase-c, et les sous-unités LH β et FSH β .

Par ailleurs, le flutamide est fréquemment utilisé comme molécule de référence dans les études conventionnelles de toxicologie (test de Hershberger, études suivant la ligne directrice 407 de l'OCDE,...), visant à détecter les composés ayant une activité potentielle de type PE [150-152, 531, 538].

3. Toxicité testiculaire et substances à "action directe"

Le défi d'un pathologiste consiste en l'identification du site d'atteinte primaire de la lésion. Cette analyse fournit un aperçu de la pathogénèse de la lésion morphologique, du déficit fonctionnel et/ou suggère de potentiels mécanismes de toxicité. En effet, les substances agissant par l'intermédiaire d'une cellule spécifique ou selon un mode d'action précis, aboutissent généralement à un schéma similaire de changements morphologiques et physiologiques.

A. Effets adverses sur les cellules de Sertoli

La vacuolisation ainsi que le gonflement des cellules de Sertoli constituent les conséquences physiologiques/morphologiques majeures en réponse à une atteinte toxique (Figure 40 A et B). Dans certains cas, les vacuoles sont nombreuses et discrètes ; dans d'autres, les microvacuolisations du cytoplasme sont clairement apparentes. Les vacuoles sont généralement localisées au sein du réticulum endoplasmique lisse. Elles ont été décrites

comme un événement précoce suite à l'exposition à de nombreux composés, dont la 2,5-hexanédione [539], la cyclohexylamine [540], le 1,3-dinitrobenzène [541], et le tri-ocresyl phosphate [542].

L'atteinte des cellules de Sertoli a des conséquences potentiellement graves, en raison de son rôle central dans le soutien de la spermatogenèse. Bien que l'apoptose de ces cellules soit rare, les voies métaboliques ainsi que les systèmes de régulation sont facilement perturbés. De ce fait, consécutivement à la vacuolisation des cellules de Sertoli, une dégénérescence des cellules germinales, ainsi qu'une désorganisation et une exfoliation sont généralement constatées. Le devenir des cellules germinales est fonction de la nature du toxique, et est probablement lié à la nature de la perturbation fonctionnelle au sein de la cellule de Sertoli. Dans le cas de la 2,5-hexanédione et de la cyclohexylamine (après exposition prolongée), la dégénérescence des cellules germinales est progressive, avec la formation fréquente d'agrégats de spermatides multinucléées [539, 540] (Figure 40C). Dans le cas du 1,3-dinitrobenzène, l'atteinte des cellules de Sertoli est rapide (quelques heures suivant l'administration). Leur vacuolisation est suivie par une dégénérescence et une phagocytose, principalement des spermatocytes à divers stades du cycle spermatogénique [541, 543]. Certains composés, comme le méthanesulfonate de méthyle, induisent également une importante exfoliation des cellules germinales dans la lumière tubulaire (Figure 40D). D'autres substances encore, causant un dysfonctionnement des cellules de Sertoli, affectent la spermiation : les spermatozoïdes matures ne parviennent pas à être libérés dans la lumière, et sont alors phagocytés par les cellules de Sertoli. Parmi ces toxiques, on peut citer l'acide borique [544, 545], l'acide dichloroacétique, les acides bromoacétiques [546], ainsi que les composés responsables d'une réduction du niveau de testostérone [547, 548].

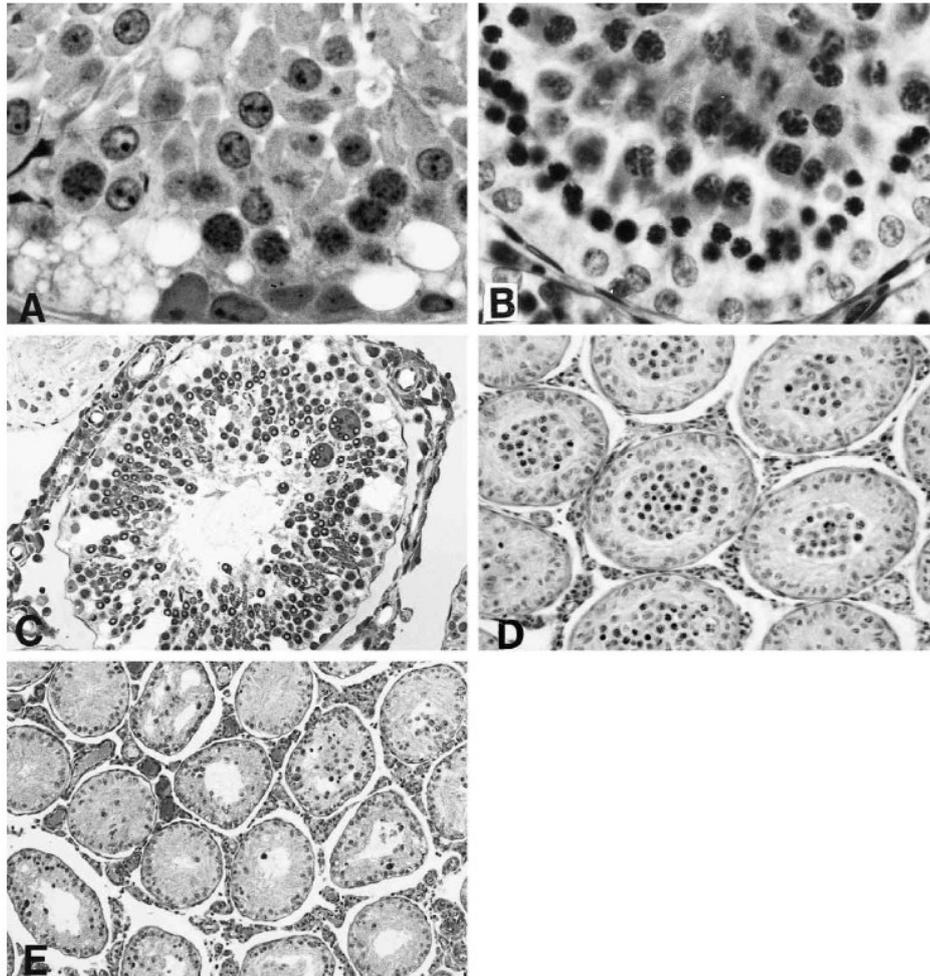


Figure 40 : Atteinte des cellules de Sertoli en réponse à un composé toxique

Réponse primaire : vacuolisation (A) et gonflement (B) ; Réponse secondaire : dégénérescence progressive (C), exfoliation rapide dans la lumière du tube (D), ou disparition totale (E) des cellules germinales. (D'après Creasy *et al.*, 2001)

Selon la durée et la sévérité de l'atteinte des cellules de Sertoli, l'appauvrissement en cellules germinales peut être partiel ou complet (Figure 40E). En effet, les cellules de Sertoli resteront généralement intactes, car bien qu'elles soient très sensibles aux toxiques, elles sont remarquablement résistantes à la mort cellulaire. Mais il est probable que leur fonction soit définitivement compromise, et la spermatogenèse irréalisable, ou au mieux incomplète.

Malgré un nombre important d'études portant sur les substances ayant pour cible directe les cellules de Sertoli, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette toxicité ne sont pas complètement compris. Il est très facile d'observer des altérations cellulaires, mais plus difficile d'en déterminer la cause. Néanmoins, les composants du cytosquelette ont été identifiés comme cibles primaires pour un certain nombre de substances toxiques affectant les cellules de Sertoli. En effet, la fonction du cytosquelette est au centre de nombreuses activités

Sertoliennes, y compris l'adhésion des cellules germinales aux cellules de Sertoli, le mouvement des cellules germinales de la base du tube vers la lumière, et les fonctions de sécrétion des cellules de Sertoli. Il a par exemple été rapporté que la 2,5-hexanédione et la colchicine interfèrent dans l'assemblage des microtubules au sein de ces cellules [549, 550].

B. Effets adverses sur les cellules germinales

Les différentes populations de cellules germinales, que ce soit les spermatogonies, les spermatocytes ou les spermatides, affichent une sensibilité qui leur est propre face aux substances toxiques. Toutefois, dans le cas d'atteinte sévère, les cellules germinales cibles vont rapidement entrer en apoptose, et être phagocytées par les cellules de Sertoli, laissant ainsi un tubule appauvri. Cet événement précoce s'accompagne d'une diminution progressive de la maturation des cellules résiduelles [551].

Certaines substances toxiques affectent leurs cellules cibles uniquement au cours d'un stade précis du cycle spermatogénique. La mort cellulaire induite par les éthers de glycol est un exemple classique [552]. Dans les 12 heures suivant l'administration unique de ce composé, les spermatocytes pachytènes commencent à entrer en apoptose (Figure 41). Dans les 48 heures suivant l'administration, les spermatocytes apoptotiques ont été phagocytés par les cellules de Sertoli, ne laissant aucune trace de mort cellulaire.

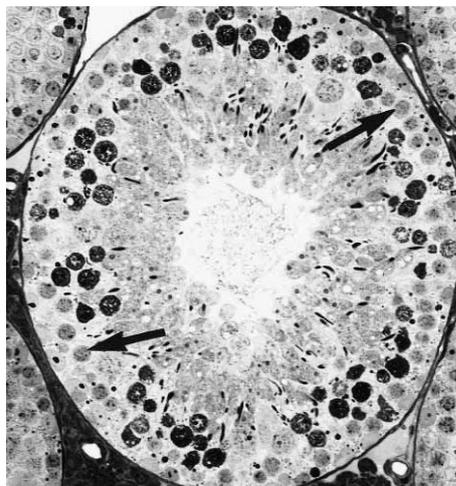


Figure 41 : Spécificité cellulaire de l'apoptose des cellules germinales
Apoptose des spermatocytes pachytènes, les spermatocytes zygotènes sont normaux (flèches)
(D'après Creasy *et al.*, 2001)

La spermatogenèse consiste en la division de spermatogonies en spermatocytes, puis en spermatides. En conséquence, la perte d'une population cellulaire se traduira par la perte progressive de tout autre type cellulaire résultant. Les tubules ne contiendront plus que les cellules de Sertoli et les cellules germinales aux stades précoces, donnant ainsi l'impression d'un arrêt de la maturation. Si les spermatogonies ne sont pas affectées, elles reconstitueront en permanence la population germinale, néanmoins ceci ne peut avoir lieu qu'en présence de cellules de Sertoli totalement compétentes.

Le temps nécessaire aux toxiques pour impacter la fertilité dépend de la population ciblée par le toxique. Par exemple, l'atteinte des spermatogonies chez le rat induit une réduction de la fertilité dans les 8 à 10 semaines suivant l'exposition. Il s'agit du temps nécessaire à l'achèvement du développement des spermatocytes et spermatides dans les testicules, ainsi qu'au passage des spermatozoïdes à travers l'épididyme. Ce délai dépend évidemment des espèces, puisque la durée de la spermatogenèse est spécifique à chacune. Chez la souris, qui possède un cycle spermatogénique plus court, le délai entre l'apoptose des spermatogonies et l'apparition d'une qualité spermatique réduite, est de l'ordre de 6 à 8 semaines. D'autre part, le temps nécessaire au bon rétablissement de la spermatogenèse après une atteinte dépend de sa sévérité, de la population de cellules germinales affectée, et de la durée du cycle de la spermatogenèse. Si la toxicité affecte uniquement l'élongation des spermatides, la récupération de la spermatogenèse testiculaire sera en grande partie achevée en 14 jours chez le rat, et environ 9 jours chez la souris. Un supplément de 10 à 14 jours sera requis avant qu'un nombre significatif de spermatozoïdes n'atteignent la queue de l'épididyme. En revanche, si le composé cible les spermatogonies, la reprise d'une spermatogenèse correcte nécessitera environ 7 à 8 semaines chez le rat, et 5 à 6 semaines chez la souris, avant que des spermatozoïdes ne soient libérés dans le testicule, et à nouveau 10 à 14 jours supplémentaires pour le transit dans l'épididyme. [551]

Tout comme les toxiques agissant au niveau des cellules de Sertoli, les mécanismes moléculaires de la plupart des substances ayant pour cibles les cellules germinales restent inexplorés ou ignorés. La toxicité des éthers de glycol, restreinte à un stade transitoire du développement d'un type cellulaire, devrait fournir des indices. Cependant, la complexité des événements métaboliques propres à chaque stade du cycle spermatogénique, ainsi que les interactions et interdépendances entre les cellules germinales, les cellules de Sertoli et de Leydig à différents étapes du cycle, fournissent une pléthore de cibles potentielles, dont la plupart sont difficiles à analyser séparément.

L'un des seuls mécanismes d'action parfaitement élucidé à l'heure actuelle, comprend les effets cytotoxiques d'agents anti-mitotiques sur la prolifération rapide des spermatogonies. Ces toxiques dont le busulfan ou la cyclophosphamide, ciblent la réplication de l'ADN au sein de sous-populations précises. En général, ces substances affectent les spermatogonies en différenciation, laissant les spermatogonies souches intactes [553, 554]. Les spermatogonies sont situées dans le compartiment basal du testicule ; elles peuvent donc être exposées à des toxiques présents dans le fluide interstitiel. Inversement, les spermatocytes et les spermatides sont situés dans le compartiment adluminal du tube, protégés du compartiment interstitiel par les jonctions serrées présentes entre les cellules de Sertoli adjacentes. Ainsi, l'accès restreint aux substances toxiques dans le compartiment adluminal est la raison pour laquelle la division des spermatocytes et spermatides est relativement résistante aux cytotoxiques.

C. Effets adverses sur l'équilibre hydrique dans le testicule

La sécrétion de liquides dans les testicules joue un rôle important dans l'acheminement : (i) de l'oxygène et des nutriments du sang aux tubules via le fluide interstitiel, (ii) des spermatozoïdes et protéines du tubule au *rete testis* via le fluide testiculaire des tubes séminifères. Ces deux fluides représentent également un moyen de transport non négligeable des facteurs paracrines entre cellules voisines, au sein du testicule (pour revue, voir [555]).

☞ **Effets sur le fluide interstitiel.** Sa composition est similaire à celle du plasma des testicules, avec toutefois de fortes concentrations en testostérone et androstènedione sécrétées par les cellules de Leydig. Le volume de ce fluide est déterminé par la perméabilité des cellules endothéliales de la microvascularisation testiculaire, et est régulé en partie par des facteurs sécrétés par les cellules de Leydig et les tubes séminifères [556, 557]. Des études expérimentales ont démontré que le volume du fluide interstitiel apparaît diminué après hypophysectomie et traitement à l'œstradiol [558], ou suite à une administration d'éthanol [559]. A l'inverse, il est augmenté après administration d'hCG ou d'agonistes de la GnRH [560, 561], après obstruction du drainage lymphatique lors de dommages de l'endothélium consécutifs à une administration de cadmium, ou encore en réponse secondaire à une réduction de la spermatogenèse et une contraction tubulaire. L'augmentation du volume

interstitiel est difficile à évaluer, et devrait s'illustrer par une augmentation du poids des testicules.

☞ **Effets sur le fluide des tubes séminifères.** Une perturbation de l'équilibre du fluide tubulaire est plus facilement perçue. Ce fluide est produit par les cellules de Sertoli, et est en grande partie réabsorbé par le *rete testis*, les canaux efférents et l'épithélium de l'épididyme. Il contient une grande quantité de molécules sécrétées par les cellules de Sertoli (ex. ABP et inhibine), et sert également de moyen de transport aux spermatozoïdes matures libérés dans la lumière tubulaire. Les mouvements du fluide des tubes séminifères vers le *rete testis* sont contrôlés en partie par la contraction des cellules péritubulaires myoïdes. Plusieurs substances affectent la contraction de ces cellules, dont l'ocytocine, l'endothéline-1, et les prostaglandines [167, 562]. La production de ce fluide par les cellules de Sertoli est androgéno-dépendante, et est également contrôlée par les cellules germinales [557, 563]. Par conséquent, son équilibre est aussi fonction de la concentration locale en androgènes, des cellules germinales, du taux de sécrétion, du transport et du taux de réabsorption par le *rete testis* et l'épididyme. Des modifications de l'un de ces paramètres peuvent induire une dilatation ou contraction de la lumière tubulaire.

Une dilatation est généralement associée à une augmentation du poids des testicules, indicateur important d'accumulation du fluide. Une légère dilatation tubulaire n'induit aucun effet délétère au niveau de la spermatogenèse ; par contre, une dilatation marquée ou prolongée peut causer la stase du sperme et/ou une spermatoçèle (gonflement et tension du testicule et de ses annexes par l'accumulation de sperme) au sein des tubules distendus. Une dilatation tubulaire sévère est souvent consécutive à une obstruction circulatoire. La carbendazime cause par exemple, des altérations spécifiques de l'épithélium des canaux efférents. L'accumulation de débris cellulaires et d'infiltrats inflammatoires peut ainsi entraîner une obstruction de l'ensemble du système canalaire [564]. Ceci peut *in fine* provoquer une dilatation sévère des tubes séminifères, et une absence de spermatozoïdes dans l'épididyme. D'autre part, une réduction de la sécrétion du fluide et une contraction tubulaire sont induites par de multiples substances toxiques testiculaires. Dans de nombreux cas, il s'agit d'une réponse secondaire à la perte/diminution de cellules germinales. Néanmoins, ces altérations peuvent également résulter d'événements précoces, consécutifs à la perturbation de la fonction des cellules de Sertoli, ou à une réduction considérable du niveau de testostérone testiculaire [551].

➤ **Effets sur la circulation sanguine.** L'épithélium séminifère est métaboliquement très actif, mais il est avasculaire, et dépend donc du transport de l'oxygène et des nutriments à partir des vaisseaux du compartiment interstitiel. Les sels de cadmium présentent une toxicité hautement spécifique pour les cellules endothéliales des capillaires testiculaires chez le rat (après la puberté), et entraînent une augmentation rapide et massive de leur perméabilité. L'œdème en résultant réduit nettement la circulation sanguine et provoque une nécrose ischémique du testicule, impliquant tous les types cellulaires [565]. Des effets moins sévères peuvent être observés avec des composés vasoactifs, responsables de nécrose tubulaire localisée. Des infiltrats inflammatoires pénètrent alors dans les tubules en nécrose, et induisent une fibrose [551]. Enfin, les effets toxiques sur la circulation sanguine résultent également en des degrés divers d'hypoxie. Les conséquences d'une hypoxie sur la spermatogenèse n'ont, à ce jour, pas été étudiées en détail. Toutefois, quelques études suggèrent une sensibilité accrue des spermatogonies [566].

D. Effets adverses sur les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig constituent le siège de la stéroïdogénèse. Par conséquent, tout toxique induisant des lésions cellulaires à ce niveau, est responsable de troubles fonctionnels de l'équilibre hormonal, et peut donc être considéré comme un PE. Certains composés dont l'éthane diméthane sulfonate, ciblent en premier lieu les cellules de Leydig, entraînant leur rapide dégénérescence. La chromatine de ces cellules se condense, des vacuoles cytoplasmiques sont visibles. Finalement, les macrophages phagocyteront les cellules lésées. En conséquence, une réduction voire une suppression de la synthèse en androgènes [567] et une altération de la spermatogenèse sont constatées. La frontière entre perturbateur du système endocrinien et toxique à "action directe" est mince dans ce cas précis.

L'examen histopathologique d'effets associés à une diminution du taux de testostérone est suffisamment caractéristique pour pouvoir être reconnu [548]. Une concentration intratesticulaire élevée en testostérone est nécessaire au maintien de la spermatogenèse, ainsi qu'à son efficacité maximale. Un niveau réduit de testostérone entraîne donc une altération de ce processus. En particulier, la fonction des cellules de Sertoli et le développement des cellules germinales au cours des deux stades VII et VIII du cycle de la spermatogenèse sont fortement dépendants du taux de testostérone. Par conséquent, si ce niveau est diminué, une

augmentation de l'apoptose des cellules germinales sera observée, notamment celle des spermatocytes pachytènes (Figure 42 A, flèches). L'élongation subséquente des spermatides est également tributaire du niveau de testostérone lors des étapes VII et VIII [568]. Un niveau insuffisant provoque leur dégénérescence progressive, puis leur épuisement au cours de la première semaine de déclin en testostérone (Figure 42 B). La dégénérescence et la déplétion des spermatocytes pachytènes et spermatides rondes sont considérées comme les marqueurs les plus sensibles d'une production de testostérone réduite. D'autres indicateurs de la réduction du taux plasmatique de testostérone existent, tels que la taille des vésicules séminales et de la prostate [551].

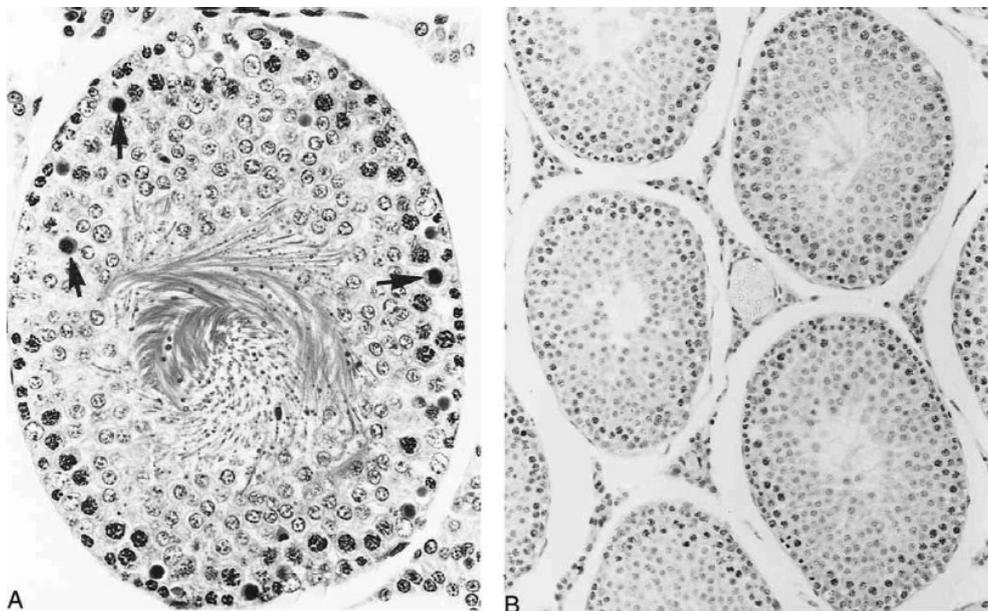


Figure 42 : Lésions observées suite à une réduction du niveau de testostérone
A. Apoptose des spermatocytes et B. Epuisement des spermatides en absence de testostérone
(D'après Creasy *et al.*, 2001)

E. Exemples de toxiques testiculaires à "action directe"

☞ La **2,5-hexanédione** (HD) est un métabolite du *n*-hexane [569], une toxine environnementale et industrielle autrefois utilisée dans la peinture. À l'heure actuelle, il n'existe aucune étude sur la toxicité reproductive de la HD chez l'Homme. Chez le rat adulte, ce composé est responsable de neuropathies périphériques [570] et d'atteintes testiculaires [569]. En particulier, le traitement à la HD cause des réductions significatives du poids des

testicules [571-574]. Toutefois, un délai entre l'administration de la substance et le développement des lésions est constaté [575]. Ceci est dû au fait que ce composé forme des adduits avec les protéines, y compris la tubuline. Il modifie ainsi la dynamique des microtubules [549], et induit une distribution anormale de la tubuline, de l'actine et de la vimentine dans l'épithélium séminifère [576, 577]. Ceci explique l'apparition tardive de vacuolisations au niveau des cellules de Sertoli, premiers signes histologiques de lésions cellulaires testiculaires induites par la HD [539, 575].

Une diminution de la sécrétion du fluide issu des tubes séminifères survient à la suite des altérations Sertoliennes, et est impliquée dans la dégénérescence des cellules germinales [575, 577-579]. Après exposition prolongée au toxique, seules les cellules de Sertoli et les spermatogonies subsistent dans l'épithélium séminifère [580]. Le mécanisme induisant la mort des cellules germinales au cours du traitement par la HD implique la voie extrinsèque (signalisation par Fas [581]), mais n'est pas complètement élucidé à ce jour. De même, la raison pour laquelle les cellules germinales résiduelles sont incapables de repeupler l'épithélium séminifère après le retrait du produit toxique, est également inconnue. Une étude récente réalisée sur des souris mâles a permis de démontrer que la perte progressive de mobilité des spermatozoïdes, est un indicateur précoce de la toxicité de la HD [582] ; cette atteinte est également constatée chez le rat [571]. Enfin, le niveau de testostérone demeure inchangé après exposition [583].

☞ **L'éthylène diméthane sulfonate (EDS)** est un diester de l'acide méthane sulfonique, excellent catalyseur des réactions d'estérification, d'alkylation et de condensation. L'EDS fut l'un des premiers agents alkylants à être examiné, en vue d'une utilisation potentielle dans la chimiothérapie des tumeurs [584]. Depuis, il permet l'étude de la dépendance androgénique de la spermatogenèse, ainsi que l'ontogenèse des cellules de Leydig [585]. Chez le rat mature, l'administration d'une dose unique d'EDS est suivie d'une période de 2 à 8 semaines de stérilité, associée à une diminution du poids des testicules, des épидидymes, de la prostate et des vésicules séminales. Une augmentation du niveau de LH et de FSH, ainsi qu'une forte réduction voire suppression de la synthèse d'androgènes sont également constatées [567, 586]. Il a été établi que cette dernière atteinte résulte d'une destruction rapide des cellules de Leydig [567]. En effet, ces cellules voient leur chromatine se condenser, présentent des vacuoles cytoplasmiques, ainsi qu'une hypertrophie de l'appareil de Golgi ; pour finir, les macrophages phagocytent les cellules lésées [567, 587, 588]. Cela se traduit par l'absence totale de cellules de Leydig, 7 à 14 jours après traitement. Étonnamment, sous influence de LH

et d'autres facteurs paracrines, une nouvelle génération de cellules de Leydig se développe trois semaines après traitement [567, 589]. Elles possèdent les caractéristiques des cellules de Leydig fœtales, et résistent aux effets cytotoxiques de l'EDS [590, 591]. Les observations morphologiques suggèrent que ces cellules sont issues de la différenciation d'un pool de cellules mésenchymales [592]. La différenciation des cellules de Leydig nouvelles est associée à un rétablissement du taux de testostérone [567] et une restauration de la spermatogenèse [593].

L'atteinte toxique des cellules de Leydig s'accompagne d'une spermatogenèse défailante. En effet, suite à une réduction drastique du niveau de testostérone, une dégénérescence et une apoptose spécifiques des spermatocytes et spermatides ont été observées après traitement à l'EDS [585, 594]. Une diminution de la production journalière en spermatozoïdes [593], un défaut lors de la spermiation, ainsi qu'une altération de la spermiogenèse ont également été rapportés. Toutefois, ce composé n'affecte pas le nombre de cellules de Sertoli [595]. Enfin, le mode d'action ainsi que les mécanismes responsables de la sélectivité du toxique pour les cellules de Leydig ne sont à ce jour pas définis.

☞ **L'éther monométhylique de l'éthylène glycol (EGME)** est un solvant industriel largement utilisé dans la production d'acétate de cellulose, de résines, de peintures, de vernis et d'encre. Il est également présent dans les carburants d'aviation et les fluides hydrauliques. L'EGME est volatil et peut être facilement absorbé par inhalation et par contact avec la peau. Les tissus et organes à division cellulaire rapide et à métabolisme élevé, tels que les testicules et le thymus, sont connus pour être particulièrement vulnérables [596-598]. Chez l'Homme, divers rapports ont associé l'exposition professionnelle à l'EGME, à des anomalies des tissus hématologiques, neurologiques et de reproduction [599-604]. Chez le rat adulte, la toxicité testiculaire a été clairement caractérisée : les cellules les plus sensibles sont les spermatocytes II et les spermatocytes I pachytènes ou en division [605-607]. Après exposition, ces cellules cibles présentent un cytoplasme granuleux, des vésicules cytoplasmiques, une chromatine condensée ou dispersée de manière uniforme sous forme de masse, ainsi qu'une membrane plasmique lésée [608, 609]. Ce toxique induit finalement leur mort cellulaire par apoptose [610]. En augmentant la dose ou le temps d'exposition, les populations germinales affectées deviennent plus nombreuses ; seules persistent les cellules de Sertoli, les spermatogonies et les spermatides (stade tardif) au sein de l'épithélium [605]. Les premières étapes de cette lésion sont inconnues, et le mécanisme d'action est encore mal compris. Toutefois, il existe des données suggérant la participation des canaux calciques [611] et des protéines kinases à

cet événement [612]. Enfin, certains résultats proposent également l'implication des métabolites de l'EGME dans la toxicité testiculaire [613, 614].

F. Modèle d'étude : toxique à "action directe", le 1,3-Dinitrobenzène

Les composés nitro-aromatiques sont des molécules formées d'un système cyclique et de groupements nitrés. Parmi ces composés, le 1,3-Dinitrobenzène (DNB) est employé dans la fabrication des colorants, explosifs et plastiques [541, 615, 616]. Diverses études épidémiologiques ont démontré les effets délétères du DNB sur la santé humaine. Un empoisonnement chronique de travailleurs exposés de 9 à 18 mois au DNB a par exemple été rapporté. Sa rapide absorption dermale est un facteur de risque et de toxicité [617]. Les signes et symptômes d'exposition sont divers : anoxie, méthémoglobinémie, atrophie testiculaire, atteintes neurologiques, diminution de la vision, problèmes respiratoires, affaiblissement voire mort. Des études *in vivo* réalisées sur des animaux de laboratoire ont permis de mieux cibler les mécanismes d'action du DNB, et de confirmer les observations faites chez l'Homme [543, 616, 618, 619].

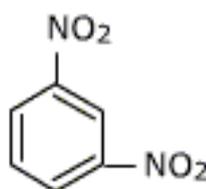


Figure 43 : Structure chimique du 1,3-Dinitrobenzène

Deux grands systèmes biologiques ont été identifiés chez le rat en tant que cibles de sa toxicité : le système sanguin (plus précisément les globules rouges) par formation de méthémoglobine conduisant à une cyanose [541, 616, 619, 620], et le système reproducteur mâle. De nombreuses publications ont précisé sa toxicité au niveau des gonades, à la fois à court et à long terme, rapportant une atrophie des testicules et une perturbation de la spermatogenèse [541, 615, 616, 618]. D'un point de vue histopathologique, il engendre des modifications morphologiques des cellules germinales (apparition de cellules multinucléées géantes et de cellules apoptotiques, condensation de la chromatine) et une vacuolisation de l'épithélium séminifère [541, 615, 621]. Le phénomène d'apoptose apparaît principalement

associé à des stades intermédiaires (VIII principalement), voire tardifs de la spermatogenèse [543]. Les changements éventuels dans le profil endocrinien relevant d'une exposition au DNB ont finalement été évalués afin de définir l'origine de ces lésions testiculaires [622]. Quelle que soit l'hormone, hypothalamique ou hypophysaire, leur taux demeure inchangé après traitement. Ceci suggère une influence directe du DNB sur les testicules, confirmée par des concentrations élevées en ABP dans le sérum et le liquide interstitiel [620, 622], et amène à penser que les cellules de Sertoli seraient les cibles primaires du DNB [541, 615, 623, 624].

Des approches réalisées en fonction de la dose et du temps ont confirmé que ces cellules se situent là où les premiers effets toxiques du composé résident, la dégénérescence des cellules germinales étant un événement secondaire [541]. En effet, l'examen histopathologique des effets précoces du DNB a mis en évidence une vacuolisation cytoplasmique et la rétraction des cellules de Sertoli dans les premières 24 heures après exposition [541, 625]. Une expérience *in vivo* alternative à l'aide de lanthane permettant de tracer la perméabilité à travers l'épithélium et l'endothélium en microscopie électronique, a démontré qu'à cette même période, le lanthane pénétrait dans le compartiment adluminal au-delà des jonctions serrées. Ceci prouve une perte de l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire, composée par les cellules de Sertoli, lors d'un traitement au DNB [626]. Enfin, des études *in vitro* ont montré que ce composé était également responsable d'altérations fonctionnelles des cellules de Sertoli, via l'augmentation des sécrétions de lactate et de pyruvate dans le milieu [623, 627, 628].

D'autre part, il a été établi *in vivo* [629, 630] comme *in vitro* [628, 631-633] que le DNB pouvait être métabolisé par les cellules testiculaires, les tubes séminifères et leurs mitochondries. De ce fait, une attention particulière a été portée sur les métabolites du DNB, dont le NNB (nitrosonitrobenzène), en tant que médiateur possible des lésions testiculaires. Cave et Foster ont ainsi établi que des concentrations équimolaires de NNB ou DNB induisent des changements morphologiques similaires dans les co-cultures de cellules de Sertoli/cellules germinales [634]. Le NNB produit toutefois une toxicité plus sévère que le DNB, illustrée par le détachement des cellules germinales. D'autres études formulent également l'hypothèse selon laquelle, la nitro-réduction du DNB dans les tubes séminifères serait responsable de la toxicité testiculaire, compromettant la capacité anti-oxydante des mitochondries [633-635]. Enfin, des approches supplémentaires *in vitro* ont démontré que les tubules de hamster ont une capacité supérieure à ceux du rat pour métaboliser le DNB [635], d'où éventuellement

une sensibilité différentielle vis-à-vis de la toxicité testiculaire entre les espèces rat et hamster [636]. Il a été conclu d'après ces diverses études que le métabolisme mitochondrial réducteur du DNB générerait des intermédiaires réactifs, qui créeraient un environnement de stress oxydatif dans la mitochondrie. Si cette dernière ne possède pas suffisamment d'enzymes ou de cofacteurs capables de détoxifier ces espèces réactives, sa fonction serait altérée. Par conséquent, l'ATP cellulaire diminuerait et la cellule de Sertoli, cible potentielle, ne pourrait plus soutenir la spermatogenèse.

Ce n'est que récemment que les altérations moléculaires conséquentes à l'action de ce toxique ont été investiguées, rapportant une modulation de l'expression des gènes impliqués : (i) dans l'apoptose et la nécrose, dans les voies Jun et MAPK, et dans la progression du cycle cellulaire au sein de cellules de Sertoli traitées *in vitro* [637] ; (ii) dans la voie mitochondriale de l'apoptose au sein de tubes séminifères de rats [638] ; et (iii) dans la voie ubiquitine-protéasome qui entre autres, constitue un mécanisme de contrôle de la qualité des spermatozoïdes [639].

L'ensemble de ces données indiquent que le DNB est un toxique puissant du testicule chez le rat mâle, capable de produire d'importants dommages. Son mécanisme d'action apparaît différent de celui d'un PE, mais reste encore inconnu à l'heure actuelle.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Les réactifs

☞ **Flutamide** : n° CAS 99-65-0 (Sigma).

Le flutamide est un anti-androgène synthétique non stéroïdien de la famille des acétanilides (cf. chapitre III, *Modèle de perturbateur endocrinien : un anti-androgène, le Flutamide*). De nombreuses informations sont disponibles dans la littérature scientifique et justifient son utilisation dans notre projet. Il a par ailleurs été largement employé dans notre laboratoire ; nous disposons donc de multiples données historiques.

☞ **1,3-Dinitrobenzène** : n° CAS 133-11-84-7 (Sigma).

D'après la littérature, le 1,3-dinitrobenzène (DNB) est un composé nitroaromatique dont la toxicité n'affecterait pas le système hormonal, mais cible directement le testicule (cf. chapitre III, *Modèle d'étude : toxique à "action directe", le 1,3-Dinitrobenzène*). Il n'est à priori pas considéré comme un PE, et a par conséquent été utilisé comme témoin négatif dans ce projet.

2. Etudes in vitro

A. Cellules H295R : culture et traitement

La lignée cellulaire H295R est issue d'un carcinome de surrénales humaines (référence : CRL-2128 ; ATCC), capable de sécréter des hormones sexuelles. Ces cellules ont été cultivées dans des flasques de 75 cm², en présence de 30 ml d'un milieu de culture adapté et dans une atmosphère à 37°C contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture correspond à un mélange nutritif, le DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium with Ham's F12 ; ATCC) complété par 1% d'ITS Premix™ (BD Biosciences), 2.5% de Nu-Serum™ (BD Biosciences), et 0.1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen). Le milieu contenu dans les flasques a été changé environ deux fois par semaine. Lorsque les cellules arrivaient à confluence, un repiquage a été nécessaire via l'utilisation d'un mélange 0.25% trypsine/0.53 mM EDTA (ATCC).

Pour chaque étude, les cellules ont étéensemencées à une densité de $0,3 \cdot 10^6$ cellules/ml de milieu, dans des plaques 24 puits. Elles ont alors été mises en culture 24 heures pour permettre leur adhésion, puis le milieu a été renouvelé avant traitement. Ce dernier a consisté en la mise en contact durant 48 heures des cellules avec différents composés dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma), à des concentrations définies au préalable à l'aide d'études de cytotoxicité grâce à un test XTT d'activité mitochondriale. Le milieu récupéré a été conservé à -80°C , jusqu'au dosage de la progestérone, de la testostérone et de l'œstradiol par EIA (Enzyme Immunoassay).

B. Cellules de Leydig : isolement, culture et traitement

Des rats mâles de la souche OFA âgés de 28 jours (R. Janvier, France), ont été utilisés pour étudier les effets de substances sur la stéroïdogénèse au sein de cellules de Leydig. Après anesthésie, les testicules de chaque animal ont été prélevés de façon stérile et récupérés dans du milieu DMEM/F12 (Invitrogen). Sous hotte, ces organes ont ensuite été décapsulés, désagrégés mécaniquement, puis digérés à l'aide de la libérase TM (73 U/ml ; Roche Diagnostics GmbH) à 32°C afin de dissocier les tissus. Après décantation de l'homogénat, le surnageant a été récupéré. Le culot rincé avec du milieu DMEM/F12 a permis l'obtention d'un second surnageant après décantation. Les deux surnageants additionnés ont été centrifugés (5 minutes, 4°C , 200 rcf). Le culot qui en résulte a été remis en suspension : il contient les cellules de Leydig. La pureté des préparations de cellules de Leydig a été constamment supérieure à 95%, évaluée en déterminant le pourcentage de cellules marquées histochimiquement pour les 3-HSD. Celles-ci ont été cultivées dans des plaques 24 puits, à une densité de $0,5 \cdot 10^6$ cellules/ml, en présence d'un milieu de culture adapté et dans une atmosphère à 32°C contenant 5% de CO_2 . Le milieu de culture correspond à un mélange nutritif, du DMEM/F12 complété par 5% de sérum de veau fœtal (Invitrogen), 0.1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen), 0.04% de vitamine E à 25 mg/ml (Sigma) et 0.2% d'insuline à 1 mg/ml (Sigma). Le lendemain, le milieu a été remplacé, et les cellules ont été traitées durant 24 heures avec différents composés dilués dans du DMSO, à des concentrations définies auparavant par des études de cytotoxicité. Le milieu récupéré a été conservé à -80°C , jusqu'au dosage de la testostérone par EIA.

C. Analyses hormonales

Les concentrations en progestérone, testostérone ou œstradiol des milieux de culture ont été dosées par EIA à l'aide des kits Progesterone Immunoassay, Testosterone Immunoassay (Enzo life Sciences), ou Estradiol EIA KIT (Cayman Chemical Company), respectivement d'après les recommandations des fabricants. La sensibilité du kit détectant le taux de progestérone est de 8.57 pg/ml. Dans nos conditions, les limites de détection pour l'œstradiol et la testostérone ont été définies respectivement à 5.65 et 95.68 pg/ml. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad software (version 5.02, GraphPad Software, Inc.).

Le dosage se fait via une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré mesurable par spectrophotométrie. Il s'agit d'une technique biochimique, utilisée principalement en immunologie, afin de détecter et quantifier la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. Dans notre cas précis de l'EIA par compétition, l'antigène à doser (hormone) entre en compétition avec un antigène marqué couplé à une enzyme, pour se fixer à l'anticorps coaté. Plus la concentration d'antigènes à doser dans l'échantillon est élevée, moins l'antigène conjugué se fixera. Le substrat chromogène donnera une réaction colorée qui sera donc inversement proportionnelle à la concentration en antigènes non marqués (hormone). Cette dernière est définie à l'aide d'une courbe d'étalonnage. (Figure 44)

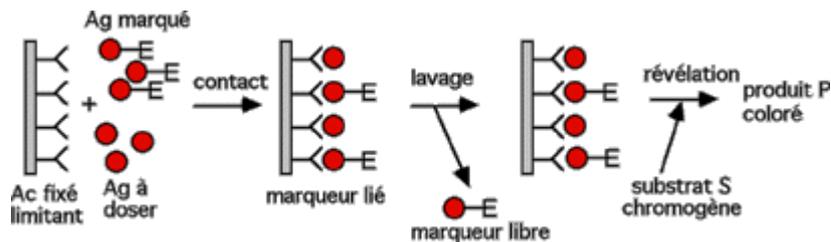


Figure 44 : Principe du test EIA par compétition
anticorps (Ac), antigène (Ag)
(D'après un cours de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris, René Lafont)

3. Etudes in vivo

A. Les animaux

Toutes les investigations ont été menées en conformité avec les lois françaises de l'expérimentation animale. Des rats mâles de la souche Wistar Rj:WI (IOPS HAN), obtenus auprès de R. Janvier, ont été utilisés pour nos études. Cette souche a été choisie en raison de sa très grande utilisation au sein de notre laboratoire, ce qui permettait de disposer de données historiques suffisantes pour l'interprétation des résultats. Les rats âgés d'environ 10 semaines au moment de la première exposition au traitement, ont subi une acclimatation préalable aux conditions du laboratoire pendant 6 jours. Chaque animal a été identifié par une bague auriculaire métallique comportant un numéro unique. Les animaux ont reçu une alimentation standard, contrôlée et stérilisée, disponible *ad libitum*. Ils ont été hébergés dans des cages en treillis en acier inoxydable, individuelles et identifiées, dans une pièce contrôlée et maintenue à 20-24°C, avec une hygrométrie relative de 40 à 70%. L'éclairage a été automatiquement réglé à douze heures de lumière quotidienne.

Avant le traitement, les rats jugés en bonne santé ont été assignés à un groupe par une procédure de randomisation informatisée. Celle-ci est basée sur le poids corporel la veille de l'administration du produit, et est réalisée de sorte qu'il n'y ait pas de différence significative du poids corporel moyen dans les groupes au début de l'étude. Le produit, mis en suspension dans une solution aqueuse à 0.5% de méthylcellulose, a été administré quotidiennement (étude subaigüe) ou à dose unique (étude aigüe). L'administration a été réalisée par gavage (5 ml/kg de poids corporel) afin d'assurer une prise maximale, homogène et constante du principe actif. Les animaux du groupe contrôle n'ont reçu que le véhicule. Les observations cliniques, le poids corporel et les examens physiques ont été enregistrés quotidiennement. Vingt-quatre heures après la dernière administration (étude subaigüe) ou au temps même de l'analyse (étude aigüe), les animaux ont été pesés, anesthésiés par inhalation d'isoflurane, puis sacrifiés par section de l'aorte abdominale. Afin de pouvoir entreprendre à la fois des analyses histologiques et transcriptomiques sur les différents organes, ceux-ci ont été prélevés comme suit (Table 3), avec un intérêt tout particulier au cours de notre projet, pour les échantillons de sang et de testicules :

Prélèvement	Analyses
Sang	Analyse hormonale
	Dosage du produit et de ses métabolites
Testicules	Pesée
	Testicule droit : fixation pour histologie
	Testicule gauche : congélation pour analyses transcriptomiques et dosage du produit et de ses métabolites
Epididymes	Pesée et fixation pour histologie
Vésicules séminales (avec prostate dorso-ventrale)	
Prostate ventrale	Pesée et congélation pour éventuelles analyses transcriptomiques
Foie	
Surrénales	
Hypophyse	

Table 3 : Répartition des prélèvements et analyses
(Congélation : -80°C)

B. Le choix des doses

Le choix des doses concernant le flutamide s'est fait sur la base d'études de 28 jours, décrites dans la bibliographie [150, 151, 531, 533] ou réalisées en interne [537, 640], chez le rat. Le choix des doses et de la durée des études menées avec le DNB résultent principalement d'examen préliminaires effectués au sein du laboratoire chez le rat. Les modèles expérimentaux sont présentés dans les chapitres appropriés (cf. *Résultats*).

C. Analyses histopathologiques

Pour l'analyse histologique, le testicule droit a été fixé dans le fixateur de Bouin (formol, acide picrique, acide acétique), utile pour préserver les structures des tissus mous et délicats. Les épидидymes ont été fixés dans le fixateur de Davidson (formol, acide acétique glacial, méthanol), et les autres organes dans du formol. Tous les organes ont ensuite été

manipulés selon les protocoles histologiques classiques. Les échantillons déposés sur lame ont été coupés à 5 micromètres d'épaisseur et colorés par l'Hemalun (Sigma) et l'Eosine (Merck). Afin de limiter les biais, les lectures en microscopie optique ont été effectuées à l'aveugle.

Au cours de certaines études, des immunomarquages anti-caspase-3 activée et anti-caspase-6 activée ont été entrepris sur des coupes histologiques en paraffine de testicules, afin d'apprécier le phénomène d'apoptose. Brièvement, des coupes histologiques ont été incubées avec divers anticorps, et révélées par un système utilisant la Horseradish Peroxydase. Les lames ont été contre-colorées par l'Hemalun. Elles ont ensuite été analysées semi-quantitativement par des pathologistes, en comptant le nombre de cellules positives sur trois sections à fort grossissement (400x). La liste des anticorps, le type de dilution et les techniques sont reportés dans la Table 4.

Anticorps	Type	Dilution	Fournisseur	Démasquage	Incubation Anticorps Primaire
Caspase-3 activée	Lapin monoclonal anti-humain	1 : 200	Cellular Signaling Technology	Citrate 60 minutes à 98°C, pH6	60 minutes
Caspase-6 activée	Lapin polyclonal anti-humain	1 : 500	Abcam	Citrate 20 minutes à 98°C, pH6	30 minutes

Table 4 : Types d'anticorps, fournisseurs et protocoles utilisés

D. Analyse hormonale

Les échantillons de sang prélevés sur chaque animal ont été placés dans des tubes contenant de l'héparine de lithium. Après centrifugation, les échantillons de plasma ont été récupérés (surnageant), et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse hormonale. La concentration en testostérone plasmatique a été dosée par Radio Immunoassay (RIA) avec le kit DSL-4000, Active Testosterone RIA (Diagnostic Systems Laboratories), d'après les recommandations du fabricant. La sensibilité théorique, ou seuil minimum de détection est de 0.08 ng/ml.

Le test de RIA suit le principe de base d'immunodosage, selon lequel des antigènes radioactifs et non radioactifs entrent en compétition pour se fixer sur un nombre précis de sites actifs d'anticorps. La quantité de radioactivité mesurée est inversement proportionnelle à la concentration d'antigènes non marqués (hormone) présents dans le milieu. Un compteur gamma est utilisé pour mesurer la radioactivité liée aux anticorps. Enfin, la concentration d'antigènes non marqués (hormone) est définie à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

E. Dosages du flutamide et de l'hydroxyflutamide dans les testicules et le plasma

Les résidus des composés flutamide et hydroxyflutamide ont été quantifiés à partir de 200 µl de plasma ou 200 mg de testicules, après addition de l'étalon interne (2-hydroxyflutamide-d₆) et précipitation des protéines au méthanol et à l'acétonitrile. Un aliquot de chaque extrait a été injecté en chromatographie liquide haute performance (CLHP), phase inverse (colonne C18 Luna de Phenomenex), couplée à un spectromètre de masse quadripolaire en mode électrospray d'ionisation (Applied Biosystems API 4000). La quantification du 2-hydroxyflutamide a été réalisée par étalonnage interne, et celle du flutamide par étalonnage externe dans le solvant. La limite de quantification pour chaque analyte a été définie à 0.01 mg/l pour le plasma, et à 0.02 mg/kg pour les testicules.

F. Analyses statistiques

Les moyennes des masses absolues et les moyennes se rapportant à la concentration en testostérone plasmatique ont été calculées pour chaque groupe. La déviation standard (SD) a également été définie. Un test de Bartlett a été entrepris pour vérifier l'homogénéité des variances entre les groupes. Lors de variances homogènes, les différences significatives ont été détectées par une combinaison d'analyse de la variance (ANOVA) et d'un test de Dunnett. Lors de variances hétérogènes, les différences significatives ont été identifiées par un test-t.

4. Analyses moléculaires

A. Préparation des extraits d'ARN totaux

Après broyage des échantillons de testicules (*in vivo*), ou récupération du tapis cellulaire dans du tampon de lyse (*in vitro*), les ARN totaux ont été extraits à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Afin d'éliminer d'éventuelles contaminations par de l'ADN génomique, les ARN totaux ont également été traités à l'aide du kit RNase-Free DNase set (Qiagen).

La concentration de chaque échantillon a été mesurée avec un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies Agilent). La concentration en acides nucléiques se mesure à 260nm, et est directement calculée par le logiciel selon la loi de Beer Lambert : $A=\epsilon.l.c$. Dans cette formule, A représente l'absorbance, ϵ le coefficient d'extinction molaire, l la longueur de la cuve et c la concentration de la solution. Les échantillons ont ensuite été analysés à l'aide d'un Bioanalyseur 2100 (Agilent), afin de contrôler l'intégrité et la qualité des ARN totaux sur la base des profils de l'ARN ribosomal. Les résultats sont visualisés sous forme d'électrophorégrammes. Le logiciel calcule les valeurs de concentration, et évalue l'intégrité de chaque préparation d'ARN afin d'attribuer un indice de qualité (*Rna Integrity Number*, RIN) à chaque échantillon. Seuls ceux ayant un RIN supérieur à 8 ont été retenus pour nos analyses. (Figure 45)

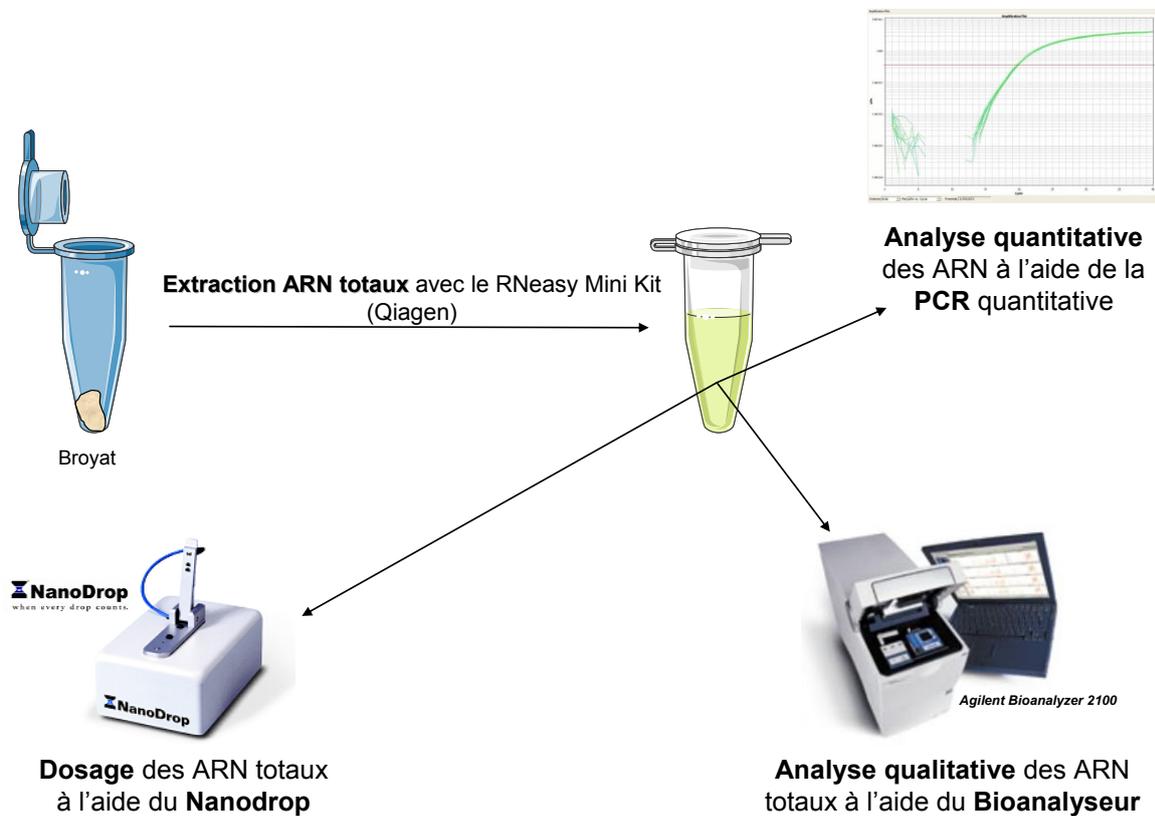


Figure 45 : Contrôles de la qualité des ARN

B. *Transcription inverse*

La transcription inverse est la réaction inverse de la transcription. Elle consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice ARN, grâce à une enzyme ADN polymérase ARN dépendante (Figure 46).

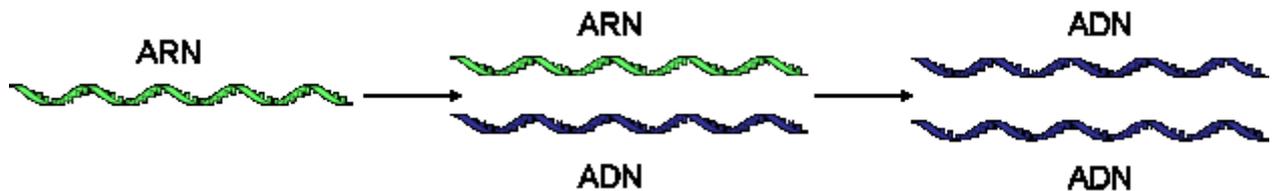


Figure 46 : Transcription inverse

Un (*in vitro*) ou 10 (*in vivo*) microgrammes d'ARN totaux ont été utilisés pour synthétiser de l'ADNc par la technique de transcription inverse en utilisant le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Celui-ci contient tous les composants nécessaires à la transcription inverse, à savoir du tampon, des nucléotides triphosphates, des amorces universelles et l'enzyme (Reverse Transcriptase). La réaction se fait dans un thermocycleur (DNA Engine, MJ Resaerch, PTC-200, Peltier Thermocycler) : 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C, et 5 secondes à 85°C.

C. *Analyse par PCR en temps réel*

Lors de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques peut être spécifiquement amplifiée, en utilisant les propriétés particulières d'une enzyme, la Taq polymérase. La PCR en temps réel trace l'évolution de la fluorescence émise pendant la réaction de production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR semi-quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus. La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un fluorochrome (Figure 47). L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à l'augmentation de la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde

d'hybridation, oligonucléotides de 20 à 30 paires de bases spécifiques d'une séquence interne à la séquence à amplifier, et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. En effet, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe du FRET (*Fluorochrome Resonance Energy Transfert*), qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence.

Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce, jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. L'émetteur est alors libéré de l'environnement du suppresseur, permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle d'amplification proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible ou relative par rapport à un autre échantillon. Grâce à la puissance de la technique d'amplification de l'ADN par PCR, il est aujourd'hui possible d'établir un profil génétique à partir de quantités infimes d'ADN.

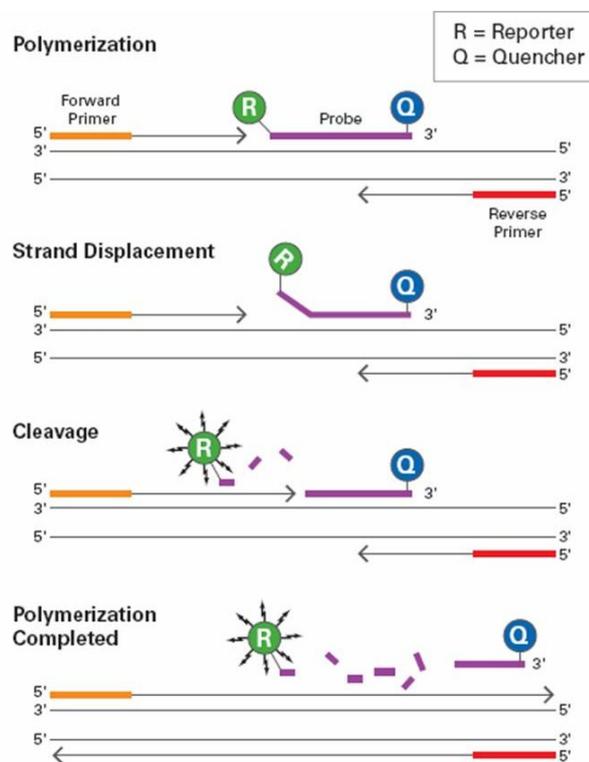


Figure 47 : Principe d'une PCR en temps réel
(D'après <http://www.asuragen.com>)

Le concept du "cycle seuil" est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques de fluorescence en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle, et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis de la réaction. Plus il y a de produits à amplifier au départ de la réaction d'amplification, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera significativement plus élevé que celui du bruit de fond. Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct), et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. La valeur de Ct est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de copies de la séquence cible présentes dans l'échantillon initial. Ce paramètre permet d'obtenir une quantité relative d'expression (RQ) d'un gène dans un échantillon donné par rapport à un échantillon de référence, et normalisé par rapport à un gène de ménage (ex. β -actine ou 18S) dont l'expression n'est pas modulée par le traitement, en ayant recours à la formule suivante :

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

avec $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de ménage}})_{\text{échantillon X}} - (Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de ménage}})_{\text{échantillon référence}}$

D'un point de vue pratique, à partir des ADNc issus de la transcription inverse, les PCR ont été effectuées en duplicat, à l'aide de sondes Taqman fabriquées à la demande (Applied Biosystems) et spécifiques du gène à amplifier, et du TaqMan Universal PCR Master Mix (enzyme Taq polymérase, nucléotides dNTP, MgCl₂, tampon). Les amplifications ont été réalisées grâce à un appareil ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems). Un cycle d'amplification se déroule de la façon suivante : 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, et 30 secondes à 72°C. L'analyse des résultats est effectuée par le logiciel SDS (Applied Biosystems). Afin de définir la significativité des résultats, différentes analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels GraphPad software ou GeneSpring GX 10.0 selon le contexte, et sont décrites dans les paragraphes appropriés (cf. *Résultats*).

D. Puces à ADN

Les modulations des profils d'accumulation des ARN messagers (ARNm) ont été évaluées à l'aide de puces à ADN (MicroArrays, Agilent Technologies), composées de dizaines de milliers de sondes oligonucléotidiques, recouvrant l'ensemble du génome du rat.

En toxicogénomique, leur utilisation repose sur l'hypothèse de départ qu'un effet toxicologique direct ou indirect sur un tissu, entraîne une modification d'expression de certains gènes de ce tissu.

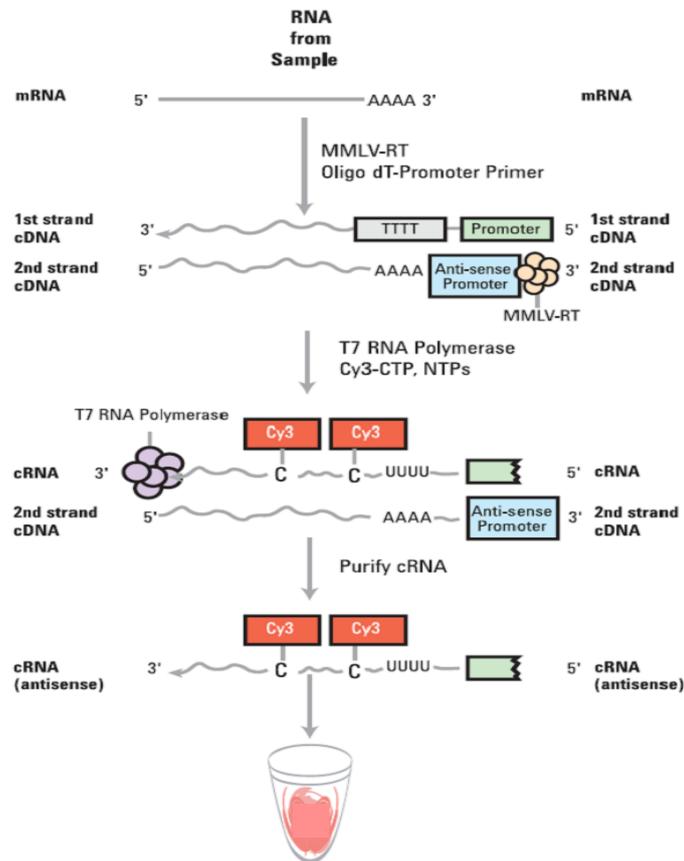


Figure 48 : Marquage des échantillons
(D'après <http://www.agilent.com>)

A partir de 500 nanogrammes d'ARN totaux, les ARN complémentaires (ARNc) ont été synthétisés et marqués par un fluorochrome Cy3 (Figure 48) à l'aide du kit Quick Amp Labeling Kit One-Color, et selon le protocole One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling, G4140-90040, version 5.7, Agilent Technologies). La quantité et la qualité des ARNc marqués ont été évaluées en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 et le Bioanalyseur 2100, respectivement. Immobilisés sur un support solide (lame de verre), des oligonucléotides (simples brins d'environ 30 nucléotides) spécifiques de gènes connus constituent les sondes, dont le rôle est de détecter les cibles marquées complémentaires (ARNc marqués avec de la cyanine 3-CTP) présentes dans le mélange complexe à analyser. 1,65 microgrammes d'ARNc marqués ont été hybridés sur les lames MicroArrays proposant le génome entier du rat (G4131F) pendant 17 heures à 65°C.

Les lames hybridées ont ensuite été lavées selon les conditions recommandées par le fabricant. Une lecture optique a permis de révéler les sondes hybridées avec des cibles marquées, à l'aide du DNA microarray scanner (Agilent) à une résolution de 10 μm (Figure 49). Les données ont finalement été extraites de l'image scannée par le logiciel Feature Extraction (Agilent Technologies) version 9.5.3.1. Feature Extraction permet de localiser chaque spot de la lame et d'intégrer, filtrer et normaliser leur signal. La visualisation et l'analyse des résultats ont été effectuées à l'aide des logiciels GeneSpring et Ingenuity Analysis Pathways.

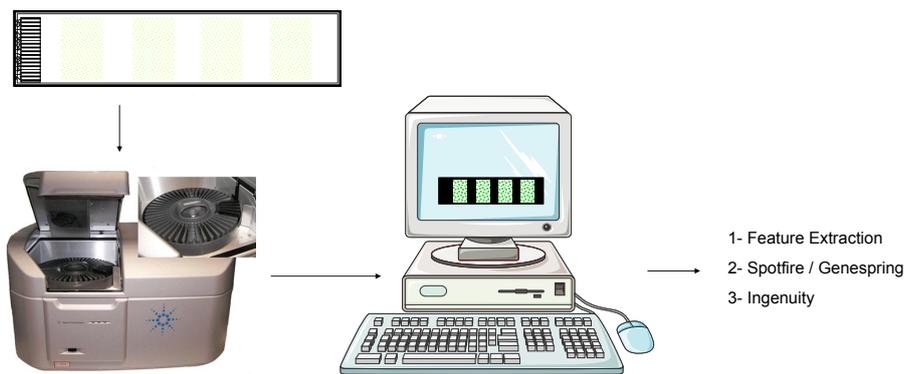


Figure 49 : Analyse des données de puces à ADN

E. Analyses fonctionnelles

I. Genespring

Le logiciel GeneSpring GX 10.0 (Agilent Technologies) permet la visualisation, la normalisation, l'analyse statistique, et l'utilisation d'algorithmes avancés pour l'examen d'une grande quantité de données, comme celles obtenues par Feature Extraction (Figure 50).

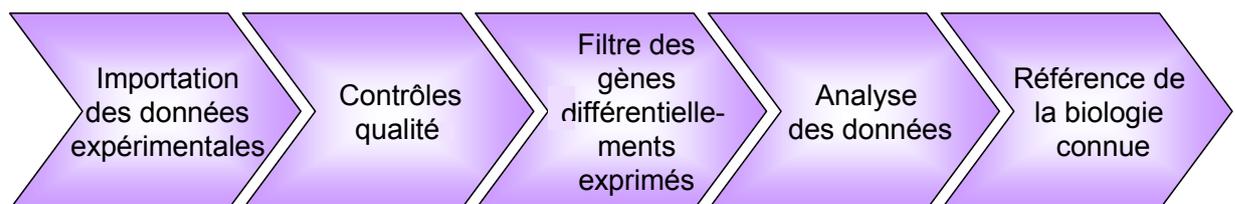


Figure 50 : Analyse des données de puces à ADN par GeneSpring

➤ **Normalisation et tests statistiques** : dans nos études, la normalisation a été faite sur le 75^{ième} percentile pour chacune des lames. Afin de filtrer les données ambiguës, les spots dont l'intensité est inférieure à 100 (similaire au bruit de fond) ont été exclus de l'analyse. Pour chaque gène présent sur l'ensemble des puces, la médiane a été calculée en fonction des valeurs d'expression normalisée. Puis, pour toutes les puces, les données d'expression de chaque gène ont été rapportées à leur médiane respective. Dans le but de déterminer la liste des gènes différentiellement modulés suite aux traitements, un test ANOVA a été réalisé complété du test Tukey's HSD (*Honestly Significant Differences*). Enfin, une correction de Benjamini and Hochberg FDR a été appliquée afin d'éliminer un maximum de faux-positifs dus à la mesure d'un grand nombre de paramètres.

➤ **Classification hiérarchique** : les résultats (gènes modulés) ont été visualisés en utilisant la classification hiérarchique. Cette approche réorganise l'ordre de l'ensemble des valeurs d'expression des gènes et les groupe entre eux, basé sur la similarité de leur dynamique d'expression. Les gènes dont les profils sont analogues, sont regroupés sous un "nœud". Un profil représentatif du groupe de gènes est attribué à ce nœud. Le nœud est ensuite lui-même comparé à un autre gène ou un autre nœud. Ainsi de proche en proche (vertical), les gènes sont ordonnés de manière hiérarchique dans un dendrogramme. De la même manière, la classification hiérarchique permet aussi de comparer deux à deux le degré de similitude entre les puces en fonction du profil d'expression de l'ensemble des gènes. Ainsi de proche en proche (horizontal), les puces sont ordonnées de manière hiérarchique dans ce même dendrogramme. Différentes métriques sont utilisées pour calculer la distance entre les profils, dont le coefficient de Pearson. Il permet d'évaluer le degré de similitude entre les profils de deux gènes en fonction de la forme de leur courbe, sans tenir compte de l'amplitude de la variation. La classification hiérarchique permet également d'afficher les profils des gènes sous forme d'une "carte d'expression" colorée. Chaque ligne représente un gène, et chaque colonne un traitement. Enfin, pour chaque gène, la valeur du logarithme de son expression normalisée et rapportée à sa médiane (cf. *Normalisation*) est reportée en rouge lorsque positive, et en bleu lorsque négative, l'intensité de la couleur étant proportionnelle à l'amplitude de la dérégulation.

II. Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Les listes de gènes significativement modulés, obtenues à partir de GeneSpring, sont exploitées et interprétées à l'aide du logiciel Ingenuity Pathways Analysis (IPA). IPA est un logiciel d'application disponible sur internet (<https://analysis.ingenuity.com>), qui permet de découvrir, visualiser et explorer des réseaux biologiquement pertinents et significatifs des données expérimentales d'expression des gènes. L'application utilise la base de connaissances IPA Knowledge Base, la plus importante base de données organisée au monde, contenant des millions de modélisations des interactions entre les protéines, les gènes, les caractères complexes, les cellules, les tissus, les médicaments et les maladies. Ce logiciel permet de faire l'analyse selon trois niveaux :

☞ **Analyse des réseaux d'interaction de gènes** : Les gènes issus des listes créées sous GeneSpring, c'est-à-dire les gènes répondant aux critères de sélection, sont appelés "focus genes". Ils sont superposés à des réseaux de gènes contenus dans la base de données du programme IPA (Figure 51A). Ces réseaux sont créés à partir de données d'interactions protéines-protéines et protéines-acides nucléiques décrites dans la littérature. IPA utilise divers algorithmes pour identifier les réseaux enrichis en "focus genes". Ces réseaux sont générés en fonction de la connectivité des différents "focus genes", et ils sont composés de 35 gènes au maximum. Les différents réseaux sont classés d'après une valeur appelée score, qui reflète le nombre de "focus genes" inclus dans chaque réseau, ainsi que la taille des réseaux. De plus, trois fonctions moléculaires majeures sont assignées à chaque réseau. Un score de 5 équivaut à une p -value de 10^{-5} (test de Fisher), et celle-ci reflète la probabilité d'avoir chaque fonction biologique associée à un réseau simplement par chance.

☞ **Analyse fonctionnelle** : Cette analyse permet d'identifier les fonctions biologiques statistiquement affectées. De la même façon que pour l'analyse des réseaux, à chaque fonction biologique est attribuée une p -value (test de Fisher), reflétant le nombre de gènes modulés associé à chaque fonction. Cette p -value détermine la probabilité que chaque fonction affectée, associée à une liste de gènes, n'est pas seulement due au hasard.

☞ **Analyse des voies métaboliques** : Cette analyse permet d'identifier les voies métaboliques affectées de façon statistiquement significative (test de Fisher).

Le programme IPA permet de visualiser les résultats de ces analyses sous forme de schémas représentant les produits de gènes, leur localisation cellulaire, ainsi que leurs éventuelles interactions avec d'autres produits de gènes. Les différents gènes sont symbolisés par différentes formes correspondant à la fonction cellulaire de la protéine codée par le gène (Figure 51B). De plus, les lettres mentionnées entre certains produits de gènes donnent une précision sur la nature de l'interaction (Figure 51C et D).

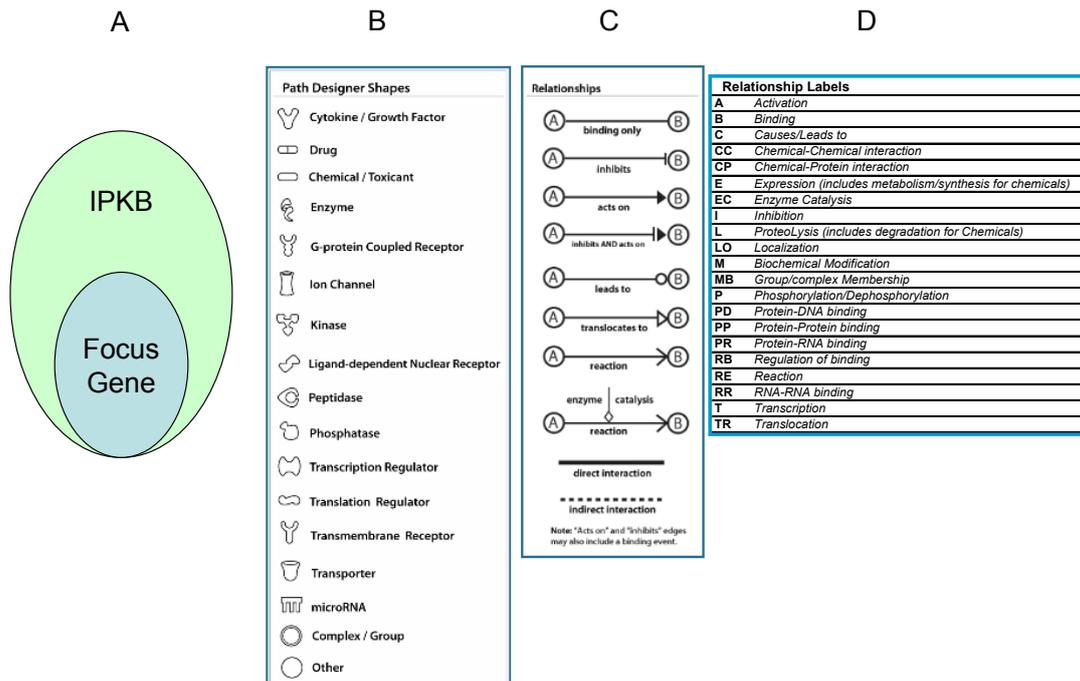


Figure 51 : Légendes des symboles utilisés par le logiciel IPA
 IPKB : Ingenuity Pathways Knowledge Base
 (D'après <http://www.ingenuity.com>)

F. Cas particulier des miARN

Les méthodes analytiques concernant les miARN sont basées sur des principes identiques à ceux présentés pour les ARNm. Toutefois, les techniques diffèrent quelque peu.

☞ **Extraction** : les ARN totaux, dont les miARN, ont été extraits à partir de poudre de testicules congelés à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen); extraction couplée à une purification sur colonne et à un traitement à la DNase réalisés avec les kits RNeasy Mini Kit et RNeasy-Free DNase set (Qiagen), respectivement.

☞ **Transcription réverse** : les ADNc ont été obtenus en effectuant une transcription inverse à partir des ARN totaux, via l'utilisation de la Multiscribe transcriptase inverse et d'amorces spécifiques miARN TaqMan RT (Applied Biosystems). Ainsi, 10 nanogrammes d'ARN totaux ont été requis pour synthétiser les ADNc à l'aide du kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), selon les recommandations du fabricant. Le mélange réactionnel a été incubé dans un thermocycleur : 30 minutes à 16 °C, 30 minutes à 42 °C, et 5 minutes à 85 °C.

☞ **Analyse par PCR en temps réel** : à partir des ADNc issus de la transcription inverse, les PCR quantitatives ont été effectuées en duplicat, à l'aide de sondes PCR TaqMan miARN fabriquées à la demande (Applied Biosystems) et du TaqMan Universal PCR Master Mix no AmpErase (Applied Biosystems), basées sur les recommandations du fabricant. Les amplifications ont été réalisées par le système ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) en utilisant les conditions suivantes : 10 minutes à 95 °C, puis 40 cycles à 95 °C pendant 15 secondes et 60 °C pendant 1 minute. Les quantités relatives d'expression ont été calculées selon la méthode Ct décrite précédemment. Les données ont été normalisées par rapport à un miARN contrôle : snoRNA.

☞ **Puces à miARN** : des puces à miARN de rat (G4471A, Agilent Technology) ont été utilisées pour identifier les miARN sur- ou sous-exprimés dans le testicule après traitement. Pour ce faire, 100 nanogrammes d'ARN totaux par échantillon ont été déphosphorylés, puis marqués par ligation à la Cy3 à l'aide du kit miARN Complete Labeling and Hyb (G4170-90011, version 2.2, Agilent Technologies). La totalité a été hybridée sur une puce à miARN à 55°C pendant 20 heures. A la fin de l'incubation, les lames ont été lavées selon les recommandations du fabricant. Une lecture optique a permis ensuite de révéler les sondes fluorescentes hybridées avec les cibles marquées, à l'aide du DNA microarray scanner à une résolution de 5 µm. Les données ont finalement été extraites de l'image scannée par le logiciel Feature Extraction (cf. ci-dessus). Afin de sélectionner les miARN significativement modulés par le traitement, plusieurs étapes d'analyses à l'aide du logiciel GeneSpring GX 10.0 ont été nécessaires : (i) la normalisation a été réalisée sur le 75^{ième} percentile pour chacune des lames ; (ii) les spots dont l'intensité est inférieure à 20 ont été éliminés de l'analyse ; (iii) pour chacun des miARN présents sur l'ensemble des puces, la médiane a été calculée en fonction de la valeur d'expression normalisée. Pour toutes les puces, les données d'expression de chaque miARN ont été rapportées à leur médiane respective ; et (iv) un t-test (p -value ≤ 0.05) a été effectué.

5. Analyses protéiques

A. Dosage des protéines

L'échantillon sous forme de poudre de testicule a été repris dans un tampon phosphate (KH_2PO_4 (20mM), K_2HPO_4 (80mM), DTT (1mM), EDTA (1mM), Glycérol 25%, cocktail inhibiteur de protéases 0.1% (Sigma)), puis dilué au dixième pour l'étape de dosage des protéines. Ce dosage a été réalisé en quintuplat, à l'aide du kit Biorad DC Protein assay (Biorad) basé sur la méthode de Lowry, utilisant le réactif de Folin et une solution alcaline de tartrate de cuivre. Les protéines traitées par la solution alcaline réduisent le réactif de Folin par perte d'un ou plusieurs atomes d'oxygène. Cette réduction se matérialise par une coloration bleue, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines. La densité optique a été mesurée à 650 nm, et la concentration déterminée à l'aide d'une gamme étalon (0 à 2 mg/ml) de BSA (*bovin serum albumin*).

B. Western Blot

Les échantillons extraits ont été déposés à quantité protéique identique (1 à 20 microgrammes selon la protéine étudiée) sur des mini-gels précoulés Tris-HEPES-SDS à gradient de polyacrylamide 8-16% (Pierce). Les protéines ont alors été séparées par migration, puis transférées sur membrane PVDF (Amersham, transfert semi-sec). Le blocage de la membrane au lait a été réalisé, lui permettant d'être saturée en protéines et évitant les liaisons aspécifiques. Après rinçage, la membrane a été hybridée avec l'anticorps primaire, puis secondaire couplé à une peroxydase. Les différents anticorps utilisés, ainsi que les méthodes d'incubation sont décrits dans les paragraphes appropriés (cf. *Résultats*). La révélation des complexes immuno-réactifs a été opérée par chimioluminescence avec un kit Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection (GE Healthcare Life Sciences), et l'acquisition du signal a été effectuée par une caméra CCD à l'aide du logiciel Image Quant 350 (GE Healthcare Life Sciences). La quantification a finalement été rendue possible par le logiciel ImageQuant TL 7.0 (GE Healthcare Life Sciences), et les analyses statistiques par le logiciel GraphPad software.

RESULTATS

L'objectif de ce travail de thèse consiste à mieux comprendre les modes d'action de substances capables de perturber la fonction de reproduction, via l'apport d'outils moléculaires au sein d'études conventionnelles de toxicologie, ceci dans le but de définir si un PE se comporte de façon similaire à un composé considéré comme non PE pour ce qui est de la mise en place de la toxicité testiculaire. Pour ce faire, des profils complets de toxicité testiculaire chez le rat, fonction de la dose et/ou du temps, ont été établis pour l'anti-androgène flutamide et un composé présentant une toxicité directe, le 1,3-dinitrobenzène. Ce travail a ainsi donné lieu à l'écriture de deux articles, relatifs chacun à la précision du comportement et du mode d'action d'une substance. Le premier article s'intitule «A molecular and phenotypic integrative approach to identify a no-effect dose level for anti-androgen induced testicular toxicity» et a été publié dans *Toxicological Sciences* [641]. Le second article intitulé «New insights into the molecular mechanisms of 1,3-dinitrobenzene induced testicular toxicity» va prochainement être soumis dans *Toxicology and Applied Pharmacology* ou *Toxicology*. Ce projet a également permis d'apprécier la valeur ajoutée apportée par des approches moléculaires, d'un point de vue mécanistique et évaluation du danger, au sein d'études conventionnelles de toxicologie.

Article 1 : Approche intégrant les outils moléculaires et conventionnels de toxicologie afin d'identifier la dose sans effet, dans le cadre d'une toxicité induite par un anti-androgène

(A molecular and phenotypic integrative approach to identify a no effect dose level for anti-androgen induced testicular toxicity)

Sophie Ludwig, Helen Tinwell, Frédéric Schorsch, Christel Cavaillé, Marc Pallardy, David Rouquié, Rémi Bars

Toxicol Sci. 2011 Jul;122(1):52-63. Epub 2011 Apr 27.

CONTEXTE ET RESUME DE L'ARTICLE

L'apparition de nouvelles substances issues de l'activité industrielle, mais également de l'activité domestique, entraîne l'accroissement de pollution environnementale et des risques sanitaires associés. Parmi ces substances, les perturbateurs endocriniens (PE) font l'objet d'une préoccupation particulière de par leurs effets délétères potentiels sur la santé humaine et animale. Au travers d'études récentes appréciant leur toxicité, certains scientifiques ont suggéré que les PE induiraient des effets spécifiques à très faibles doses, voire des effets "sans seuil". Ceci implique que ces substances pourraient entraîner des effets adverses/toxiques sur la santé quelle que soit la dose. De ce fait, le principe régissant la toxicologie depuis son origine selon lequel c'est "la dose [qui] fait le poison", fait actuellement l'objet de controverses. Parallèlement, des technologies émergent et apportent des outils fiables et puissants, dont le rôle dans le cadre des PE ne peut plus être ignoré. En particulier, la capacité des puces à ADN à étudier simultanément des milliers de transcrits, a permis des progrès importants dans de nombreux domaines de la biologie, et ne saurait tarder dans les processus d'évaluation du risque des substances chimiques. A ce jour, seules quelques études *in vivo* ont exploré les relations dose-dépendantes dans le but d'identifier des niveaux de doses sans effet, en combinant l'évaluation des paramètres toxicologiques standards avec ces outils moléculaires sophistiqués [537, 642-644]. Aucun de ces travaux ne considère toutefois la toxicité d'un PE chez l'animal adulte.

Pour combler cette lacune, nous avons mené une étude de toxicité standard de 28 jours suivant la ligne directrice 407 améliorée de l'OCDE, en utilisant un composé anti-androgénique de référence, le flutamide. Ses effets pharmacodynamiques et toxiques sur l'appareil reproducteur mâle sont aujourd'hui bien caractérisés par des méthodes conventionnelles. Notre approche visait à mettre l'accent sur les progressions dose-dépendantes vis-à-vis de la toxicité testiculaire induite par ce PE, correspondant au passage d'un état de fluctuation normal à des effets adaptatifs (zone de transition) puis adverses, en corrélant les changements phénotypiques et moléculaires qui en résultent à chaque niveau de dose. En nous référant à la littérature, les doses de flutamide ont été choisies au mieux pour permettre la mise en évidence de la zone de transition (Figure 1, page 28, A à B). En effet, le design d'étude a prévu de définir quatre doses, en faisant en sorte que les deux doses maximales soient accompagnées d'effets toxiques classiques, et que les deux doses inférieures en soient dépourvues. Ce sont à ces deux doses inférieures que nous avons cherché à mettre en évidence une phase adaptative, non détectable par les méthodes conventionnelles de la toxicologie, et à identifier une dose sans effet.

Le protocole de cette étude est détaillé dans la publication 1. Brièvement, des rats matures ont été gavés quotidiennement pendant 28 jours avec 0 (contrôle), 0,2, 1, 6, ou 30 mg/kg/jour de flutamide. Les poids des différents organes cibles et la concentration plasmatique de la testostérone ont été mesurés après 28 jours de traitement. Un examen histologique du testicule a également été effectué. Parallèlement à ces observations, des analyses transcriptomiques (puce à ADN et PCR quantitative) ont été réalisées à partir du testicule, tout comme des analyses protéiques (western blot) et des dosages du métabolite. Les protocoles utilisés pour ces diverses approches sont détaillés dans la partie "matériels et méthodes".

La gravimétrie, le taux plasmatique de testostérone et l'histopathologie des testicules ont permis la définition d'une NOAEL à 1 mg/kg/jour, alors qu'une dose sans effet de 0.2 mg/kg/jour a été établie sur la base des données de transcriptomique. En effet, nos résultats issus des analyses de puces à ADN ont révélé des changements d'expression de gènes pertinents par rapport à la toxicité induite par le flutamide, à partir de 1 mg/kg/jour. Ces atteintes géniques dose-relées ont été identifiées pour les voies majeures associées à la lésion du testicule (ex. métabolisme des acides gras), et ont été confirmées par PCR quantitative. Les profils d'accumulation protéique et le dosage de l'hydroxyflutamide (métabolite du flutamide) dans le testicule, ont appuyé l'existence d'une dose sans effet de 0.2 mg/kg/jour relative à la

toxicité de notre PE. En outre, les résultats de puces ont mis en évidence pour la première fois, une altération dose-dépendante de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras, au niveau du tissu testiculaire après exposition au flutamide.

En conclusion, au travers d'une approche intégrative explorant la corrélation entre les paramètres classiques empiriques et les profils d'expression génique à la suite d'une exposition à un PE, nous avons établi l'existence de "seuils toxicogénomiques" qui doivent être dépassés/franchis afin de progresser d'un état normal à un état adaptatif (1 mg/kg/jour), puis à un effet avéré (6 mg/kg/jour). Ces données ont également permis d'actualiser les processus d'évaluation du risque en précisant la NOAEL par analyse du transcriptome, de même qu'elles ont apporté de nouveaux éléments dans la compréhension du mécanisme d'action moléculaire par lequel le flutamide induit des effets toxiques sur l'appareil reproducteur mâle. L'ensemble des résultats de cette étude sont présentés dans l'Article 1, à partir de la page 171.

Par ailleurs, suite à la découverte relativement récente et l'intérêt très large qu'a suscité le mécanisme de régulation d'expression des gènes par les microARN (miARN), les questions suivantes peuvent être posées, à savoir : *est-ce que ces petits ARN simple-brin, répresseurs post-transcriptionnels, permettraient d'apporter un nouveau regard sur la toxicité et le mécanisme d'action moléculaire des PE ? Dans le contexte de notre travail, quel est le profil d'expression de ces miARN dans les testicules d'animaux adultes exposés au flutamide, et comment varie-t-il en fonction de la dose de flutamide administrée ?*

A Molecular and Phenotypic Integrative Approach to Identify a No-Effect Dose Level for Antiandrogen-Induced Testicular Toxicity

Sophie Ludwig,^{*†} Helen Tinwell,^{*1} Frédéric Schorsch,[‡] Christel Cavailé,[§] Marc Pallardy,[†] David Rouquié,^{*} and Rémi Bars^{*}

^{*}Department of Research Toxicology and [†]Faculty of Pharmacy, Univ Paris-Sud, INSERM UMR 996, 92290 Chatenay-Malabry, France; [‡]Department of Pathology, Bayer SAS, 06903 Sophia-Antipolis, France; and [§]Department of Residue Analysis, Bayer SAS, 69009 Lyon, France

¹To whom correspondence should be addressed at Department of Research Toxicology, Bayer SAS, 355 rue Dostoïevski, 06903 Sophia-Antipolis, France. Fax: +33-(0)4-93-95-84-54. E-mail: helen.tinwell@bayer.com.

Received February 1, 2011; accepted April 19, 2011

The safety assessment of chemicals for humans relies on identifying no-observed adverse effect levels (NOAELs) in animal toxicity studies using standard methods. With the advent of high information content technologies, especially microarrays, it is pertinent to determine the impact of molecular data on the NOAELs. Consequently, we conducted an integrative study to identify a no-transcriptomic effect dose using microarray analyses coupled with quantitative reverse transcriptase PCR (RT-qPCR) and determined how this correlated with the NOAEL. We assessed the testicular effects of the antiandrogen, flutamide (FM), in a rat 28-day toxicity study using doses of 0.2–30 mg/kg/day. Plasma testosterone levels and testicular histopathology indicated a NOAEL of 1 mg/kg/day. A no-effect dose of 0.2 mg/kg/day was established based on molecular data relevant to the phenotypic changes. We observed differential gene expression starting from 1 mg/kg/day and a deregulation of more than 1500 genes at 30 mg/kg/day. Dose-related changes were identified for the major pathways (e.g., fatty acid metabolism) associated with the testicular lesion (Leydig cell hyperplasia) that were confirmed by RT-qPCR. These data, along with protein accumulation profiles and FM metabolite concentrations in testis, supported the no-effect dose of 0.2 mg/kg/day. Furthermore, the microarray data indicated a dose-dependent change in the fatty acid catabolism pathway, a biological process described for the first time to be affected by FM in testicular tissue. In conclusion, the present data indicate the existence of a transcriptomic threshold, which must be exceeded to progress from a normal state to an adaptative state and subsequently to adverse toxicity.

Key Words: no-effect levels; dose-response; flutamide; endocrine disruption; toxicogenomic.

To better characterize potential hazards to humans, the risk assessment process is evolving from a process dependent on traditional toxicological testing paradigms into a process that integrates mechanistic data and biologically based models. For example, the integration of genomic technologies into routine toxicology studies could provide an improved means of establishing no-observed adverse effect levels (NOAELs)

based on a better understanding and/or prediction of the toxicological responses following compound exposure (Cunningham *et al.*, 2003; Freeman, 2004). In this context, we recently generated limited molecular data (quantitative reverse transcriptase PCR [RT-qPCR]) that supported the NOAEL established using standard methods when considering testicular toxicity (Rouquié *et al.*, 2009).

With the advent of high-information content technologies, especially microarrays, it is now possible to identify global gene expression changes. This improvement, coupled with the observation that virtually all toxic responses are accompanied by changes in gene expression (Hamadeh *et al.*, 2002), suggests that gene expression analysis has the potential to refine the identification of doses without effect. Although these advances promise to improve our ability to characterize hazard, the data to support this assumption are limited as only few studies to date have combined standard toxicology parameters with sophisticated molecular tools to explore dose-response relationships so as to identify no-effect dose levels (Andersen *et al.*, 2008; Naciff *et al.*, 2005; Rouquié *et al.*, 2009; Stierum *et al.*, 2008).

As part of our ongoing investigations into endocrine-related testicular toxicity, we took an integrative approach to determine the no-effect doses (molecular and phenotypic) using the reference antiandrogen, flutamide (FM). FM is a non-steroidal antiandrogen, which binds to the androgen receptor. Consequently, FM antagonizes the androgenic action both peripherally and at the level of the hypothalamic-pituitary axis, leading to an increase in circulating gonadotropin and testosterone, which can lead to reproductive organ toxicity (Peets *et al.*, 1974; Simard *et al.*, 1986). Although the toxic effects of FM are well characterized using conventional toxicity endpoints (Andrews *et al.*, 2001; Kunitatsu *et al.*, 2004; Okahara *et al.*, 2000; Toyoda *et al.*, 2000), little is known concerning changes occurring at the molecular level in the testes of FM-treated rats (Kubota *et al.*, 2003; Ohsako *et al.*, 2003; Rouquié *et al.*, 2009). Moreover, microarray

determinations to elucidate the global effect on testes of FM-treated rats have not yet been realized. With this in mind, we conducted a 28-day repeat po dose study in the adult male rat using dose levels of FM (0.2–30 mg/kg/day) that would produce no discernible histological or hormonal effects at the two lowest doses. The study was based on the Organisation for Economic Co-operation and Development test guideline 407, and, in addition to the standard and molecular parameters, we also determined the concentration of FM and its metabolite, hydroxyflutamide, in the plasma and testes.

By using an integrative approach, we explored the correlation between conventional empirical endpoints (gravimetry, histopathology, and testosterone and metabolite dosages) and transcriptomic profiles supported by protein accumulation profiles. We established a no-effect dose level at 0.2 mg/kg/day based on our transcriptomic data (microarray and RT-qPCR data) and a NOAEL of 1 mg/kg/day based on plasma testosterone levels and testicular histopathology. Our molecular data revealed pertinent gene changes relative to the FM-induced toxicity, which increased in a dose-related fashion both in terms of the number of genes deregulated as well as the magnitude of the deregulation. In addition, our data highlighted an alteration in the expression of genes associated with fatty acid catabolism in testicular tissue following FM treatment.

MATERIALS AND METHODS

Animals and housing. The study was performed in accordance with The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Council, 1996) using male Wistar Rj:WI (IOPS HAN) rats purchased from R. Janvier (Le Genest St Isle, France). All animals were housed and maintained as described previously (Friry-Santini *et al.*, 2007; Rouquie *et al.*, 2009). Prior to treatment, rats were assigned to a group by the stratified randomization method based upon the body weight on the day before the initiation of administration, so that there was no significant variation in mean body weights among the groups.

Dosing and experimental design. FM (CAS no. 13311-84-7; Sigma, St Quentin Fallavier, France) was administered in suspension to rats (7 weeks old at start of treatment, 10 per group) by po gavage at a daily dose of 0 (control), 0.2, 1, 6, and 30 mg/kg body weight for 28 consecutive days using a dose volume of 5 ml/kg body weight. Methylcellulose in sterilized water (0.5% wt/vol) was used as the vehicle for all FM dosing solutions. The dose levels were based on previously published literature as well as in-house data and were chosen so that the two lowest doses did not produce discernable effects in the testes at the histological level or changes in plasma testosterone concentration. Exactly 24 h after the last dose, body weights were recorded, and then all animals were sacrificed by isoflurane (Baxter, France) inhalation followed by exsanguination under deep anesthesia. Terminal blood samples were collected from each animal and were placed into tubes containing lithium heparin. Plasma samples were prepared and stored at -80°C until hormonal analysis. At necropsy, the following organs were excised from each rat, trimmed free of fat and connective tissue, and weighed: liver, testes, epididymides, prostate, seminal vesicles, adrenal glands, and pituitary glands. All paired organs were weighed together with the exception of the testes and epididymides, which were weighed separately. Statistical analyses on body and organ weights were performed as previously described (Kennel *et al.*, 2004). The left testis was then decapsulated and cut into three equal parts. All samples were flash-frozen in liquid nitrogen prior to storing at -80°C until molecular analyses and compound/metabolite estimations.

Histopathology. At necropsy, each right testis was preserved in Bouin's fixative (Picroformol Bouin Aqueous, Carlo Erba Reagents, Italy). Paraffin-embedded tissue was prepared, sectioned at 5 μm , and stained with hematoxylin (Sigma) and eosin (Merck, France) for histological examination under light microscopy. The severity of Leydig cell hyperplasia was graded as described previously (Friry-Santini *et al.*, 2007).

Hormone measurements. Testosterone concentrations were determined for individual plasma samples using a specific radioimmunoassay kit (Beckman Coulter, France). The sensitivity of the method (defined as the detectable concentration) was 0.08 ng/ml. Statistical analyses on hormonal parameters were performed as previously described (Kennel *et al.*, 2004).

Compound and metabolite estimations. Residues of FM and its major metabolite, hydroxyflutamide, were extracted from 200 μl of plasma or 200 mg of testes purified using methanol and acetonitrile after addition of 2-hydroxyflutamide- d_6 internal stable labeled standard (Toronto Research Chemical, Inc., Canada). An aliquot of the extract was injected into a high-performance liquid chromatography (HPLC) with a reversed phase chromatography (on a Phenomenex Luna C_{18} column) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) with Electrospray ionization (Applied Biosystems API 4000 Triple Quadrupole Mass Spectrometer, Analyst 1.4.1.). The quantitation of FM was carried out using a standard curve established for FM in the solvent carrier (external standardization), and the quantitation of hydroxyflutamide was determined using the internal labeled standard. The limit of quantitation for both FM and hydroxyflutamide was 0.01 mg/l for plasma and 0.02 mg/kg for testes. The evaluations were conducted on each of 10 animals per group, with the exception of the high-dose group where only nine animals were used due to problems encountered during sample preparation.

Total RNA isolation and labeled cRNA preparation. Total RNA was isolated from individual control and treated testicular samples using RNeasy Mini kits (Qiagen, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. Resulting total RNA was quantified using NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.). RNA integrity (28S/18S ratio) and purity were assessed using RNA 6000 nano assay LabChips (Agilent Technologies) and analyzed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Only samples with an RNA integrity number > 7.5 (Agilent software) were employed in the microarray analysis.

Labeled complementary RNA (cRNA) targets were prepared using a Low RNA Input Linear Amplification Kit according to the "One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis" protocol provided by the manufacturer (Agilent Technologies). Briefly, total RNA (500 ng) was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using Moloney murine leukemia virus RT with oligo(dT) promoter primer and incubated at 40°C for 2 h. Using the resultant cDNAs as templates, cRNA targets were synthesized by *in vitro* transcription using T7 RNA polymerase and labeled with cyanine 3-labeled deoxycytidine triphosphate (dCTP) (PerkinElmer). The resulting labeled cRNAs were purified using RNeasy Mini Kit to remove unlabeled products and quantified by absorbance at 260 nm.

Microarray data analysis. Cyanine 3-labeled cRNA targets were hybridized to Whole Rat Genome Oligo Microarrays (Agilent Technologies, G4131F, 41,012 probes) at 65°C for 17 h following the procedures recommended by the manufacturer. After hybridization, each microarray slide was washed, dried, and scanned on an Agilent DNA microarray scanner (Agilent Technologies). Hybridization images were analyzed using Feature Extraction Software 10.5 (Agilent Technologies), and background-subtracted signal values were utilized for the following analyses. The quality of hybridization and overall chip performance were monitored by visual inspection of both internal quality control checks and the raw scanned data. Forty-two acceptable microarrays were available for the study. The microarray group sizes were 9, 8, 7, 9, and 9 for 0, 0.2, 1, 6, and 30 mg/kg/day, respectively.

Ratio (treated/control) calculations and extraction of differentially expressed genes (probes) were performed using GeneSpring software version 10.0

(Agilent Technologies). For normalization per array, the 75th percentile of the signal values taken from each microarray was used as the normalizing reference. Normalization per gene was based on calculating fold expression levels relative to the median of the control animals ($n = 9$). Finally, to filter out the ambiguous gene expression signals, spots with signal to noise (signal-background-background SD) below 100 were not included in the data.

One-way ANOVA was first applied to all treatment groups to determine dose-response effects and to identify differentially expressed sets of genes. Data were then filtered by the p values to include only data that had a p value 0.05. Any coincidental data that could have passed the first filtration were removed by using a Benjamini-Hochberg multiple testing correction. This statistical correction helped to further limit the chance of false positives to be no more than p value 0.05. Venn diagram tools were utilized to identify subsets of genes responding to particular treatments. Heat mapping to indicate the overall similarity of gene expression patterns in different dose groups was performed using two-way hierarchical clustering and visualized with red representing upregulated and blue representing downregulated genes as compared with vehicle-treated control group. The Pearson correlation coefficient was employed as a similarity measure for grouping conditions.

Functional analysis. Lists of differentially expressed genes were subjected to a subsequent post-analysis interrogation to find the main biological processes associated with the experimental design. Specifically, the "Ingenuity Pathway Analysis" (IPA) Software 8.5 (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) was applied to elucidate pathways associated with dose-related gene expression changes in the testicular tissue of FM-treated rats. The data sets containing gene identifiers and corresponding fold-changes were uploaded into the web-delivered application, and each gene identifier was mapped to its corresponding gene object (e.g., genes, messenger RNAs [mRNAs], and proteins) in the Ingenuity Pathway Knowledge Base (IPKB). The IPA is a manually curated database of functional interactions and contains previously published findings from peer-reviewed publications. Canonical pathway analysis identified pathways from the IPA library that were most significant to the data sets. Fisher's exact test was performed to calculate a p value determining the probability that the association between the genes in the data set and the canonical pathway could be explained by chance alone.

RT-qPCR analysis. In order to confirm the treatment-related changes in gene expression identified on the oligonucleotide microarrays, we investigated 33 selected transcripts by real-time RT-qPCR using the same batches of RNA as those evaluated by microarray. Ten micrograms of total RNA from control and treated samples were used for reverse transcription with random hexamer primers using the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. RT-qPCR reactions were performed using Taqman probes (Assay on demand; Applied Biosystems; RefSeq Summary in Supplementary table S2), 1/50 diluted first-strand cDNA, and AmpliTaq Gold PCR Master Mix on an ABI prism 7900 HT machine (Applied Biosystems).

To evaluate the sample distribution, relative gene expression was first calculated following the C_t method (Livak, 2001). Briefly, the resultant mRNA was normalized to a calibrator, which for each transcript was one control sample (corresponding to the same randomly chosen animal from the vehicle-treated group). Final results were expressed as the n -fold difference in gene expression relative to β -actin mRNA and calibrator as follows: n -fold = $2^{-(\Delta C_t \text{ sample} - \Delta C_t \text{ basal})}$, where C_t values of the sample and calibrator were determined by subtracting the average C_t value of the transcript under investigation from the average C_t value of the β -actin mRNA gene for each sample. In a second time, RT-qPCR data were processed with GeneSpring GX 10.0, where they were subjected to a one-way ANOVA analysis to compare differences between treatments (false discovery ratio [FDR] < 0.05). Gene expression values in this case were calculated relative to the average value for the vehicle control group.

Preparation of total protein and Western blot analysis. Whole testicular protein extracts were prepared by direct addition of 800 μ l ice-cold lysis buffer to the samples and mechanical homogenization of tissue. The lysis buffer consisted of 20mM KH_2PO_4 /80mM K_2HPO_4 , pH 7.4, 1mM EDTA, 1mM

dithiothreitol, and glycerol and was supplemented immediately prior to use with a cocktail of protease inhibitors (Sigma). The protein concentration of the tissue lysates was determined using the Bradford assay with bovine serum albumin as a standard. Proteins (1–20 μ g) were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis according to the method of Laemmli as modified by Arlotto *et al.* (1989) using a Bio-Rad Mini-Protean III slab gel apparatus. The separating gel was composed of 8–16% polyacrylamide (Pierce precise protein gels, Thermo Scientific Life Science). The separated proteins were electrophoretically transferred from the polyacrylamide gel to polyvinylidene fluoride Amersham Hybond-P (GE Healthcare Life Sciences) with a Bio-Rad Trans-Blot SD (Semi-dry transfer cell) apparatus. Anti- β -actin was diluted from 1/100 to 1/1000 (Abcam, UK) as a function of protein quantity loaded, anti-CYP11A1 was diluted at 1/5000 (Lifespan Biosciences), anti-ECHS1 was diluted at 1/1000 (Lifespan), and anti-StAR was diluted at 1/2000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The primary antibodies were coupled with a horseradish peroxidase (HRP) secondary polyclonal antibody (1/3500 dilution, Abcam) and located with the chemiluminescence Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Life Sciences) as described by the manufacturer. The signal was captured using an Image Quant 350 (GE Healthcare Life Sciences) CCD camera system for sensitive and quantitative imaging of blots by chemiluminescence, and quantitation was realized with Image Quant TL 7.0 (GE Healthcare Life Sciences). For statistical analysis, one-way ANOVA was performed to determine whether there were differences among all groups (p value 0.05), and then the Bonferroni posttest was performed to determine the significance of the differences between the pair of groups. A p value 0.05 was considered significant. The statistical tests were performed on GraphPad software (version 5.02, GraphPad Software, Inc.).

RESULTS

Molecular Measurements

Global gene expression analysis following FM treatment. FM was administered orally to male Wistar rats for 28 days as a daily dose between 0.2 and 30 mg/kg, and dose-related changes in gene expression were determined in the testes using whole genome oligonucleotide microarrays. A total of 41,012 different genes were deemed present on the microarrays and further analyzed. For the initial gene selection, a one-way ANOVA was used to extract probe sets on the array that were significantly changed due to treatment. A total of 2489 probe sets were identified when using an FDR of 0.05. With these FM-responsive probe sets, we first performed hierarchical clustering analysis (Fig. 1A), where red and blue represent up- and downregulated genes, respectively. This representation allowed examination of transcriptional profiles across all test groups, where genes and groups were clustered based solely on the similarity of the expression patterns. The resulting tree revealed a clear dose-dependent pattern, with minor expression changes observed at 0.2 mg/kg/day. A moderate deregulation in expression of the filtered probes was observed at 1 mg/kg/day, and the transcriptional profiles for the two highest dose levels showed a clear and similar deregulation.

We expected any transcriptomic changes that were causally related to toxicity to be in a set of dose-related genes rather than attributable to a single gene. To discern FM dose-responsive genes, gene expression profiles were therefore extracted for each dose and the degree of overlap among the four dose levels was examined. First, a dose-dependent increase in the number of

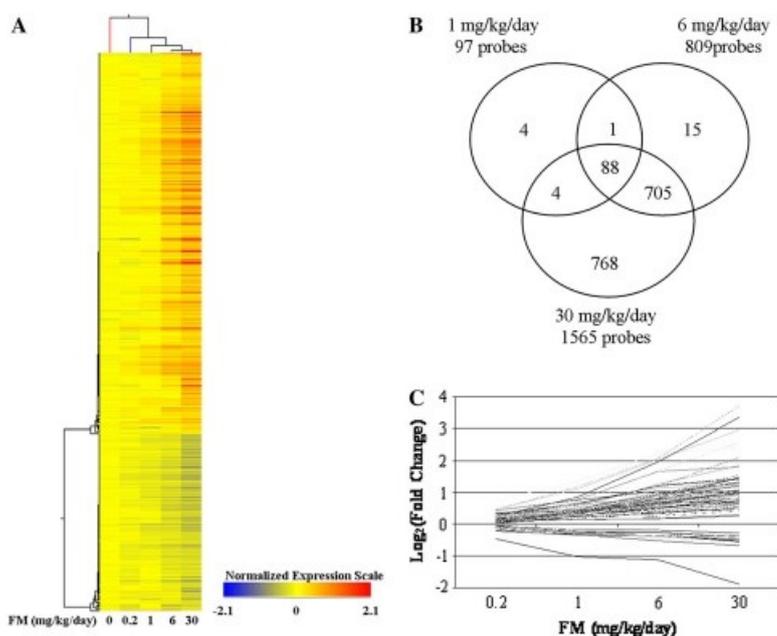


FIG. 1. Results of microarray analysis of FM-induced gene expression changes: clustering and Venn diagram highlighted a dose-related profile from 1 mg/kg/day. (A) Dose-related heat map of FM-responsive genes. Responsive gene probes were agglomeratively clustered using a cosine correlation onto a heat map, where red and blue represent up- and downregulated probes with color saturation at -2.1 and $+2.1$, respectively. Each panel represents expression following exposure to 0, 0.2, 1, 6, or 30 mg/kg/day FM, and rows of colored bars correspond to a single gene probe. (B) Venn diagram representing common or unique differentially expressed probes for the groups treated with 1, 6, and 30 mg/kg/day FM. (C) Relevance of probes dose dependently deregulated from 1 mg/kg/day. Expression profiles of the 88 probes altered from 1 mg/kg/day are represented. Fold-change data are expressed in \log_2 and as the mean for each treatment relative to the vehicle control group (seven to nine animals per group).

deregulated probes as compared with the control was observed: 18, 97, 809, and 1565 significantly altered probes were recorded for 0.2, 1, 6, and 30 mg/kg/day FM, respectively, regardless of their biological relevance (Supplementary table S1). Then, as only a few probes were deregulated at 0.2 mg/kg/day, we examined the degree of overlap among the three other dose levels. The deregulated probe lists showed a significant degree of overlap among the dose levels, as demonstrated by the Venn diagram (Fig. 1B). Indeed, there were almost no probes specifically changed at 1 mg/kg/day; and the majority (793/809) of the probes altered at 6 mg/kg/day were also differentially expressed at the higher dose (30 mg/kg/day). Furthermore, 88 probes of a total of 1585 probes deregulated due to FM treatment (5.5%) were deregulated at all three dose levels. Interestingly, each of the 88 probes displayed a monotonic profile with the fold-change increasing or decreasing, depending on the probe in question, with increasing dose level (Fig. 1C). As this set of probes was dose dependently deregulated from 1 mg/kg/day and common to the two highest dose levels, it is likely that they are pertinent for the toxicity of FM.

Functional analysis by IPA. Functional analysis was performed using the IPA application (Ingenuity System) to

evaluate the biological relevance of the genes displaying an FM dose-dependent pattern of expression. Among the 1585 unique probes deregulated by FM across all dose levels, 1193 probes were used for further functional analysis as they could be mapped to their corresponding gene objects (e.g., genes, mRNAs, and proteins) in the IPKB. Computational gene pathway analysis through statistical methods (Fisher test, threshold line $p < 0.05$, Fig. 2) indicated no pertinent deregulation at the lowest dose level of 0.2 mg/kg/day. Conversely, the major pathways affected at 30 mg/kg/day FM were related to xenobiotic metabolism, fatty acid metabolism, or amino acid metabolism. By associating modulated gene expression data from the lower doses with the top five biological processes induced by 30 mg/kg/day FM, we illustrated that molecular changes pertinent for the toxicity/lesion were, in part, already present from 1 mg/kg/day (Fig. 2). Indeed, a significant number of genes deregulated at 1, 6, or 30 mg/kg/day FM were involved in lipopolysaccharide (LPS)/interleukin 1 (IL-1)-mediated inhibition of retinoid X receptor (RXR) function or in fatty acid metabolism (Supplementary fig. S1).

The molecular deregulation was even more relevant when considering that the gene list from a lower dose was a subgroup of the gene list from the next higher dose, whatever the pathway. This exploratory analysis also established that the

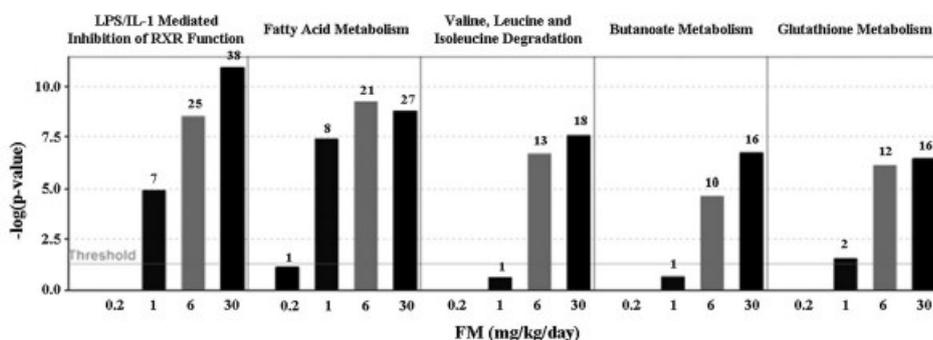


FIG. 2. Ingenuity analysis of top pathways affected by FM. IPA was applied to model-specific biological processes that were affected by exposure to FM. The analysis was based on the top five biological processes induced by 30 mg/kg/day FM and extrapolated to the results from the other doses. Y-axis is an inverse indication of p value or significance. The threshold line marks the $p = 0.05$ value. The number of deregulated genes is indicated over each histogram.

number of deregulated genes in a given metabolic pathway increased with increasing dose level (Fig. 2). As a consequence, our transcriptomic data displayed a dose-dependent profile from 1 mg/kg/day relative to the toxicity of the compound and allowed us to identify 0.2 mg/kg/day as a dose without effect.

Expression of genes associated with fatty acid catabolism. Mapping the list of differentially expressed genes deregulated by FM to the Ingenuity pathway database indicated that fatty acid metabolism was significantly affected from 1 mg/kg/day FM and above (Fig. 2), supporting our previous observations when using proteomics technology (Friry-Santini *et al.*, 2007). Moreover, several genes were shown to be involved in fatty acid catabolism and the energy metabolism associated with this process (Fig. 3A). Focusing on these processes, we found a dose-related pattern both in terms of the number of genes deregulated as well as the magnitude of the deregulation (Supplementary table S2). Examples of genes representing each of the affected processes, along with their microarray data, are illustrated in Figure 3B.

More specifically, FM modified both peroxisomal and mitochondrial beta-oxidation gene expression (*Acaa2*, *Acadm*, *Acads*, *Acadvl*, *Acox1*, *Echs1*, *Hadh2*, and *Hadhs*). In addition, the ketogenic pathway was clearly upregulated as shown by increased expression of *Hmgcs1*, *Hmgcs2*, and *Hmgcl* due to FM treatment. Upstream of beta-oxidation, some other genes were also modulated by FM. For example, lipoprotein lipase (*Lipg*), carnitine palmitoyltransferase (*Cpt1a*), and genes coding for the enzyme that converts free long-chain fatty acids into fatty acyl-CoA esters (*Acs1*) were all upregulated by FM. Besides regulation of genes involved in catabolism of fatty acids, key regulators of glycolysis (*Adhfe1*, *Gapdh*, *Pgk1*, etc.) and the tricarboxylic acid cycle (*Acy1*, *Idh1*, *Mdh1*, etc.) were also upregulated by FM.

Validation of the microarray data. The microarray results were confirmed for several genes deregulated by FM using RT-qPCR. In total, there were 33 comparisons of array and RT-qPCR data points, and 27 of these comparisons were

concordant (~82%), i.e., similar deregulation (Supplementary table S2). Expression levels of seven representative genes with various degrees of deregulation are presented in Figure 4: *Cyp11a1*, *Cyp1b1*, *Echs1*, *G6pdx*, *Hsd3b1*, *Igfbp4*, and *Star*. Proteins encoded by *Star*, *Cyp11a1*, and *Hsd3b1* play a key role in the regulation of steroid hormone synthesis. *Cyp1b1* gene encodes a member of the cytochrome P450 superfamily of enzymes. The protein encoded by *Echs1* functions in the second step of the mitochondrial fatty acid beta-oxidation pathway. The main function of glucose-6-phosphate dehydrogenase (encoded by *G6pdx*) is to produce nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, a key electron donor in the defense against oxidizing agents and in reductive biosynthetic reactions. Finally, the protein encoded by *Igfbp-4* is an important member of the insulin-like growth factor (IGF) system that acts as a transport protein for IGF-I and IGF-II and modulates their biological effects.

Comparisons of microarray and RT-qPCR data for these genes are presented in Figure 4. At 0.2 mg/kg/day, there was no change in gene transcript levels recorded in any of the gene classes studied, except two outliers observed for *Star*. At 1 mg/kg/day, alterations in some of the genes associated with steroidogenesis (*Cyp11a1*), fatty acid metabolism (*Echs1*), cell proliferation (*G6pdx* and *Igfbp4*), and xenobiotic metabolism (*Cyp1b1*) were confirmed. The two other genes associated with steroidogenesis (*Star* and *Hsd3b1*) were deregulated from 6 mg/kg/day. Doses at which modifications in gene expression started to be observed correlated well with those defined by the microarray data. In addition, the pattern of expression appeared to be dose dependent, i.e., the fold-change, whatever the gene studied, increased with the dose. Similarly, it was noticed that the interindividual variability increased dose dependently. Overall expression changes obtained with the microarrays were in good agreement with those measured by RT-qPCR.

Protein analysis. Fatty acid metabolism and steroidogenesis have been shown to be the major pathways associated with the testicular lesion induced by FM, based on the data

described herein and previous investigations in this laboratory. Because several upregulated genes involved in these metabolic pathways were detected in our microarray analysis as well as by RT-qPCR (Fig. 4), we conducted Western blot analyses with three key regulators of β -oxidation and steroidogenesis (ECHS1, CYP11A1, and StAR). The expression ratios of these proteins normalized to the loading control (β -ACTIN) between control and FM treatment (0.2–30 mg/kg/day), and representative photographs are shown in Figure 5. The relative expression for each of the proteins investigated was consistent with the expression ratios determined by quantitative transcriptomics (microarray and RT-qPCR). In addition, as with the microarray and RT-qPCR analyses, the overall trends of the protein accumulation levels were dose dependently increased by FM. Similarly, there was no noticeable change in the expression of any of the proteins investigated at 0.2 mg/kg/day FM. The antiandrogenic treatment significantly upregulated the P450 cytochrome protein CYP11A1 by 1.8-, 2.6-, and 3.2-fold at 1, 6, and 30 mg/kg/day, respectively, and by 1.5, 2.1, and 2.4 for the ECHS1 isomerase protein. For these two proteins, the deregulation threshold was observed at 1 mg/kg/day and corroborated with transcriptomic results. Concerning the cholesterol transporter StAR protein (induced by 1.6-, 1.8-, and 2.8-fold at 1, 6, and 30 mg/kg/day FM), the dose at which modifications in protein expression were observed (1 mg/kg/day) appeared to be lower than the dose at which molecular alterations were identified by microarray and RT-qPCR data (6 mg/kg/day). Globally, we demonstrated a good correlation between the accumulation level of transcripts and proteins for candidates involved in fatty acid metabolism and steroidogenesis.

Conventional Toxicological Parameters

Following 28-day exposure, the concentrations of FM and its major metabolite, hydroxyflutamide, in plasma and testicular tissue were determined. No detectable FM was found in any samples investigated (data not shown). No appreciable trace of hydroxyflutamide was detected in either plasma or testes at 0.2 mg/kg/day; however, a dose-dependent increase in hydroxyflutamide concentration for the other dose levels was observed, despite an interindividual variability (Fig. 6).

Terminal body weights and testis weights were not affected at any dose level. The weights of the androgen-dependent tissues were decreased by FM exposure (Supplementary fig. S2), which

is consistent with previously published data (Friry-Santini *et al.*, 2007; Rouquie *et al.*, 2009). This effect was statistically significant at 1 mg/kg and above for the seminal vesicles and at 6 and 30 mg/kg/day for the prostate and the epididymis.

A dose-related increase in the mean plasma testosterone level (Supplementary table S3) was recorded from 6 mg/kg/day (3.4-fold and 10.7-fold, $p \leq 0.01$ for 6 and 30 mg/kg/day, respectively). Similarly, histopathological examination revealed adverse effects, namely, Leydig cell hyperplasia, only at the two highest doses tested (6 and 30 mg/kg FM). The severity (minimal to moderate) of this lesion increased in a dose-related manner (Table 1).

DISCUSSION

DNA microarray technology provides a sensitive means of assessing global gene deregulation resulting from compound treatment in any tissue (Suter *et al.*, 2004). Consequently, the possibility exists that this methodology could help in the hazard characterization of a compound and could contribute in identifying no-effect dose levels. However, a current challenge is to determine how these molecular data would impact on existing NOAELs based on standard toxicological parameters. Rouquie *et al.* (2009) recently demonstrated that, using a similar model to that described herein, phenotypic and molecular treatment-related changes in the testes were observed at the same dose level. However, as only relatively few genes were investigated by RT-qPCR, the possibility exists that a complete full-genome analysis of testicular samples would have refined the no-transcriptomic effect level by identifying the modulation of additional gene classes.

The present dose-response study was therefore designed to ascertain whether no-effect doses could be established through complete full-genome analysis and if so whether they correlated with those established using conventional parameters. Consequently, our study integrated standard toxicological endpoints with molecular (microarray supported by RT-qPCR and protein) profiles to identify the dose-dependent progression from no-effect to adaptive change to frank testicular toxicity following FM treatment. Dose levels of 0.2–30 mg/kg/day FM (based on Friry-Santini *et al.*, 2007; Rouquie *et al.*, 2009) were chosen so that testicular lesions would be observed for at least the top dose, thereby allowing the correlation of genomic

FIG. 3. Expression pattern of FM-responsive genes associated with fatty acid catabolism. (A) Schematic representation of fatty acid catabolism. *Acaa1*, acetyl-CoA acyltransferase 1; *Acaa2*, acetyl-CoA acyltransferase 2; *Acad*, acetyl-CoA dehydrogenase; *Acox1*, acyl-CoA oxidase 1; *Acs*, acyl-CoA synthetase; *Ant2*, adenine nucleotide translocator 2; *Atp2b3*, ATPase, Ca^{++} transporting, plasma membrane 3; *Cact*, carnitine-acylcarnitine translocase; *Cpt1*, carnitine palmitoyltransferase 1; *Cpt1b*, carnitine palmitoyltransferase 2; *Ech1*, enoyl CoA hydratase 1 (peroxisomal); *Echs1*, enoyl CoA hydratase (short chain, 1, mitochondrial); *Gck*, glucokinase; *Hadh*, hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; *Hibadh*, 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase; *Hmgcl*, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase; *Hmgcs2*, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2; *Lpl*, lipoprotein lipase; *Mut*, methylmalonyl CoA mutase; *Pcca*, propionyl CoA carboxylase; *Phgdh1l*, phosphoglycerate dehydrogenase like 1; *Scot-s*, succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase 1. (B) Details of the mRNA expression profiles of representative genes for several biological processes involved in the fatty acid catabolism pathway. Each panel shows FM dose-response profiles ($n = 7-9$ individual animals) based on microarray data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA).

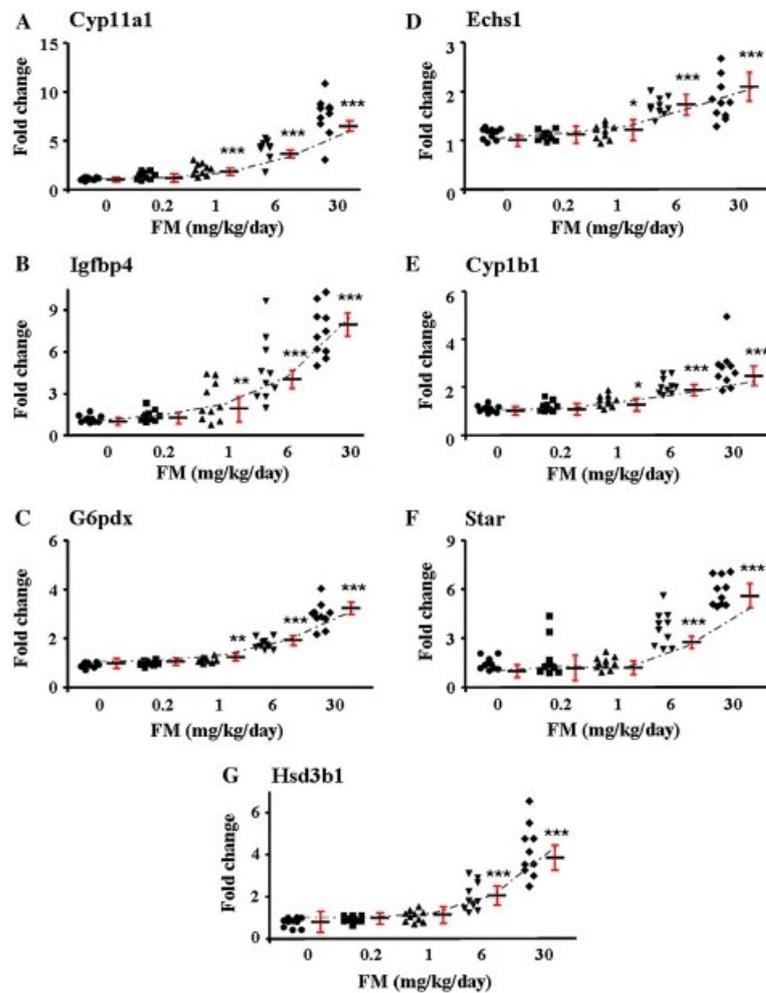


FIG. 4. Real-time RT-qPCR analyses of selected genes altered in microarray analyses due to FM exposure. Gene expression values were normalized to β -actin. Fold-change data are presented as individual animal data (symbols, relative to one control animal) and as the mean \pm SD for each treatment versus vehicle control group, based on 10 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA). The dotted line represents the fold-change for each gene as determined by microarray analyses (seven to nine animals per group).

changes with adverse effects. In contrast, the lowest dose was predicted to induce no detectable toxicity and probably no significant genomic changes. The intermediate doses were expected to allow the identification of phenotypic and genomic transitions. We observed dose-related increases in the severity of the testicular lesion, Leydig cell hyperplasia (Table 1), as well as in plasma testosterone concentrations starting from 6 mg/kg/day, thus confirming the previously established NOAEL of 1 mg/kg/day (Andrews *et al.*, 2001; Friry-Santini *et al.*, 2007; Kunimatsu *et al.*, 2004; Rouquie *et al.*, 2009; Toyoda *et al.*, 2000).

Microarray analysis revealed many genes differentially expressed following FM exposure (Fig. 1). A dose-related pattern, both in terms of the number of genes deregulated and the magnitude of deregulation, was characterized with a clear genomic point of departure at 1 mg/kg/day (Figs. 2 and 3). Based on IPA, the most significant biological function affected was related to LPS/IL-1-mediated inhibition of the ligand-activated transcription factor RXR (Fig. 2). This IPA pathway includes deregulated genes coding for drug metabolism enzymes such as glutathione *S*-transferases (*Gsta1*, *Gsta3*, *Gsta4*, *Gsta5*, *Gstm1*, *Gstm5*, and *Gsto1*) and sulfotransferase (*Sult1a1*).

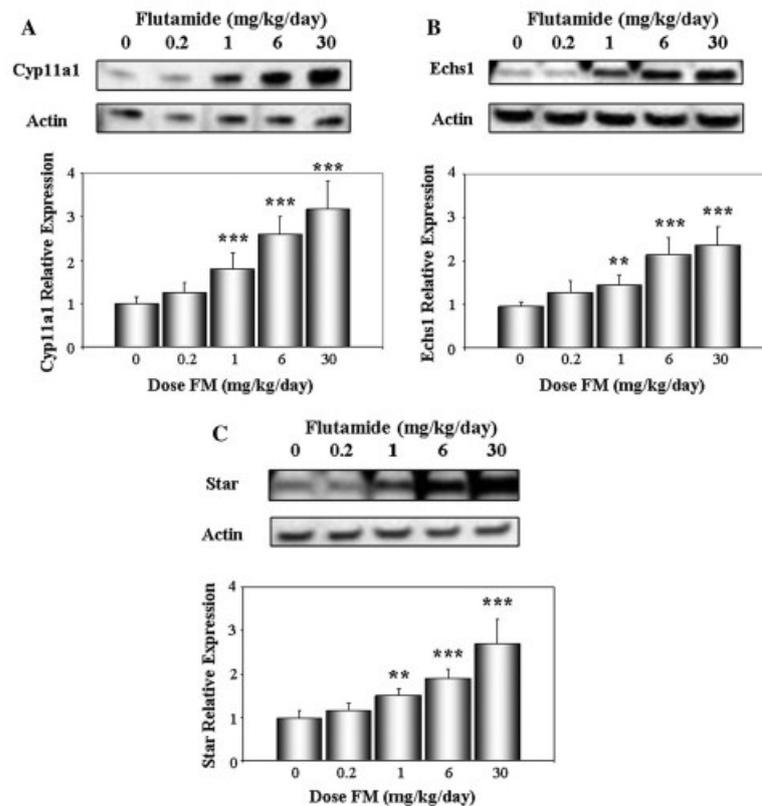


FIG. 5. Protein expression in testicular tissue following FM treatment. The profiles of selected proteins involved in fatty acid metabolism or steroidogenesis were determined in individual testicular samples from control and FM-treated groups (0.2–30 mg/kg/day). Total proteins were subjected to Western blotting, and membranes were incubated with (A) anti-CYP11A1 antibody, (B) anti-ECHS1 antibody, or (C) anti-StAR antibody. The data are presented as the mean relative expression (normalized to β -ACTIN) \pm SD based on 10 animals per group (lower panels; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ by one-way ANOVA), with representative photographs shown in the upper panels.

Recent studies using RT-PCR and/or immunohistochemistry have demonstrated that RXR receptors are expressed in the testes (Boulogne *et al.*, 1999; Dufour and Kim, 1999). This transcription factor and its heterodimerization partners (e.g., constitutive androstane receptor, peroxisome proliferator-activated receptor, and pregnane x-receptor) play important roles in metabolic homeostasis (Shulman and Mangelsdorf, 2005); however, the few publications that have described the relationship between FM and this pathway (Cui *et al.*, 2008; Harmsen *et al.*, 2009; Shet *et al.*, 1997) have been associated with the liver and not, as for our study, the testes. Furthermore, our microarray data are supported by the fact that FM could not be detected in the testes or plasma at any dose investigated, whereas its major metabolite, hydroxyflutamide, was clearly detected in the same samples from 1 mg/kg/day (Fig. 6).

The lipid metabolism pathway leading to testosterone production was identified as a major process affected from 1 mg/kg/day FM, based on microarray and RT-qPCR data

(Figs. 2, 3, and 4). This pathway includes fatty acid metabolism, sterol biosynthesis (cholesterol *de novo* synthesis), and C-21 steroid hormone metabolism (testosterone synthesis). The functions of the deregulated genes were consistent with the phenotypic effects (i.e., increased testosterone and Leydig cell hyperplasia) and are coherent with previously published data. For example, Friry-Santini *et al.* (2007) reported changes in testicular proteins involved in lipid metabolism in rats exposed to 150 mg/kg/day FM. Similarly, Rouquie *et al.* (2009) identified by RT-qPCR a deregulation of selected genes associated with lipid metabolism in rat testis from 6 mg/kg/day FM and above. However, in our study using genome-wide microarray and computational gene pathway analyses supported by RT-qPCR data, we identified genomic alterations in lipid metabolism from 1 mg/kg/day. Furthermore, our Western blot data confirmed significant changes in the accumulation of proteins associated with lipid metabolism starting from 1 mg/kg/day (Fig. 5). We considered that a number of factors might

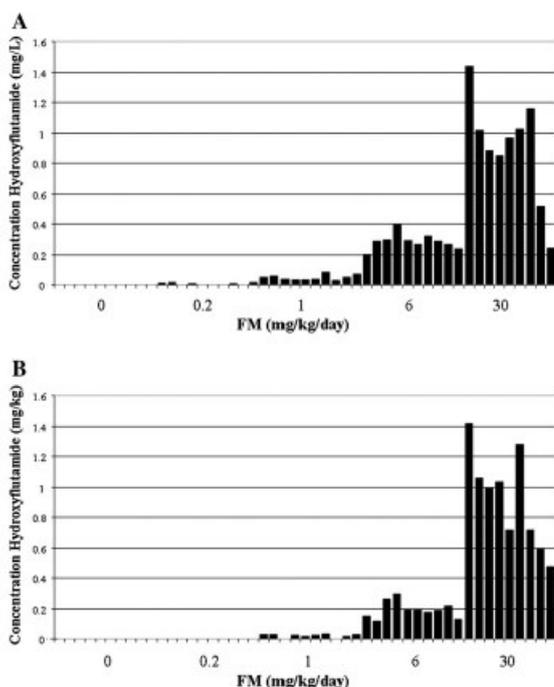


FIG. 6. FM metabolite dosage in plasma and testes. Residues of FM metabolite (hydroxyflutamide) were extracted from plasma (A) or testes (B). The limit of quantitation was 0.01 $\mu\text{g/ml}$ for plasma and 0.02 $\mu\text{g/g}$ for testes. Identification of FM major metabolite in plasma (A) and testicular tissue (B) highlighted a dose-dependent profile of detection observed from 1 mg/kg/day.

account for the different outcomes, with the most likely being the range of genes studied (full-genome investigation vs. selected transcripts) and the statistical analyses used.

We recorded an alteration in the expression of genes associated with fatty acid catabolism and the energy metabolism linked to this process in testicular tissues following treatment with FM starting from 1 mg/kg/day. Gene changes were observed in every step of the breakdown of triglycerides

TABLE 1
Histopathological Changes in the Testes

Dose (mg/kg/day)	0	0.2	1	6	30
Diffuse Leydig cell hyperplasia					
Minimal (grade 1)	0	0	0	10	2
Slight (grade 2)	0	0	0	0	6
Moderate (grade 3)	0	0	0	0	2
Total	0/10	0/10	0/10	10/10	10/10

Note. Data are presented as the number of animals affected in each group, based on 10 animals per group. Grading of severity is as described previously (Friry-Santini *et al.*, 2007). Briefly, minimal (grade 1), increase in number of Leydig cells within the interstitial space; slight (grade 2), complete replacement of the interstitial space; and moderate (grade 3), presence of bridging strands of Leydig cells surrounding the seminiferous tubules (one or two cell layers).

to short chain carbon molecules (Fig. 3). Specifically, FM treatment caused an upregulation of the endothelial lipase *Lipg* (allowing fatty acid cleavage from glycerol), acyl-CoA synthetase (*Acs*) isoforms (conversion of fatty acids to acyl-CoA), *Cpt1a*, peroxisomal β -oxidation enzymes (*Acox1*; acyl-CoA degradation), mitochondrial β -oxidation enzymes (*Acaa2*, *Acadm*, *Acads*, *Acadvl*, *DCI*, *Decr1*, *Echs1*, *Hadh2*, and *Hadhsc*), and ketogenic enzymes (*Hmgcs2* and *Hmgcl*). Based on these data, it would appear that FM regulates the rate-limiting steps in peroxisomal β -oxidation (*Acox1*; Kim and Miura, 2004), ketogenesis (*Hmgcs2*; Fukao *et al.*, 2004), and mitochondrial β -oxidation, like *Cpt1* (Eaton, 2002; Bonnefont *et al.*, 2004) and *Acad* (Kim and Miura, 2004).

Our molecular findings were supported to some extent by the ECHS1 Western blot results. Moreover, recent results demonstrated that enzymes of the mitochondrial fatty acid β -oxidation are abundantly expressed in Leydig cells (Fukasawa *et al.*, 2009). These findings strengthen our hypothesis that FM treatment is associated with fatty acid catabolism in testes, especially as the testicular lesion was Leydig cell hyperplasia. Besides our study, the only evidence of a link between FM and fatty acid catabolism (β -oxidation) is an *in vitro* mouse hepatocyte study using microarray investigations (Coe *et al.*, 2007). Consequently, our results indicate that the overall effect of altered gene expression associated with fatty acid catabolism may ultimately increase acetyl-CoA, which is necessary for the *de novo* synthesis of cholesterol, thereby resulting in increased testosterone. Several genes, whose products are involved in carbohydrate metabolism, were also modulated by FM (Fig. 3), and it is likely that these participate indirectly in steroid biosynthesis as a source of energy.

Thanks to the global microarray analysis coupled with qPCR, we determined that relevant molecular responses occurred at 1 mg/kg/day, whereas the adverse phenotypic changes were recorded at 6 and 30 mg/kg/day. Such an approach suggests that it is possible to detect small molecular effects relevant to the testicular lesion, if indeed they exist. It is therefore pertinent to discuss the results obtained at 0.2 mg/kg/day FM. By not applying stringency criteria to the fold-change, the microarray global analysis revealed some differentially expressed FM-responsive probes at 0.2 mg/kg/day. In order to reduce false-positive rates, many publications have used a cutoff of two- to threefold, which limits the ability of the microarray experiment to detect small but biologically relevant changes. Consequently, we investigated our microarray data through RT-qPCR analyses. Among the 18 microarray probes identified as being differentially expressed at 0.2 mg/kg/day, only one probe was validated by RT-qPCR, and this gene was unrelated to the adverse changes induced by FM.

In conclusion, this study has allowed us to explore the notion of dose-dependent transitions in "toxic" responses, in this case, the response of the rat testis to FM. Indeed, we have identified the existence of a no-observed genomic effect level of 0.2 mg/kg/day, and our data suggest the existence of thresholds:

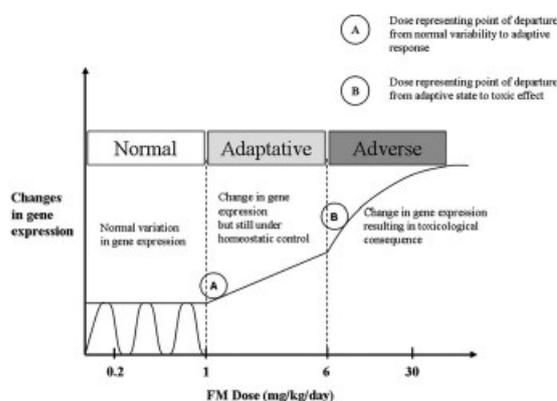


FIG. 7. Conceptual framework integrating transcriptomic data into standard toxicological studies to identify a no-effect dose level.

(1) pharmacological/adaptative (point A, Fig. 7), where perturbations caused by FM are sufficient to lead to pertinent initial molecular responses in the absence of a testicular lesion as determined by the standard toxicological endpoints (1 mg/kg/day), e.g., gene expression changes of relevant metabolic pathways, and (2) toxicological/adverse (point B, Fig. 7), when perturbations become sufficiently important to cause increased changes in gene expression as well as frank toxicity (e.g., Leydig cell hyperplasia) associated with the genomic alterations (6 and 30 mg/kg/day). Comparable approaches, albeit with other models, have recently been reported. For example, the correlations between transcriptomic changes and phenotypic changes have been reported concerning the effects of formaldehyde in the rat nasal tissue (Andersen *et al.*, 2008). Similarly, Naciff *et al.* (2005) demonstrated that gene expression changes in fetal rat testis were elicited by transplacental exposure to ethinyl estradiol, genistein, and bisphenol A at doses where there were no discernible tissue changes. Our investigations, supported by published data, highlight the possibility that molecular investigations could aid in the identification of no-effect dose levels. However, this database is still limited and requires additional investigations using compounds with different mechanisms of action, expanded to other organs and lesions before the potential of such an approach can be fully realized.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <http://toxsci.oxfordjournals.org/>.

FUNDING

Bayer SAS and the French "Association Nationale de la Recherche et de la Technologie" to S.L.; European Chemical Industry Council Endocrine Modulators Study Group.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Marie-Pierre Côme, Céline Ferré, and Stéphanie Bocart for help and useful advice; Valérie Pozzoli-Cipolla for technical expertise in testosterone measurements; Edouard Reyez-Gomez for histopathological expertise; and Isabelle Meilland-Berthier for HPLC-MS/MS analysis.

REFERENCES

- Andersen, M. E., Clewell, H. J., III, Bermudez, E., Willson, G. A., and Thomas, R. S. (2008). Genomic signatures and dose-dependent transitions in nasal epithelial responses to inhaled formaldehyde in the rat. *Toxicol. Sci.* **105**, 368–383.
- Andrews, P., Freyberger, A., Hartmann, E., Eiben, R., Loof, I., Schmidt, U., Temerowski, M., and Becka, M. (2001). Feasibility and potential gains of enhancing the subacute rat study protocol (OECD test guideline no. 407) by additional parameters selected to determine endocrine modulation. A pre-validation study to determine endocrine-mediated effects of the antiandrogenic drug flutamide. *Arch. Toxicol.* **75**, 65–73.
- Arlotto, M. P., Greenway, D. J., and Parkinson, A. (1989). Purification of two isozymes of rat liver microsomal cytochrome P450 with testosterone 7 alpha-hydroxylase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 441–457.
- Bonnefont, J. P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A., and Bastin, J. (2004). Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol. Aspects Med.* **25**, 495–520.
- Boulogne, B., Levacher, C., Durand, P., and Habert, R. (1999). Retinoic acid receptors and retinoid X receptors in the rat testis during fetal and postnatal development: immunolocalization and implication in the control of the number of gonocytes. *Biol. Reprod.* **61**, 1548–1557.
- Coe, K. J., Jia, Y., Ho, H. K., Rademacher, P., Bammler, T. K., Beyer, R. P., Farin, F. M., Woodke, L., Plymate, S. R., Fausto, N., *et al.* (2007). Comparison of the cytotoxicity of the nitroaromatic drug flutamide to its cyano analogue in the hepatocyte cell line TAMH: evidence for complex I inhibition and mitochondrial dysfunction using toxicogenomic screening. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1277–1290.
- Cui, X., Thomas, A., Gerlach, V., White, R. E., Morrison, R. A., and Cheng, K. C. (2008). Application and interpretation of hPXR screening data: validation of reporter signal requirements for prediction of clinically relevant CYP3A4 inducers. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 680–689.
- Cunningham, M. L., Bogdanffy, M. S., Zacharewski, T. R., and Hines, R. N. (2003). Workshop overview: use of genomic data in risk assessment. *Toxicol. Sci.* **73**, 209–215.
- Dufour, J. M., and Kim, K. H. (1999). Cellular and subcellular localization of six retinoid receptors in rat testis during postnatal development: identification of potential heterodimeric receptors. *Biol. Reprod.* **61**, 1300–1308.
- Eaton, S. (2002). Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog. Lipid Res.* **41**, 197–239.
- Freeman, K. (2004). Toxicogenomics data: the road to acceptance. *Environ. Health Perspect.* **112**, A678–A685.
- Friry-Santini, C., Rouquie, D., Kennel, P., Tinwell, H., Benahmed, M., and Bars, R. (2007). Correlation between protein accumulation profiles and conventional toxicological findings using a model antiandrogenic compound, flutamide. *Toxicol. Sci.* **97**, 81–93.
- Fukao, T., Lopuschuk, G. D., and Mitchell, G. A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **70**, 243–251.

- Fukasawa, M., Atsuzawa, K., Mizutani, K., Nakazawa, A., and Usuda, N. (2009). Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acid [beta]-oxidation enzymes in rat testis. *J. Histochem. Cytochem* **58**, 195–206.
- Hamadeh, H. K., Bushel, P. R., Jayadev, S., Martin, K., DiSorbo, O., Sieber, S., Bennett, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J. C., et al. (2002). Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicol. Sci.* **67**, 219–231.
- Harmsen, S., Meijerman, I., Beijnen, J. H., and Schellens, J. H. (2009). Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **64**, 35–43.
- Kennel, P. F., Pallen, C. T., and Bars, R. G. (2004). Evaluation of the rodent Hershberger assay using three reference endocrine disrupters (androgen and antiandrogens). *Reprod. Toxicol.* **18**, 63–73.
- Kim, J. J., and Miura, R. (2004). Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences. *Eur. J. Biochem.* **271**, 483–493.
- Kubota, K., Ohsako, S., Kurosawa, S., Takeda, K., Qing, W., Sakaue, M., Kawakami, T., Ishimura, R., and Tohyama, C. (2003). Effects of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat. *J. Reprod. Dev.* **49**, 403–412.
- Kunimatsu, T., Yamada, T., Miyata, K., Yabushita, S., Seki, T., Okuno, Y., and Matsuo, M. (2004). Evaluation for reliability and feasibility of the draft protocol for the enhanced rat 28-day subacute study (OECD Guideline 407) using androgen antagonist flutamide. *Toxicology* **200**, 77–89.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402–408.
- Naciff, J. M., Hess, K. A., Overmann, G. J., Torontali, S. M., Carr, G. J., Tiesman, J. P., Foertsch, L. M., Richardson, B. D., Martinez, J. E., and Daston, G. P. (2005). Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17[alpha]-ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A. *Toxicol. Sci.* **86**, 396–416.
- Ohsako, S., Kubota, K., Kurosawa, S., Takeda, K., Qing, W., Ishimura, R., and Tohyama, C. (2003). Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide. *J. Reprod. Dev.* **49**, 275–290.
- Okahara, A., Nomura, A., Tanioka, H., Sakamoto, H., Yamashita, K., and Ikuse, T. (2000). Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 5). Effects of repeated doses of flutamide for 2 and 4 weeks. *J. Toxicol. Sci.* **25**, 63–70.
- Peets, E. A., Henson, M. F., and Neri, R. (1974). On the mechanism of the antiandrogenic action of flutamide (alpha-alpha-alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionoluidide) in the rat. *Endocrinology* **94**, 532–540.
- Rouquie, D., Friry-Santini, C., Schorsch, F., Tinwell, H., and Bars, R. (2009). Standard and molecular NOAELs for rat testicular toxicity induced by flutamide. *Toxicol. Sci.* **109**, 59–65.
- Shet, M. S., McPhaul, M., Fisher, C. W., Stallings, N. R., and Estabrook, R. W. (1997). Metabolism of the antiandrogenic drug (Flutamide) by human CYP1A2. *Drug Metab. Dispos.* **25**, 1298–1303.
- Shulman, A. I., and Mangelsdorf, D. J. (2005). Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **353**, 604–615.
- Simard, J., Luthy, I., Guay, J., Belanger, A., and Labrie, F. (1986). Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* **44**, 261–270.
- Stierum, R., Conesa, A., Heijne, W., Ommen, B., Junker, K., Scott, M. P., Price, R. J., Meredith, C., Lake, B. G., and Groten, J. (2008). Transcriptome analysis provides new insights into liver changes induced in the rat upon dietary administration of the food additives butylated hydroxytoluene, curcumin, propyl gallate and thiabendazole. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2616–2628.
- Suter, L., Babiss, L. E., and Wheeldon, E. B. (2004). Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. *Chem. Biol.* **11**, 161–171.
- Toyoda, K., Shibutani, M., Tamura, T., Koujitani, T., Uneyama, C., and Hirose, M. (2000). Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.* **74**, 127–132.

Données supplémentaires : microARN et Flutamide

Identification du profil d'expression et appréciation de la dose sans effet

1. Généralités sur les miARN

Au cours de ces dernières années, les microARN (miARN) se sont imposés comme des éléments majeurs du contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Initialement découverts chez *Caenorhabditis elegans* en 1993 [645], les miARN étaient considérés comme des régulateurs exclusifs des organismes multicellulaires. Ceci a amené certains chercheurs à penser que les miARN apportent un niveau de complexité supplémentaire dans la régulation de l'expression génique, distinguant les organismes multicellulaires des simples organismes unicellulaires. Cependant la découverte récente de l'existence des miARN dans la *Chlamydomonas reinhardtii*, une algue unicellulaire, indique que les miARN sont probablement issus d'un processus que l'évolution aurait choisi de conserver [646]. D'une manière générale, les miARN vont jouer un rôle de "guide" dans la régulation post-transcriptionnelle en s'appariant avec les séquences ARNm cibles, ce qui entraîne une inhibition de la traduction et/ou une dégradation du transcrite cible [647]. Il est estimé que près du tiers des gènes serait régulé par les miARN chez l'Homme [648], d'ailleurs plus de 700 miARN ont été identifiés et clonés à ce jour [649]. Il y a fort à parier qu'un grand nombre d'autres miARN seront mis en évidence dans les années à venir, étant donné qu'ils semblent contrôler quasiment tous les processus cellulaires [650].

Plus précisément, les miARN sont des ARN non codants de 21 à 23 nucléotides de long. Ils sont synthétisés presque exclusivement par l'ARN polymérase II sous la forme de longs précurseurs appelés pri-miARN. Le pri-miARN est modifié par l'ajout d'une coiffe en 5' et d'une queue poly(A) en 3', tout comme les ARNm, mais n'est pas traduit en protéine. Il se replie et adopte des structures secondaires en tige boucle, puis subit une étape de maturation par un complexe formé d'une RNase de type III, Drosha et de son cofacteur DGCR8. Il en résulte alors une molécule de 60 à 70 nucléotides, possédant comme caractéristiques une extrémité 5' phosphate et une extrémité 3' présentant deux nucléotides sortants. Cette molécule intermédiaire appelée pré-miARN, est ensuite exportée du noyau vers le cytoplasme par l'exportine-5 et Ran-GTP. Une dernière étape de maturation est nécessaire afin de

produire le miARN. Elle implique Dicer, une seconde RNase de type III, qui est responsable du clivage de la boucle terminale du pré-miARN : ceci libère un duplex de miARN d'environ 22 nucléotides. Le miARN mature est incorporé dans le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) sur la base de ses propriétés thermodynamiques, tandis que son complémentaire, le miARN* est dégradé [651]. (Figure 52)

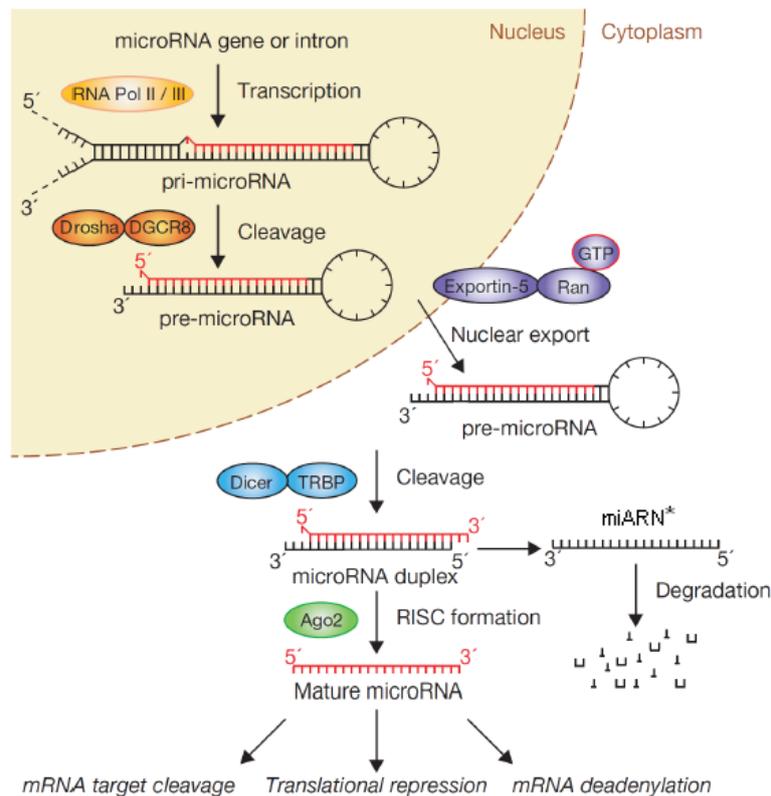


Figure 52 : Voie classique de biogénèse des miARN, et leurs actions sur les transcrits cibles
(D'après Winter *et al.*, 2009)

Le complexe RISC fonctionnel, nécessaire à l'action des miARN, est au moins constitué d'un miARN mature et d'une des ribonucléoprotéines de la famille Argonaute (AGO). Au sein du complexe RISC, le miARN mature sert de guide pour : (i) stimuler le clivage d'un ARNm cible lorsque la complémentarité miARN/ARNm est totale, ou (ii) réprimer la traduction des transcrits possédant une complémentarité partielle avec le miARN.

Ce type de régulation est actuellement très étudié dans la pathologie humaine. Ainsi, les miARN ont été démontrés comme impliqués dans le cancer [652, 653], mais également dans un grand nombre d'autres pathologies comme le diabète [654], les maladies cardiovasculaires [655], ou encore les maladies neurologiques [656, 657].

2. Contexte de l'étude complémentaire

Depuis leur découverte dans les années 1990, les miARN ont prouvé à jouer un rôle complexe dans le fonctionnement normal et anormal de nombreux systèmes organiques. Bien qu'ils soient largement étudiés dans la recherche contre le cancer, une attention moindre a été portée sur leur régulation par des substances aux propriétés de PE. En effet, la plupart des investigations d'ordre épigénétique menées jusqu'à présent, ont principalement été axées sur la méthylation de l'ADN ; alors que seulement quelques études ont mis en relation l'exposition de tels composés (PE) avec des modifications d'histones ou d'expression des miARN. D'autre part, bien qu'à l'heure actuelle, les effets pharmacodynamiques et toxiques du flutamide sur l'appareil reproducteur mâle soient bien caractérisés chez le rat adulte et décrits dans la littérature [150, 151, 531, 533], le mécanisme d'action moléculaire par lequel il induit des effets adverses est mal défini. Nos récentes recherches ont démontré la capacité de cet anti-androgène à moduler le niveau d'accumulation des transcrits impliqués dans la voie de biosynthèse des stéroïdes ainsi que dans le catabolisme des acides gras, après exposition des rats pendant 28 jours [537, 641]. Ces changements moléculaires se traduisent également par des modifications au niveau protéique [640, 641]. Parce que les miARN constituent des éléments majeurs du contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel, les altérations rapportées après une exposition au flutamide pourraient en partie résulter de modifications des profils d'expression des miARN.

3. Résultats supplémentaires

16 miARN différenciellement exprimés dans le testicule après traitement au flutamide

Afin de vérifier cette hypothèse, une première approche a consisté en l'appréciation du niveau d'expression de 372 miARN connus et répertoriés à l'aide de puces (microarray), au sein des échantillons testiculaires témoins et forte dose (30 mg/kg/jour) issus de l'étude flutamide précédemment décrite. Pour satisfaire à des contraintes de coût, seuls les échantillons de 11 animaux (6 témoins, 5 traités) ont été analysés. Les protocoles employés pour le traitement des données sont détaillés dans la partie "matériels et méthodes". Finalement, 16 miARN différenciellement exprimés après traitement au flutamide à la forte

dose ont été identifiés (t-test ; p -value ≤ 0.05). Ces miARN et leur quantité relative d'expression respective (fold-change) sont présentés dans la Table 5.

MicroARN	Fold Change	p-value
rno-miR-30b-5p	-1.066	0.047
rno-miR-743b	-1.106	0.008
rno-miR-34a	-1.114	0.030
rno-miR-872	-1.140	0.015
rno-miR-742	-1.167	0.033
rno-miR-463	-1.187	0.025
rno-miR-883	-1.189	0.023
rno-miR10a-5p	-1.267	0.018
rno-miR-672	1.116	0.016
rno-miR-146a	1.311	0.011
rno-miR-652	1.311	0.002
rno-miR-542-3p	1.473	0.020
rno-miR-542-5p	1.500	0.012
rno-miR-450a	1.583	0.001
rno-miR-322*	1.597	0.002
rno-miR-210	1.808	0.001

Table 5 : miARN différentiellement exprimés dans le testicule après traitement des rats au flutamide pendant 28 jours à une dose de 30 mg/kg/jour (n= 5-6 rats/groupe)

miARN altérés et recherches bibliographiques...

Lorsque l'on se réfère à la bibliographie, très peu de données font état de la fonction véritable d'un miARN ; seules sont corrélées leurs expressions différentielles en fonction d'une pathologie dans un tissu défini au sein desquels les mesures ont été effectuées (médulloblastome, cancer du sein, de la prostate, du poumon, du foie...). Nous ne relaterons ici que les implications clairement établies pour chacun des miARN différentiellement exprimés au sein de l'étude flutamide.

Bien qu'associé avec le cancer du sein [658], ou même du poumon [659], à l'ischémie [660], à la schizophrénie [661]..., miR-30b a surtout été rapporté comme étant sensible aux œstrogènes [661]. Concernant miR-34a, son implication dans la prolifération cellulaire et l'apoptose a été clairement démontrée [662-665]. En effet, une régulation négative de ce miARN par Myc est essentielle à la tumorigénèse, et améliore la survie des cellules

tumorales. A l'inverse, la régulation positive de miR-34a par p53 semble augmenter son acétylation et son activité, contribuant aux effets pro-apoptotiques de ce suppresseur de tumeur. Les gènes qu'il cible sont nombreux, on peut entre autres citer Bcl-2, Ccdn1, Cdk4, E2f3, N-myc, Notch1 (pour revue voir [662]). Le miARN miR-10a contrôle la migration et l'invasion des cellules en ciblant les gènes *homeobox* ; ce suppresseur de tumeur affecte également la capacité des cellules à subir une transformation oncogénique [666]. Il a aussi été identifié comme régulateur de la biogenèse des ribosomes, et par conséquent de la production globale des protéines [667]. Concernant miR-146a, il s'agit d'un miARN capable de moduler l'immunité innée, la réponse inflammatoire et antivirale de façon négative, et dans certaines circonstances, de stimuler la tumorigénèse ou même d'inhiber l'invasion, la migration et la capacité métastatique de cellules cancéreuses [668]. Les miR-542 ont principalement été étudiés dans le cas de neuroblastomes [669, 670] et de carcinomes de l'endomètre [671-673], approches dans lesquelles ont été découvertes leurs propriétés anti-proliférative et suppresseur de tumeur. Enfin, miR-210 a été défini comme le miARN prédominant régulé par l'hypoxie. En effet, il apparaît induit lors d'hypoxie dans tous les types cellulaires testés jusque là, et est surexprimé dans la plupart des cancers. D'un point de vue clinique, sa surexpression est associée à un pronostic défavorable dans différents cancers [674]. De plus, miR-210 est capable d'inhiber les voies de réparation de l'ADN, et ainsi promouvoir l'instabilité génomique [675]. Il facilite également la dégradation de l'ARNm de gènes normoxiques (associés à un taux d'oxygène "normal") [676], et pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'angiogenèse [677]. Ces cibles sont nombreuses, parmi celles-ci on peut citer : E2f3, Nptx1, Rad52, Acvr1b, Mnt, Casp8ap2, Hoxa-1 et -9 [678]. Enfin, son induction dépend d'un facteur fonctionnel, *hypoxia-inducible factor* (HIF) [676], lequel est surexprimé à la forte dose de flutamide d'après nos analyses de puces à ADN. Du fait de la cohérence entre les analyses de puces à ADN et miARN, des investigations plus poussées devraient être menées afin de confirmer une implication possible de miR-210 dans l'hyperplasie des cellules de Leydig résultant d'une exposition au flutamide.

Trop peu d'éléments sont associés aux miR-743, miR-872, miR-742, miR-463, miR-883, miR-672, miR-652, mi-450a et miR-322, pour être présentés.

Ces données permettent d'apporter quelques indications pour une meilleure compréhension du mécanisme d'action du flutamide au niveau moléculaire. Cet anti-androgène semble altérer la prolifération cellulaire via la dérégulation de l'expression de certains miARN, qui pourrait contribuer à l'hyperplasie des cellules de Leydig. Toutefois, ces

informations sont à prendre avec prudence, puisque la bibliographie ne reflète pas l'ensemble des processus biologiques altérés, car focalisée principalement sur l'apoptose et la croissance cellulaire dans un contexte de cancer. Il paraît donc judicieux d'associer ces données bibliographiques à des études *in silico*, ainsi qu'à des analyses génomiques et protéomiques.

miARN et prédiction de cibles : altérations de processus biologiques associés au métabolisme des lipides et à la prolifération cellulaire

Les cibles potentielles des miARN ont été prédites à l'aide d'une analyse bioinformatique par algorithmes, dont la plus utilisée TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) a été mise en place. Cette liste a été comparée à celle que nous avons précédemment établie grâce aux puces d'expression du génome entier pour la même dose [641]. Parmi les gènes en commun, seuls ont été considérés ceux présentant une dérégulation inverse à celle du miARN régulant leur expression (Figure 53). Cette analyse a ainsi permis l'identification de 29 cibles répondant à ces critères (cf. *Annexe*).

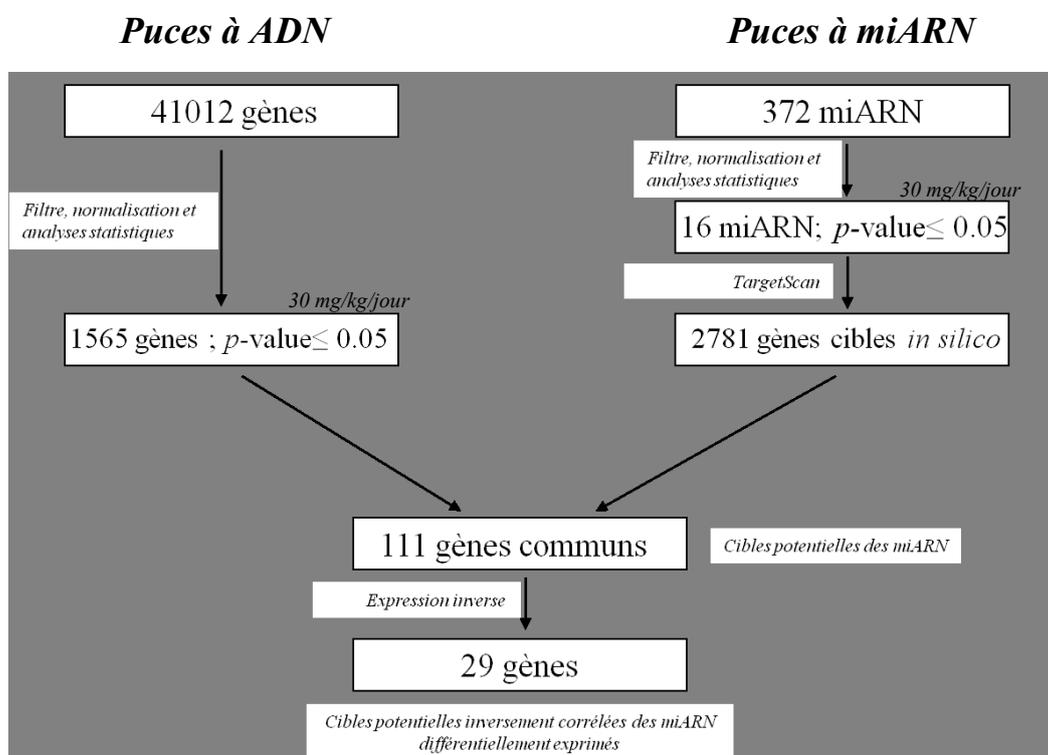


Figure 53 : Identification de cibles potentielles des miARN différentiellement exprimés après traitement au flutamide : un parallèle entre les analyses *in silico* et les données générées expérimentalement
 Schéma de principe décrivant les procédures utilisées pour identifier les cibles potentielles des miARN différentiellement exprimés à partir des résultats issus des analyses du génome testiculaire, lors d'un traitement à la forte dose de flutamide (30 mg/kg/jour)

L'exploitation et l'interprétation de ces résultats ont été effectuées à l'aide du logiciel IPA, afin d'identifier les processus biologiques les plus pertinents et significatifs se rapportant aux données établies. Il s'avère que les principales fonctions moléculaires et cellulaires affectées par les miARN différenciellement exprimés après traitement au flutamide sur la base de la liste de gènes cibles potentiels sont associées au métabolisme des carbohydrates et des lipides, ainsi qu'à la croissance et la prolifération cellulaire (Table 6). Ces données sont en adéquation avec les analyses publiées par notre laboratoire (transcrits et protéines, [537, 640, 641]).

Top 5, Fonctions moléculaires et cellulaires	<i>p</i> -value	Nombre de gènes
Métabolisme des carbohydrates	4,59E-05 - 2,65E-02	8
Transport moléculaire	4,59E-05 - 4,80E-02	15
Biochimie de petites molécules	4,59E-05 - 4,80E-02	32
Métabolisme des lipides	1,04E-04 - 4,80E-02	14
Prolifération et croissance cellulaire	2,83E-04 - 4,80E-02	8

Table 6 : Principales fonctions cellulaires et moléculaires (IPA) modulées par les miARN après traitement au flutamide (30 mg/kg/jour) définies à partir de la liste des cibles potentielles

Validation des données de puces à miARN

Des analyses de MicroRNA TaqMan RT-PCR ont été réalisées dans le but de confirmer les résultats générés par les puces, et ce, pour 8 des 16 miARN différenciellement régulés par le flutamide (fold-change ≥ 1.2). Les niveaux d'expression évalués par PCR en temps réel de chacun des 8 miARN ont été corrélés avec les données de microarray miARN (Figure 54), et corroborent ces dernières. Seul le résultat concernant le miARN miR-10a dont la quantité relative d'expression établie par les puces est négative, n'a pu être validé.

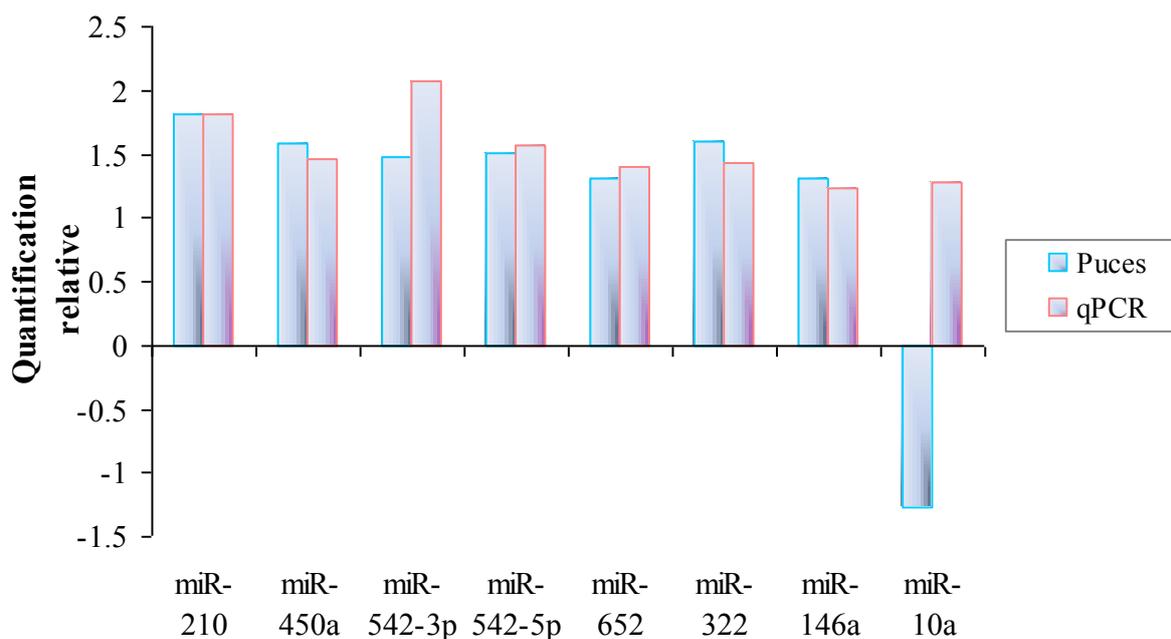


Figure 54 : Confirmation des données de puces à miARN par TaqMan qRT-PCR

L'expression de 8 miARN différentiellement exprimés dans le testicule après traitement au flutamide (30 mg/kg/jour) a été évaluée par PCR en temps réel, et comparée aux données de puces. Les résultats basés sur 6 animaux témoins et 5 animaux traités sont exprimés selon un ratio traité/témoin.

miARN et dose-réponse : évaluation de la dose sans effet

Dans le contexte de notre premier article, nous avons évalué la progression dose-dépendante de l'expression des miARN suite à l'exposition au flutamide (30 mg/kg/jour), et tenté d'identifier une dose sans effet. Ces investigations ont été menées par PCR en temps réel pour les 5 miARN présentant les données d'expression les plus élevées (Figure 55).

Quel que soit le miARN considéré, une augmentation claire et statistiquement significative de l'expression est observée à 30 mg/kg/jour. Une progression dose-dépendante du profil d'expression est évidente pour 4 des 5 miARN à partir de 6 mg/kg/jour ; la dérégulation à cette dose n'est toutefois pas significative. Le peu de connaissances que nous avons concernant cette entité (miARN) ne nous permet pas de préciser si la modulation de son niveau d'expression, même faible, n'engendrerait pas une régulation négative des ARNm cibles. En conséquence, d'après nos premiers examens, il apparaît que la "dose sans effet moléculaire", dose à laquelle l'expression des miARN n'est pas altérée, soit évaluée par PCR à 1 mg/kg/jour.

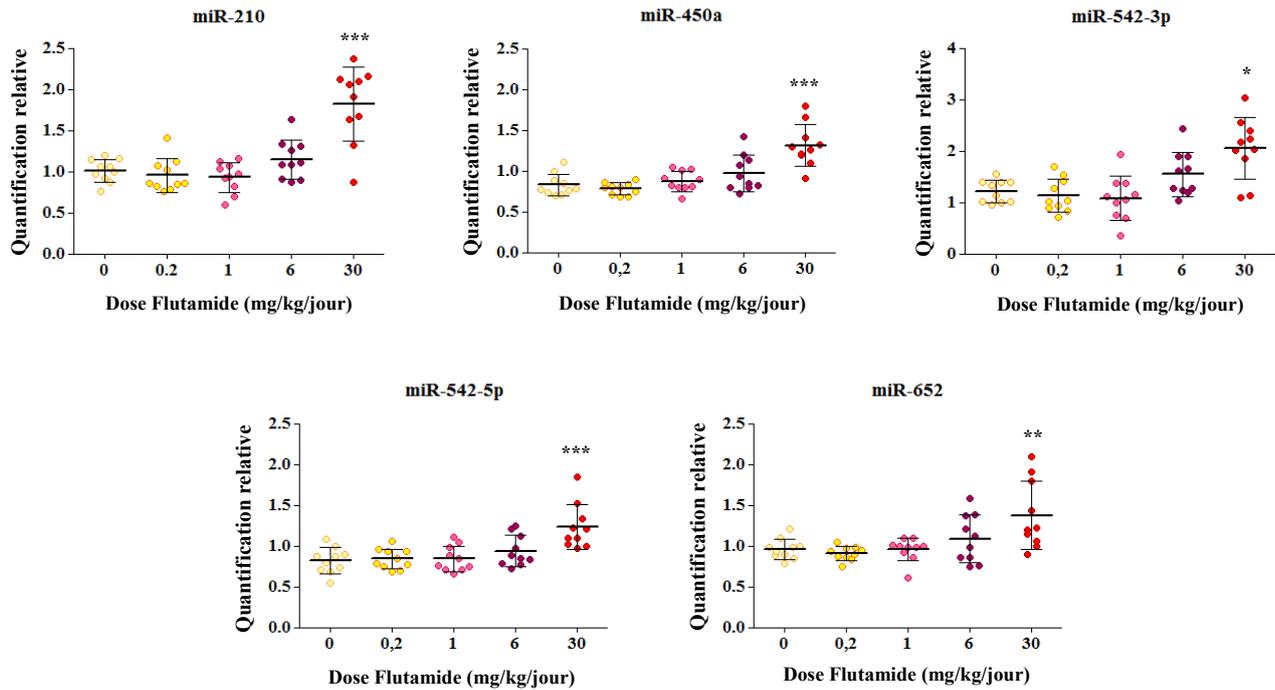


Figure 55 : Appréciation de l'effet-dose et de la dose sans effet par miARN TaqMan qRT-PCR de 5 miARN différemment exprimés après traitement au flutamide (30 mg/kg/jour) (n=10 ; résultats exprimés en quantité relative d'expression \pm SD ; * p -value \leq 0.05, ** p -value \leq 0.01, * p -value \leq 0.001)**

En somme, ces données supplémentaires indiquent que : (i) un traitement au flutamide (30 mg/kg/jour) induit une altération de l'expression de certains miARN au niveau du testicule de rat adulte ; (ii) leurs cibles semblent impliquées dans le métabolisme de lipides et des carbohydrates (cf. données expérimentales), ainsi que dans la prolifération et la croissance cellulaire (cf. données expérimentales et bibliographiques) ; (iii) sur la base de données préliminaires, un profil dose-dépendant monotonique de l'expression des miARN peut être établi à la suite d'une exposition au flutamide, de même qu'une "dose sans effet moléculaire" peut être identifiée.

Article 2 : Nouvelles investigations concernant les mécanismes moléculaires à l'origine de la toxicité testiculaire induite par le 1,3-dinitrobenzène

(New insights into the molecular mechanisms of 1,3-dinitrobenzene induced testicular toxicity)

Sophie Ludwig, Helen Tinwell, David Rouquié, Frédéric Schorsch, Marc Pallardy, Rémi Bars

CONTEXTE ET RESUME DE L'ARTICLE

De récents rapports suggèrent que la qualité du sperme de l'Homme a diminué au cours de ces 30 à 40 dernières années, tandis que l'incidence des anomalies des voies génitales mâles et l'infertilité ne cessent d'augmenter [8, 437, 438, 679]. Environ 30% des cas d'infertilité masculine demeurent cryptogéniques [680]. Dans ce contexte, l'évaluation des risques potentiels pour la santé suite à l'exposition à des agents chimiques ou physiques, ainsi que l'identification de leur mode d'action sont d'une importance capitale, surtout lorsque ces agents peuvent interférer avec la capacité des individus à produire une descendance normale.

Parmi ceux-ci, on peut citer le 1,3-Dinitrobenzène (DNB), employé dans la fabrication des colorants, explosifs et plastiques. Ce composé nitro-aromatique est considéré comme un produit toxique à action testiculaire directe, qui endommagerait en premier lieu les cellules de Sertoli. Bien que ses effets toxiques sur la gonade mâle soient aujourd'hui bien caractérisés par des méthodes conventionnelles, la pathogenèse de ses lésions, ainsi que son mode d'action restent à préciser. En particulier, les mécanismes moléculaires conduisant aux atteintes testiculaires constatées suite à une exposition au DNB n'ont été que faiblement explorés, et souvent restreints à l'investigation des voies de transduction du signal impliquées dans le phénomène d'apoptose [637-639]. Une analyse plus large est donc requise de manière à définir les origines de la toxicité testiculaire induite par le DNB.

Une première étude *in vivo* "effet-dose" a été menée, au cours de laquelle des rats mâles ont été exposés *per os* à 0 (contrôle), 0.1, 1, 4 ou 8 mg/kg/jour de DNB pendant 4 jours. Le choix des doses et de la durée de l'étude découlent de données bibliographiques et

d'études préliminaires réalisées au sein du laboratoire. L'application de la transcriptomique aux études conventionnelles de toxicologie a été entreprise dans le but de mieux comprendre comment le DNB induit des effets délétères sur le testicule. Le protocole utilisé est détaillé dans la partie "matériels et méthodes", et suit un schéma expérimental similaire à celui de l'étude flutamide précédemment décrite. D'un point de vue gravimétrique, seul le poids des testicules apparaît diminué après exposition à la forte dose. La concentration en testostérone plasmatique et les gènes impliqués dans la stéroïdogénèse n'ont pas été affectés, malgré de sévères lésions histopathologiques enregistrées dans les testicules à partir de 4 mg/kg/jour. L'incidence et la sévérité de ces dernières atteintes augmentent de façon dose-dépendante. Lorsque les dommages étaient importants à 8 mg/kg/jour, les tubules ont été classés comme fortement perturbés. La cellularité y avait été considérablement altérée ; en conséquence les échantillons s'y rapportant n'ont pas été pris en compte pour les analyses transcriptomiques du testicule. Celles-ci ont révélé une altération des processus biologiques associés au cycle et à la mort cellulaire à 4 mg/kg/jour. En particulier, nous avons identifié et confirmé par PCR quantitative un grand nombre de gènes dérégulés, impliqués dans la voie "Rôle mitotique des Polo-like kinases" essentielle à l'entrée en mitose et à la ségrégation des chromosomes. Il s'agit de la première analyse globale évaluant les profils d'expression génique à la suite d'une exposition au DNB. L'ensemble de ces données novatrices sont en adéquation avec nos observations histopathologiques, ainsi qu'avec des publications antérieures.

Nous avons approfondi nos investigations par une seconde étude aigüe et en cinétique, appréciant les effets pharmacologiques précoces du DNB sur les testicules. Des rats mâles ont reçu une seule dose de DNB (4 mg/kg) par gavage, et ont été sacrifiés 8, 24, 48 et 72 heures après cette administration unique. De la même façon que dans l'étude subaigüe, les poids de différents organes cibles, ainsi que la concentration de testostérone ont été mesurés. Une analyse histologique du testicule a également été effectuée, tout comme des analyses moléculaires. Quel que soit le temps après administration et les paramètres traditionnels de toxicité étudiés (gravimétrie et histologie), aucun changement significatif n'a été constaté. Toutefois, une diminution non négligeable (~50%) du niveau de testostérone plasmatique a été mise en évidence 48 heures après une exposition unique de DNB. Cet événement a pu être associé à une réduction significative de l'expression testiculaire des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, ainsi qu'à une réduction précoce de l'expression du gène codant la LH au niveau de l'hypophyse (gonadotrophine régulant la production de testostérone). Ces données préliminaires suggèrent que le DNB interfère d'une certaine manière avec le système

endocrinien, et ceci avant que la lésion testiculaire ne se soit mise en place. Ce dernier aspect a été examiné au travers d'un test de stéroïdogénèse réglementaire *in vitro* de criblage des PE (cellules H295R), à l'aide de dosages hormonaux et d'analyses moléculaires. Au sein de cet essai, le DNB se révèle capable d'altérer la production des hormones stéroïdes.

L'ensemble de nos données suggère que le DNB, non seulement induit l'apoptose et interfère avec la progression du cycle cellulaire, mais module aussi la biosynthèse des hormones stéroïdes. De ce fait, il semblerait que la toxicité testiculaire du DNB ne soit pas simplement due à une activité toxique directe sur les cellules de Sertoli, mais implique également une composante hormonale dans la mise en place des effets adverses. Les résultats permettant une meilleure caractérisation de la toxicité du DNB au niveau du testicule de rat adulte sont présentés dans l'Article 2, à partir de la page 195.

En perspective, la réalisation d'études *in vitro* sur cultures primaires de cellules de Leydig, siège de la stéroïdogénèse, contribuerait à améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu lors d'une exposition au DNB.

New insights into the molecular mechanisms of 1,3-dinitrobenzene induced testicular toxicity

Sophie Ludwig*, Helen Tinwell*¹, David Rouquié*, Frédéric Schorsch[†], Marc Pallardy[§], Rémi Bars*

Author Affiliations

* *Bayer SAS, Department of, Research Toxicology, 06903 Sophia-Antipolis, France*

[†] *Department of, Pathology, 06903 Sophia-Antipolis, France*

[§] *Universud, Faculty of Pharmacy, INSERM UMR 996, Chatenay-Malabry, France*

¹To whom correspondence should be addressed at Bayer SAS, Research Toxicology, 355 rue Dostoïevski, 06903 Sophia-Antipolis, France. Fax: 33 (0)4 93 95 84 54. E-mail: helen.tinwell@bayer.com.

Short Title: Reevaluation of DNB induced testicular toxicity

ABSTRACT

Several studies have shown that 1,3-dinitrobenzene (DNB) causes injury to Sertoli cells and induces apoptosis in the surrounding germinal cells in male laboratory rats ; however, the mechanisms by which DNB induces testicular toxicity are not well understood. In this context, we have conducted studies using standard parameters and molecular tools, to better understand the pathogenesis of the testicular effects produced by DNB, as well as its mode of action. Wistar rats were orally exposed to 0.1-8 mg DNB/kg/day for 4 days. Testosterone concentrations were not affected at any dose level, but marked histopathological lesions in the testes were recorded from 4 mg/kg/day. Global transcriptomic analysis of rat testes revealed cell cycle and cell death as the major biological processes affected. In particular, we identified an alteration in the expression of genes associated with cell cycle progression (“mitotic roles of polo-like kinase”). These observations were further investigated in a second study, where rats were sacrificed between 8 and 72 hours after a single oral dose (4mg/kg/day). Whatever the time point and the empirical toxicological parameters tested, no adverse change was recorded. Surprisingly, in contrast to the 4-day data, plasma testosterone was reduced 48 hours after a single dose, which was corroborated by pituitary and testicular steroidogenesis-related gene expression. Additionally, DNB was tested *in vitro* in the H295R adrenal cell steroidogenesis assay to confirm the effects on steroidogenesis. Our overall results indicated that DNB should not only be considered as a testicular direct-acting toxicant. Sertoli cells have been previously proposed as the primary target for DNB, nevertheless additional investigations evaluating DNB effects on Leydig cells are needed since changes in testosterone concentration have been recorded.

INTRODUCTION

Recent reports suggest that human semen quality has declined during the last 60 years, whereas the incidence of male genital tract abnormalities and infertility has increased [8, 437, 438, 679]. Approximately 10–15% of the human population has a fertility problem, with about 30% of male infertility cases still remaining cryptogenic [680, 681]. In this context, assessment of potential health risks associated with exposure to chemical or physical agents is of paramount importance, especially when they may interfere with the ability of individuals to produce normal progeny.

Among these agents, 1,3-dinitrobenzene (DNB), a nitroaromatic intermediate used in various organic syntheses including manufacture of dyes, plastics, and explosives, is a potent testicular toxicant. Indeed, administration of DNB to male rats results in testicular atrophy [618, 682], histological damage to the testis characterized by multinucleated giant cells and the presence of marginated chromatin [541, 615], a decrease in sperm number, as well as abnormal sperm morphology and motility [624, 683]. The mechanism of the testicular toxicity induced by DNB has been demonstrated to cause a direct injury to the Sertoli cells [541], with germ cell damage and apoptosis as a secondary event [543, 638, 684].

Although DNB have been intensively investigated, the pathogenesis of the testicular effects produced by this compound, as well as its mode of action remain unclear. In particular, the literature contains relatively few investigations conducted to elucidate the possible molecular mechanisms leading to the testicular toxicity associated with DNB exposure [637-639]. These studies are mainly restricted to RT-PCR investigations of the signal transduction pathways implicated in apoptosis. To fully elucidate DNB mode of action, a broader analysis of the molecular changes associated with its testicular toxicity is required.

Toxicogenomics is a promising discipline that integrates toxicology and gene expression evaluation, where altered transcript levels in tissues or cells following exposure to compounds are analyzed in association with conventional toxicological endpoints. Anchoring the molecular changes to the resulting phenotypic lesions can help to define the sequence of key molecular events associated with the mechanism of action, and can allow a more effective safety assessment of chemicals or new drug candidates [685-688]. This approach has been successfully applied to the study of several types of toxicities, including hepatotoxicity [689, 690], nephrotoxicity [691], genotoxicity [692] and testicular toxicity [537, 641]. Such studies have also led to the establishment of gene expression signatures that are likely to be indicative or predictive of cellular injuries.

We have further characterized adult rat testicular toxicity induced by the direct acting toxicant DNB, examining the temporal and dose-dependent effects of DNB exposure on gene expression in combination with other standard endpoints. We established cell cycle and cell death as the major biological processes affected in the testis based on transcriptomic data (microarray and qPCR) in a repeat-oral dose study. These findings correlated well with the histopathological examinations of the present study as well as with earlier publications. In particular, we identified a high number of down-regulated genes involved in the “Mitotic Role of Polo-like Kinase” pathway. In a subsequent single oral dose study, hormone data (plasma concentrations and pituitary and testicular steroidogenesis-related gene expression analysis)

surprisingly indicated that DNB interferes with testosterone biosynthesis. This latter aspect was further investigated *in vitro* using the H295R adrenal cell steroidogenesis assay [693, 694], to assess the potential of the chemical to modulate steroid hormone biosynthesis. Changes in hormone secretions in the cells were observed supported by molecular data: DNB especially caused a significant decrease of the testosterone level. Overall our results indicated that although DNB is considered as a direct-acting testicular toxicant, this molecule also affects steroidogenesis implying that there are endocrine-mediated effects which could precede the adverse testicular lesions.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. 1,3-Dinitrobenzene (CAS no. 99-65-013311-84-7), Forskolin, and Dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (France). All the chemicals used were of the highest quality available.

Animals and housing. Studies were performed in accordance with The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Council, 1996) using male Wistar Rj:WI (IOPS HAN) rats (R. Janvier, France), aged 10 weeks old at the start of treatment. All animals were housed and maintained as described previously [537, 640]. Prior to treatment, rats were assigned to a group by the stratified randomization method based upon the body weight on the day before the start of treatment, so that there was no significant variation in mean body weights among the groups. Each group contained 10 animals.

In vivo Study Designs. Two studies were conducted: the first being a 4-day repeat dose study (Exp.1) and the second being a single oral dose study (Exp.2). More precisely for the multiple dose study (Exp.1), rats were treated daily for 4 days with either vehicle (0.5% methylcellulose in sterilized water) or DNB at a dose of 0.1, 1, 4 or 8 mg/kg/day, and they were sacrificed 24 hours after the last dose. For the single dose study (Exp.2), rats were sacrificed 8, 24, 48 and 72 hours after a single oral dose of 4 mg/kg DNB. In both studies, DNB was administered by oral gavage using a dose volume of 5 ml/kg body weight. Dose levels were selected based on preliminary dose-range finding studies and the testicular histopathology data. All animals were sacrificed by isoflurane (Baxter, France) inhalation followed by exsanguination under deep anesthesia. Terminal blood samples were collected

from each animal and were placed into tubes containing lithium heparin. Plasma samples were prepared and stored at -80°C, until analyzed for testosterone concentrations. At necropsy, the following organs were excised from each rat, trimmed free of fat and connective tissue, and weighed: liver, testes, right epididymides, prostate, seminal vesicles, adrenal glands and pituitary glands. All paired organs were weighed together with the exception of the testes and epididymides, which were weighed separately. Statistical analyses on body and organ weights were performed as previously described [142]. The left testis was then decapsulated and cut into three equal parts. Testicular and pituitary samples were flash-frozen in liquid nitrogen prior storing at -80°C until transcriptomic analyses. The right testis was used for microscopic analyses as described below.

Histopathology. After necropsy, each right testis was preserved in Bouin’s fixative (Picroformol Bouin Aqueous, Carlo Erba Reagents, Italy). Paraffin-embedded tissue was prepared, sectioned at ~5 µm, and stained with hematoxylin (Sigma) and eosin (Merck, France) for histological examination under light microscopy.

Immunohistochemistry. To assess apoptosis, immunohistochemistry was performed using the streptavidin-biotin complex (Ventana, France) on supplementary histological sections of paraffin-embedded testes. Sections (5 µm) were immunohistochemically stained with antibodies against cleaved Caspase-3, and cleaved Caspase-6, and using an autostainer Discovery XT system (Ventana Medical Systems). The list of source, type dilution and technique is given in the Table. Cleaved Caspase-3 and cleaved caspase-6 stained slides were evaluated semi-quantitatively by two different pathologists, counting the number of positive cells in three fields at high power fields (400X).

Table 1 : Type of antibodies used, dilution, supplier and antigen retrieval

Antibody	Type	Dilution	Supplier	Antigen retrieval
Cleaved Caspase-3	Rabbit monoclonal antihuman	1:200	Cellular Signaling Technology	Citric buffer, 60 minutes at 98°C in pH 6 solution
Cleaved Caspase-6	Rabbit polyclonal antihuman	1:500	Abcam	Citric buffer, 20 minutes at 98°C in pH 6 solution

In vitro Assessment: H295R cell culture and experimental design. The H295R human adrenocortical carcinoma cell line was provided by the American Type Culture Collection

(ATCC #CRL-2128; ATCC, USA), and cells were grown in 75 cm² flasks with 35 ml of supplemented medium at 37°C/5% CO₂. Supplemented medium was a 1:1 v/v Dulbecco's modified Eagle's medium plus Ham's F-12 nutrient mixture (ATCC) supplemented with 1% insulin-transferrin-sodium selenite (ITS) + Premix, 2.5% v/v NuSerum (BD Bioscience, USA) and 0.1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, USA). The medium was changed 1-2 times a week and 1x trypsin/EDTA (ATCC) was used for sub-culturing of the cells. For each experiment, cells were plated at a density of 0.3 x 10⁶ cells/mL supplemented media (1mL/well) in 24-well cell culture plates (Costar, UK). After the attachment period (24 hours), the medium was changed and the experiment was initiated. Cells were exposed for 48 hours to the positive control, to different concentrations of DNB whose concentrations were selected from preliminary cytotoxicity experiments, or to DMSO used as a vehicle (1% (v/v), maximum). Forskolin (1 µM) was used as a positive control in all experiments. At the end of each experiment, the culture medium was stored at -80°C prior to hormone analysis (progesterone, testosterone and estradiol). For nucleic acid extraction, cells were lysed in the culture plate after removal of the medium by the addition of lysis buffer-β-mercaptoethanol mixture.

Hormone measurements.

In vivo. Testosterone concentrations were measured by using double-antibody radioimmunoassay kit systems with ¹²⁵I labeled radioligands (DSL-4000 ACTIVE, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., USA) on a gamma counter (Beckman Coulter, France) according to manufacturer's instructions. The standard curve was based on dilution series of the respective provided kit-standards. Under our conditions of test, the sensitivity of the method defined as the detectable concentration was 0.0036 ng/ml. Statistical analyses on hormonal parameters were performed as previously described [142].

In vitro. The progesterone, testosterone and estradiol concentrations were measured from culture media samples using specific Enzyme ImmunoAssay (EIA) kits supplied by Enzo life Sciences, USA for progesterone and testosterone and by Cayman Chemical Company, USA for estradiol. Under our conditions of test, the limits of detection were 8.6, 95.7 and 5.7 pg/mL for progesterone, testosterone and estradiol respectively. Statistical analyses were performed using a one-way Anova with GraphPad Prism Software (version 5.02, GraphPad software Inc., USA). The values were expressed as mean ± SD, and a *p*-value ≤ 0.05 was considered as being statistically significant.

Total RNA isolation. Total RNA was isolated from testicular, pituitary or H295R cellular lysate samples using RNeasy Mini kits (Qiagen, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. Resulting total RNA was quantified using NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., USA). RNA integrity (28S/18S ratio) and purity was assessed using RNA 6000 nano assay LabChips[®] (Agilent Technologies, USA) and analyzed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Only samples with a RNA integrity number (RIN) > 8.0 (Agilent software) were employed for further analyses.

Labeled cRNA Preparation. In the multiple dose study, labeled cRNA targets were prepared from testicular individual control and treated RNA samples, using a Low RNA Input Linear Amplification Kit according to the "One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis" protocol provided by the manufacturer (Agilent Technologies). Briefly, total RNA (500 ng) was reverse-transcribed into cDNA, using Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase with oligo(dT) promoter primer, and incubated at 40 °C for 2 h. Using the resultant cDNAs as templates, cRNA targets were synthesized by in vitro transcription using T7 RNA polymerase and labeled with cyanine 3-labeled dCTP (PerkinElmer, USA). The resulting labeled cRNAs were purified using RNeasy Mini Kit to remove unlabeled products and quantified by absorbance at 260nm.

Microarray data analysis. Cyanine 3-labeled cRNA targets were hybridized to Whole Rat Genome Oligo Microarrays (Agilent Technologies, G4131F, 41,012 probes) at 65°C for 17h following the procedures recommended by the manufacturer. After hybridization, each microarray slide was washed, dried, and scanned on an Agilent DNA microarray scanner (Agilent Technologies). Hybridization images were analyzed using Feature Extraction Software 9.1 (Agilent Technologies), and background-subtracted signal values were utilized for the following analyses. The quality of hybridization and overall chip performance were monitored by visual inspection of both internal quality control checks and the raw scanned data. Thirty-seven acceptable microarrays were available for the study. The microarray group sizes were 8, 10, 10, and 9 for 0, 0.1, 1, and 4 mg/kg/day DNB, respectively.

Ratio (treated/control) calculations and extraction of differentially expressed genes (probes) were performed using GeneSpring software version 10.0 (Agilent Technologies). For normalization per array, the 75th percentile of the signal values taken from each microarray was used as the normalizing reference. Per gene normalization was based on calculating fold expression levels relative to the median of the control animals. Finally, to filter out the

ambiguous data, spots with signal-to-noise (signal – background – background SD) below 100 were not included in the data.

One-way analysis of variance (ANOVA) was first applied to all dose groups to determine dose effects and differentially expressed sets of genes. Data were then filtered by the p -values to include only data that had a p -value ≤ 0.0005 . Any coincidental data that could have passed the first filtration was removed by using a Benjamini-Hochberg multiple testing correction. This statistical correction helped to further limit the chance of false positives to be no more than p -value ≤ 0.0005 . Genes identified as statistically significant were subject to an additional filter by selecting only genes that exhibited a ≥ 1.2 -fold change from the control group. Heat mapping to indicate the overall similarity of gene expression patterns in different dose groups, was performed using two-way hierarchical clustering and visualized with red representing up-regulated and blue representing down-regulated genes as compared to vehicle treated control group. The Pearson correlation coefficient was employed as a similarity measure for grouping conditions.

Functional analysis. Lists of differentially expressed genes were subjected to a subsequent post-analysis interrogation to find the main biological processes associated with the experimental design. Specifically, the “Ingenuity Pathways Analysis” (IPA) Software 8.5 (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) was applied to elucidate molecular and cellular pathways associated with expression changes in the testicular tissue of DNB-treated rats. The data sets containing gene identifiers and corresponding fold changes were uploaded into the web-delivered application and each gene identifier was mapped to its corresponding gene object (*e.g.*, genes, mRNAs, and proteins) in the Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPKB). The IPA is a manually curated database of functional interactions and contains previously published findings from peer-reviewed publications. Molecular and cellular function analysis identified molecular and cellular functions from the IPA library that were most significant to the data set. The significance of the association between the data set and the molecular and cellular functions was measured in two ways. First, a ratio of the number of genes from the data set that map to the pathway divided by the total number of genes that map to the pathway was determined. Second, Fischer’s exact test, followed by Benjamini–Hochberg (BH) multiple testing correction, was used to calculate a p -value determining the probability that the association between the genes in the data set and the pathway can be accounted for by chance only.

RT-qPCR analysis. A real-time quantitative reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR) approach was used with selected transcripts. cDNA was synthesized with 1.5 (*in vitro*), 5 (pituitary samples), or 10 (testicular samples) micrograms of total RNA from control and treated samples, through a reverse transcription with random hexamer primer using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol. RT-qPCR reactions were performed using Taqman probes (Assay on demand; Applied Biosystems; RefSeq Summary in Supplementary data, Table S1), 1/25 (*in vitro* and pituitary samples) or 1/50 (testicular samples) diluted first-strand complementary DNA, AmpliTaq Gold PCR Master Mix on an ABI prism 7900 HT machine (Applied Biosystems). β -Actin (*in vivo* rat samples) or 18S (*in vitro*, H295R cells) were selected as reference gene for the quantitative calculations.

To evaluate the sample distribution, relative gene expression was first calculated following the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak, 2001). Briefly, the resultant mRNA was normalized to a calibrator; in each case, the calibrator chosen was one control sample (corresponding to the same animal from the vehicle treated group randomly chosen). Final results were expressed as the *n*-fold difference in gene expression relative to β -actin or 18S mRNA and calibrator as follows: $n\text{-fold} = 2^{-(\Delta C_t \text{ sample} - \Delta C_t \text{ basal})}$, where ΔC_t values of the sample and calibrator were determined by subtracting the average C_t value of the transcript under investigation from the average C_t value of the β -actin or 18S mRNA gene for each sample.

All the *in vivo* qPCR data were processed with GeneSpring GX 10.0, where they were subjected to statistical analyses to compare differences between treatments. *In vitro* qPCR data were statistically analyzed with the GraphPad Prism software. The values were expressed as mean \pm SD, and a $p\text{-value} \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

DNB 4-day repeat dose study

Phenotypic Effects

DNB was administrated orally to male Wistar rats at a daily dose of 0.1 to 8 mg/kg/day. This treatment did not affect plasma testosterone levels (Fig 1A), body weight or sexual accessory organ weights whatever the dose level; however, a significant decrease ($p\text{-value} \leq 0.05$) of approximately 17% in testis weight was recorded at the top dose (Table 2). Marked histopathological lesions in the testes were recorded at 4 and 8 mg/kg/day, which

indicated impaired spermatogenesis (Fig. 1B, Fig. 1C and Supplemental data Table S1). Germ cell damage was assessed by the appearance of marginated chromatin, the presence of germ cell degeneration/depletion (mainly spermatocytes apoptosis), or multinucleated giant spermatids. Sertoli cell vacuolation was also observed. The incidence and the severity of the lesions increased in a dose-related manner. At 8 mg/kg/day, the tubules were classified as being grossly disrupted due to severe cellular damages. As a consequence, the testis samples from rats exposed to the top dose were not considered for further analyses.

Global profiling changes and functional analysis

DNB-responsive gene expression in the rat across three doses (0.1, 1 and 4mg/kg/day) was profiled in testis using whole genome oligonucleotide microarrays. For the initial gene selection, we extracted probes on the array whose expression were significantly modulated due to treatment, based on the criteria of a 1.2-fold change relative to the control and a p -value ≤ 0.0005 (one-way ANOVA with multiple testing correction). A total of 4722 probe sets were identified as being differentially expressed only at 4mg/kg/day DNB. Functional analysis was then performed using the Ingenuity Pathways Analysis application (Ingenuity® System) to evaluate the biological relevance of these genes. Computational gene pathways analysis through statistical methods (Fisher test, threshold line $p < 0.05$, Fig. 2A) indicated that the two main major molecular and cellular functions associated with expression changes in the testicular tissue were related to cell cycle and cell death. When focusing on the principal altered function, cell cycle, we interestingly identified a high number of down-regulated genes involved in the “Mitotic Role of Polo-like Kinase” pathway (Fig. 2C). These cell cycle protein kinases play a critical role in mitotic entry and chromosome segregation, with inhibition of these proteins frequently resulting in mitotic arrest, and subsequently apoptosis.

More specifically, exposure to 4 mg/kg/day DNB modified expression of genes involved in distinct phases of the cell cycle regulation, based on microarray data (Fig. 2B). Indeed, when considering the various degrees of deregulation of genes encoding WEE1 (WEE1 homolog), PLK1 (polo-like kinase 1), CDC2 (cell division cycle 2), mitotic entry appeared to be reduced/prevented by DNB treatment. In addition, genes coding for proteins essential to centrosome separation and maturation were clearly modulated, as shown by decreased expression of *Cdc2a*, *Hsp90aa* (heat shock protein 90 kDa alpha) and *Plk1* due to

DNB treatment. Likewise, key regulators (eg *Cdc16*, *Cdc2*, *Plk1*, and *Cdc20*) of metaphase to anaphase transition and mitotic exit were also down-regulated by DNB.

Validation of the microarray data

qPCR analyses. The relevance of the microarray results was first confirmed for several deregulated genes using RT-qPCR. In total, there were 34 comparisons of array and RT-qPCR datapoints, and 29 of these comparisons were concordant (~85%) - i.e., similar direction of deregulation (Supplementary data, Table S2). Expression levels of three cell cycle-related genes with diverse degrees of deregulation are presented in Figure 3: *Cdc16*, *Cdc2a*, and *Plk*. At 0.1 and 1 mg/kg/day, there was no significant change in gene transcript levels recorded in any of the gene classes studied. At 4 mg/kg/day, alterations in some of the genes associated with cell cycle (Fig. 3 A, B and C) and cell death (Supplemental data Table 2) were verified. Doses at which modifications in gene expression started to be observed correlated well with those defined by the microarray data, and no dose-dependent expression pattern was observed. Conversely, the repeat administration of DNB did not significantly affect expression of genes associated with the steroidogenic pathways at any dose level, consistent with the hormonal analysis (Supplementary data, Table S2). Overall expression changes obtained with microarray were in good agreement with those measured by RT-qPCR, establishing the robustness of the microarray analyses. These data also confirmed that DNB treatment induced obvious changes on cell cycle and apoptosis, corroborating the histopathological observations at 4 mg/kg/day.

Immunohistochemical analyses. The rat testes were then analyzed by immunohistochemistry for the expression of apoptosis-related proteins, namely cleaved caspase-3 and cleaved caspase-6, to evaluate the distribution, concentration, eventual differences in treated and control animals, and finally to confirm molecular results. Intense and frequent signals for these two proteins were localized in testes of rats treated with 4 mg/kg/day (Fig. 3), whereas similar weak stains were observed for the two lowest doses when compared to controls (data not shown). The immunoreactivity was preferentially visualized in some of the cytoplasm and nuclei of spermatocytes for cleaved caspase-3 (Fig. 3D and E). A similar pattern of immunostaining was also observed with cleaved caspase-6 antibody (Fig. 3F and G). These data highlighted an apoptotic phenomenon arising from 4 mg/kg/day DNB, correlating well with our molecular results (microarray and qPCR).

DNB single oral dose study

The pathogenesis of the testicular lesions was further investigated by determining the early pharmacologic effects of DNB through a second study, where rats were sacrificed 8, 24, 48 and 72 hours after a single oral dose of 4 mg/kg/day DNB. Whatever the time point and the empirical toxicological parameters tested (gravimetry and histology), no significant changes were recorded (Supplementary data, Table S3). These results were corroborated by an absence of transcriptomic changes associated with cell cycle. Indeed, expression of transcripts related to cell cycle, and specifically to “Mitotic Role of Polo-like Kinase” pathway, although clearly modified after 4-days exposure to DNB, was not altered whatever the time point, following a single exposure (Supplementary data, Table S4).

Conversely, when analyzing plasma testosterone concentrations (Fig. 4A), we demonstrated that 4 mg/kg DNB exposure produced a decrease by more than 50%, 48 hours after a single dose (p -value ≤ 0.01). A trend toward reduced testosterone levels was already observed as early as 8 hours when compared to the respective controls. Finally, a compensatory increase in testosterone concentration was recorded (+55%, not statistically significant), 72 hours following single DNB exposure. These unexpected results, relating to a reduced testosterone level after DNB treatment, correlated with an overall down-regulation of genes involved in steroidogenesis (Fig. 4). For example, *Star* (steroidogenic acute regulatory protein) expression, the rate-limiting steroidogenic gene, was significantly repressed 48 hours after DNB administration (-31%, p -value ≤ 0.001 ; Fig. 4C) when compared to the corresponding controls. Similarly, *Cyp11a1* (cholesterol side-chain cleavage), *Cyp17a1* (17 α -hydroxylase-17,20-lyase) and *Hsd3b1* (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) transcripts were mainly down-accumulated (by up to ~25%) at 24 and 48 hours after a single exposure to DNB (Supplemental data Table 4). Finally, we examined the accumulation level of luteinizing hormone (LH) in pituitary tissue to support our steroidogenic changes. A decreasing tendency toward the expression of the LH gene was observed in the DNB-treated group starting at 8 hours after treatment, and its expression was significantly decreased at 24 hours when compared with that in the control group (-21%, p -value ≤ 0.05 ; Fig. 4B).

***In vitro* investigations: H295R steroidogenesis assay**

To further investigate the potential effect of DNB on steroid synthesis, we tested this compound in the H295R steroidogenesis assay. Exposure to 1-50 μ M DNB resulted in

significant changes in concentrations of progesterone, testosterone and estradiol (Fig. 5A). Specifically, treatment for 48 hours significantly decreased testosterone production whereas progesterone and estradiol increased dose-dependently. Maximal changes in hormone concentrations were observed at the greatest non-cytotoxic dose (50 μ M) tested. At this dose, DNB significantly stimulated progesterone and estradiol secretions from the H295R cells by about 1.25- and 1.35-fold respectively over their respective solvent controls (p -value ≤ 0.05 for both), while testosterone concentrations were 1.55-fold less than the control (p -value ≤ 0.001).

The expression of mRNA encoding enzymes involved in the production of steroid hormones indicated that DNB treatment decreased mRNA expression of all the studied enzymes needed for testosterone production in a dose-dependent pattern, namely *Star*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, and *HSD3B2*, when compared with cells exposed to the solvent (Fig. 5B). In particular, expression of the two cytochrome P450s was significantly down-regulated after 50 μ M exposure (p -value ≤ 0.05). In contrast, treatment with DNB caused an increase in mRNA expression of the enzyme essential to conversion of testosterone to estradiol, *CYP19A1*. This gene deregulation became more pronounced with increasing concentrations, up to 140% of control (Fig. 5B, p -value ≤ 0.05), but due to the relatively great variability of the results, induction was not statistically significant. As a result, we demonstrated that DNB affects steroid hormone secretion *in vitro* in H295R cells.

DISCUSSION

DNB is considered as initially damaging Sertoli cells, with germ cell degeneration and exfoliation occurring as a secondary event [541]. The cellular target of this toxicant is reflected by alterations in the morphological and functional characteristics of Sertoli cells that have been demonstrated both *in vivo*, after the administration of DNB [541, 622], and *in vitro*, after the exposure of cultured Sertoli cells to DNB [627, 628]. However, the molecular mechanisms responsible for these toxicological effects have not yet been elucidated. Thus, the purpose of this study was to characterize the pathogenesis of the testicular injuries produced by DNB, as well as to provide insight into its mode of action. To this aim, we investigated the dose response and the time course of the development of the lesions induced by this direct-acting male reproductive toxicant [541, 615, 618] using *in vivo* studies, which integrated

genomics-based endpoints and data derived from standard approaches. We also complemented our *in vivo* data with *in vitro* investigations.

Several preliminary dose range-finding studies were first conducted on this compound based on the literature, in order to define time and dose parameters essential for a good appreciation and characterization of the DNB-induced toxicity. Doses of 12 mg/kg/day and above were shown to be toxic to the male Wistar rat, with severe testicular histopathological lesions and deaths occurring following four days of treatment (data not shown). Consequently, the duration of the present dose response study was restricted to four days, and dose levels of 0.1-8 mg/kg/day DNB were chosen, so that testicular lesions would be observed for at least the top dose, thereby allowing the correlation of genomic changes with adverse effects. Under these conditions, we observed a dose-related increase in the incidence and severity of the testicular lesion starting from 4 mg/kg/day (Fig. 1B and C). In agreement with previous publications [541, 615, 638, 695], the testis was severely damaged, as evidenced by increased numbers of regressed seminiferous tubules that exhibited degenerating spermatocytes, chromatin margination in spermatids, giant cells and vacuolization of the Sertoli cells. This dose-related injury was not associated with changes in testosterone concentration (Fig. 1A). Dosing of males with 8 mg DNB/kg for four days also resulted in lowered testes weights (Table 2). Due to the severity of the lesion and the reduced cellularity at 8 mg/kg/day DNB, only the lower dose levels were further considered for further analyses.

Global transcriptomic analysis of rat testes revealed more than four thousand of genes differentially expressed but only following exposure to 4 mg/kg/day DNB. Based on Ingenuity Pathways Analysis (IPA), the most significant molecular and cellular functions affected after this treatment were related to cell cycle and cell death (Fig. 2A). This latter process has been intensively studied in testes following DNB treatment during the past two decades, establishing that (i) the major morphological changes included the degeneration or exfoliation of pachytene spermatocytes and round spermatids, presence of giant cells, retained spermatids, and reduced numbers of meiotic figures [615]; (ii) lesions were limited to stages VIII-XI of the spermatogenic cycle [543]; and that (iii) apoptotic cell death is induced by this, at least in part, via c-Jun N-terminal kinase signaling in TM4 mouse Sertoli cells [637]. Finally, Muguruma *et al.* (2005) reported that *in vivo* exposure to this toxicant resulted in a marked increase in the number of apoptotic pachytene spermatocytes in the seminiferous tubules in stages VII–VIII and IX–XI of the spermatogenic cycle, highlighted by cleaved Caspase-3 immunohistochemical staining. In addition, selected transcript profiling showed

that the expression of *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-xL*, and *Bcl-xs*, and *Caspase-6* was significantly up-regulated in the testes of DNB-treated rats, suggesting that the mitochondrial pathway is mainly involved in the testicular germ cell apoptosis [638]. Similarly, in the present dose-response study, we strengthened the over-expression of apoptosis-related genes by full-genome and qPCR analyses, including *Bcl2l1* and *Caspase-6* genes (Supplemental data Table 2), and confirmed these findings with immunohistochemical examinations (Fig. 3). Consequently, our molecular data are in accordance with earlier publications.

In the present dose response study, we identified for the first time, the cell cycle as a major molecular and cellular function affected following DNB exposure (Fig. 2B, and 3). Specifically, 4 mg/kg/day DNB modified expression of genes involved in the “Mitotic Role of Polo-like Kinase” pathway, encoding regulators essential for entry into, progression through, and exit from mitosis [696-699]. Based on microarray data, gene changes were observed in every step of the cell cycle progression (Fig. 2B). In particular, DNB treatment caused a down-regulation of the serine/threonine kinase Plk1, an important contributor to cell-cycle events [700]. Indeed, Plk1 has been suggested to promote mitotic entry by activating cyclin B1/Cdk1 in multiple ways: by phosphorylating cyclin B1 itself, the Cdk1-activating phosphatase Cdc25C, and the Cdk1-inhibiting kinases Myt1/Wee1. Furthermore, Plk1 has been implicated in centrosome maturation and separation, with defects giving rise to monopolar spindles. Proposed Plk targets regulating centrosome function are Hsp90, Asp, and Nlp. Additional studies indicated a role for Plk1 in activating the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), a multisubunit ubiquitin ligase essential for mitosis exit. APC/C is activated in a process initiated by the phosphorylation of its subunits (of which Cdc16), necessary for its interaction with the activatory protein Cdc20. Our molecular analyses revealed that DNB disturbed the gene expression of several of these Plk1 transducers (Fig. 2C and 3), including down-regulation of *cdc2a*, *Hsp90aa*, *cdc16* and *cdc20*, and up-regulation of *Wee1*. Moreover, recent results demonstrated that exposure of TM4 mouse Sertoli cells to this toxicant resulted in apoptosis accompanied by a G2/M phase cell cycle arrest, concurrent with a decrease in Cdc2 expression [637]. These findings strengthen our hypothesis that DNB treatment is associated with cell cycle impairment in the testes. To the best of our knowledge, this is the first global gene expression analysis that has explored DNB induced testicular toxicity.

A time course study was conducted to refine our understanding about DNB mechanism of action. We expected that combining standard and molecular measurements in an appropriately designed acute *in vivo* study would provide information related to the key

events that lead to testicular toxicity effects recorded after 4-days repeat exposure to DNB. Thus, rats were sacrificed at 8, 24, 48 and 72 hours after a single oral dose (4 mg/kg/day). Not surprisingly, androgen-dependent tissues and testis weights were not affected whatever the time point, as we did not record any gravimetric changes at 4 mg/kg/day in the repeat study (Supplemental data Table S3). Histopathological examination revealed no apparent lesion in the testis after a single exposure to DNB (data not shown), which was corroborated by an absence of cell cycle transcriptomic changes (Supplemental data Table S4).

We then analyzed plasma testosterone levels, and unexpectedly showed that its concentrations, as well as the accumulation levels of transcripts involved in steroidogenesis were modulated both after a single exposure to DNB (Fig. 4). Indeed, a biphasic alteration for testosterone plasma level was recorded (Fig. 4A), with a significant reduction at 48 hours compared to the corresponding controls, followed by a trend towards increase at 72 hours after dosing. These results are in agreement with two previous studies assessing testosterone changes in plasma or testis of male rats following a single high dose of DNB [620, 622]. In our acute study, we additionally investigated the expression of testicular key genes involved in the steroidogenic biological pathway to reinforce the hormone findings. Expression levels of these transcripts displayed an overall down-regulation at 24 and 48 hours (Fig. 4C and Supplemental data Table 4), supporting our hormone data. In particular, *Star*, which transports cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane, and is considered as rate-limiting steps in steroidogenesis [701, 702], was significantly affected in our single dose study (Fig. 4B). We also highlighted a significant down-regulation of LH gene expression at 24 hours in pituitary tissues, prior to that observed for *Star* (48 hours), therefore strengthening our hypothesis that DNB alters steroidogenesis, and suggests that this toxicant interferes with the hypothalamic-pituitary gonadal axis.

A combined *in vitro/in vivo* approach is a useful way to gain a complete understanding of the biological activities of the compound in question. The H295R steroidogenesis assay has recently been developed and validated for used in a tiered screening approach by the US EPA Endocrine Disruptor Screening Program [694]. Several studies have demonstrated the effectiveness of this system in identifying xenobiotics that affect steroidogenesis beginning with the sequence of reactions occurring after the gonadotropin hormones receptors (FSHR and LHR) up through to the production of progesterone, testosterone, and estradiol [133, 693]. As well as permitting the measurement of hormone production, another advantage of the assay is that it can be used to evaluate effects of chemicals on gene expression and the enzymatic activities of steroidogenic genes [135, 703]. In this context, we used the H295R

steroidogenesis assay to evaluate and determine the potential endocrine disrupting effects of DNB. Our results indicated that hormone and gene expression profiles were affected *in vitro* following DNB treatment. Indeed, DNB significantly induced estradiol and progesterone synthesis, and strongly inhibited testosterone production (up to ~1.5-fold) by H295R cells (Fig. 5A). These dose-dependent alterations in hormone concentrations were supported by steroidogenesis transcriptomic changes (Fig. 5B), demonstrating the endocrine disrupting potential of DNB.

In conclusion, analyses from the dose-response study first revealed that the major biological processes affected following exposure to DNB (4 mg/kg/day), were related to cell cycle and cell death. In a second acute study, we surprisingly established that DNB interferes with steroid hormone biosynthesis, based on hormone and transcript expression level evaluations. This latter aspect was further investigated *in vitro*, through the H295R steroidogenesis assay. Overall our results indicated that although DNB is considered as a direct-acting testicular toxicant, this compound also affects steroid biosynthesis *in vivo* and *in vitro* implying that there are endocrine-mediated effects which could precede the adverse testicular lesions. To fully explain these effects, additional investigations on the mechanism of action of DNB are needed, such as full-genome analysis of testicular samples from the acute study. Moreover, we are currently evaluating DNB *in vivo* effects on primary Leydig cells from immature rat testes to clarify the mechanism of action resulting in endocrine changes after exposure to DNB. Preliminary results indicated that treatment of these primary cells with DNB also results in a modulation of testosterone secretion.

FUNDING INFORMATION

SL was a recipient of a fellowship from Bayer SAS and the French “Association Nationale de la Recherche et de la Technologie” (ANRT). The work was supported by the European Chemical Industry Council Endocrine Modulators Study Group (CEFIC EMSG).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Sophie Colombel, Bénédicte Labory, Stéphanie Bocart and Daisy Cespedes for help and useful advice; Valérie Pozzoli-Cipolla for technical expertise in *in vivo* testosterone measurements; Edouard Reyez-Gomez and Emmanuelle Balme for pathology expertise, Maud Antoine-Grégoire for EIA analysis, and Olivier Blanck for comments on the manuscript.

FIGURES AND LEGENDS

TABLE 2. Dinitrobenzene dose-related effects on mean terminal body weight, liver, sex organs, and accessory tissue weights. Data are presented as the mean \pm SD (*: p -value \leq 0.05; statistical analysis were performed according to *Kennel et al*, 2004). The organ weight for both the testes and the epididymides represents the mean of the left and right weights.

	1,3-Dinitrobenzene				
	Control	0.1 mg/kg/d	1 mg/kg/d	4 mg/kg/d	8 mg/kg/d
Body weight (g)					
Initial	409 \pm 15	409 \pm 16	410 \pm 15	411 \pm 17	401 \pm 19
Terminal	422 \pm 20	419 \pm 19	423 \pm 19	420 \pm 17	407 \pm 24
Absolute organ weight (g)					
Liver	14.65 \pm 1.25	14.81 \pm 1.66	15.19 \pm 1.65	15.21 \pm 1.52	14.37 \pm 1.47
Testis	1.84 \pm 0.53	1.80 \pm 0.14	1.73 \pm 0.15	1.74 \pm 0.28	1.54 \pm 0.27*
Epididymis	0.56 \pm 0.06	0.56 \pm 0.06	0.53 \pm 0.05	0.53 \pm 0.06	0.52 \pm 0.05
Prostate	0.55 \pm 0.12	0.48 \pm 0.10	0.47 \pm 0.09	0.46 \pm 0.10	0.49 \pm 0.09
Seminal Vesicle	1.7 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3	1.4 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3
Adrenal glands	0.0573 \pm 0.0088	0.0562 \pm 0.0090	0.0581 \pm 0.0108	0.0574 \pm 0.0101	0.0530 \pm 0.0113
Pituitary glands	0.0100 \pm 0.0019	0.0094 \pm 0.0018	0.0107 \pm 0.0027	0.0097 \pm 0.0014	0.0105 \pm 0.0033

* p <0.05.

FIG. 1. Standard Toxicological Measurements. (A) Effect of DNB on plasma levels of testosterone in adult male rats. Data are presented as mean hormone level (ng/mL) \pm SD. (B and C) Histopathological sections of adult rat testis. Sections were stained with hematoxylin-eosin for analysis. (B) Control testis. (C) Testis section from rat exposed to 8 mg/kg/day DNB. Seminiferous tubules show germ cell degeneration associated with the presence of numerous multinucleated giant cells, either in spermatocytes or in spermatids. Vacuolar degeneration is also observed in Sertoli cells. Histopathological lesions were observed from 4 mg/kg/day DNB, and increased in incidence and severity with the dose. The shaded area represents the range of the control data.

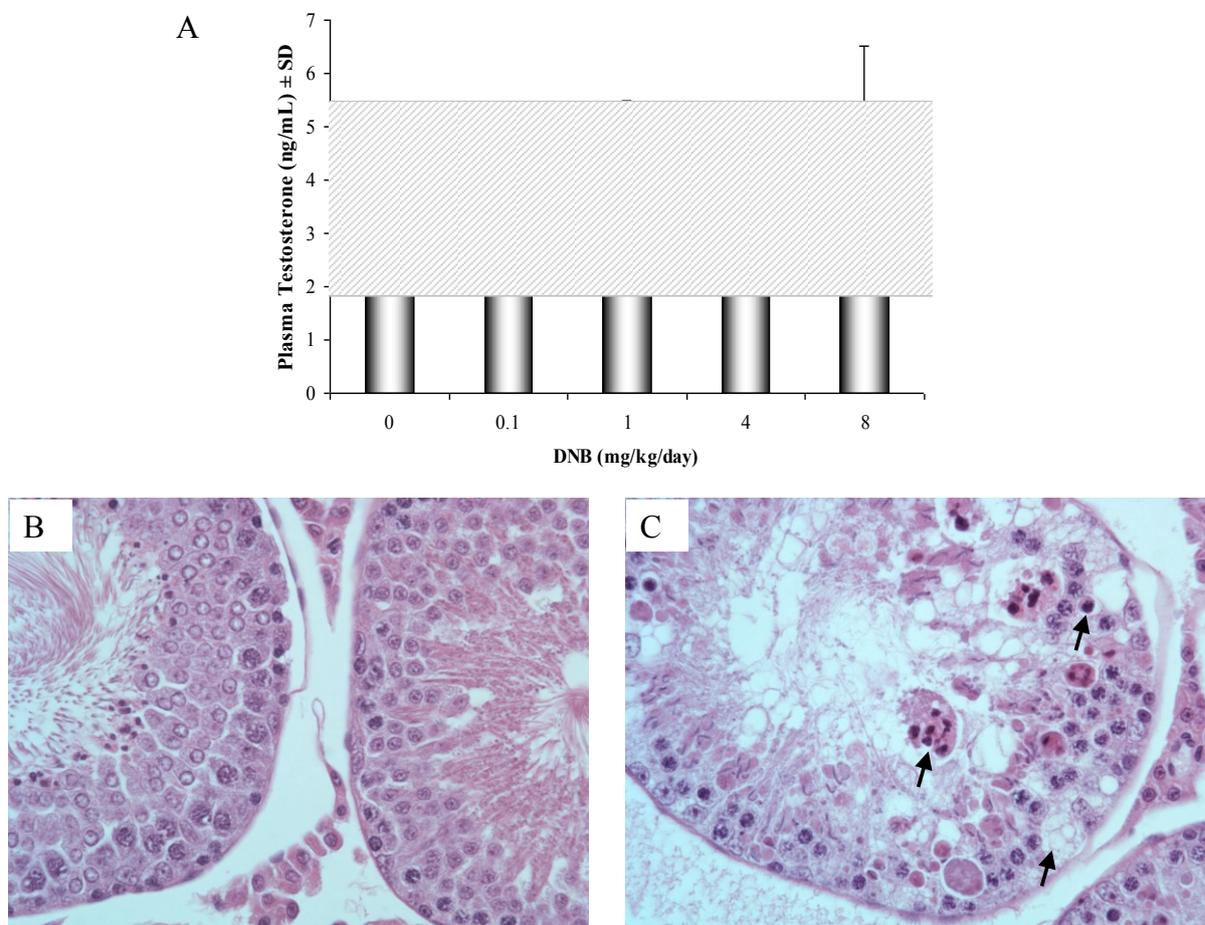


FIG. 2. Microarray analysis of dinitrobenzene dose-related changes in gene expression : absence of dose-dependent pattern and noteworthy deregulation in expression of genes related to cell death and especially cell cycle, at 4 mg/kg/day.

(A) Molecular and cellular functions identified by IPA associated with 4 mg/kg/day DNB-responsive genes. Number of genes and range of *p*-values associated with each process are presented. The range of *p*-values (calculated by Fisher’s test) indicates higher level functions that contained multiple lower level functions.

(B) Expression pattern of 4 mg/kg/day DNB-responsive genes related to cell cycle. Schematic representation of “Mitotic Role of Polo-like Kinase”, one of the top 5 pathway altered after DNB repeat exposure, where red and green labels indicate up- and down-regulated genes, respectively. The various shapes of nodes denote the different functions. A duplicated shape means this node contains multiple components. An arrow denotes the pathway direction. A line with a small circle denotes a biological result.

A

Molecular and Cellular Functions (4 mg/kg/day)	<i>p</i>- value	Genes
Cell Cycle	2.42E-17 - 1.33E-02	309
Cell Death	7.63E-09 - 1.27E-02	513
DNA Replication, Recombination, and Repair	2.28E-07 - 1.23E-02	189
Post-Translational Modification	3.99E-07 - 1.13E-02	246
Cellular Development	4.44E-05 - 1.28E-02	191

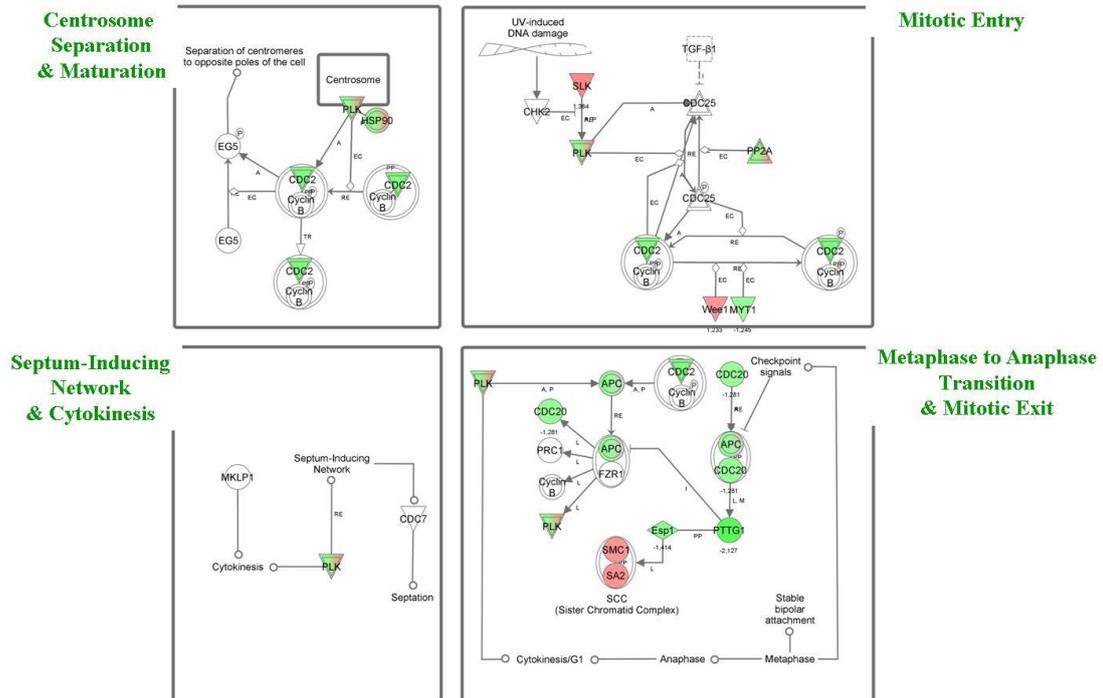
B

FIG. 3. Microarray analyses confirmation. (A, B and C) Real-time RT-qPCR analyses of selected genes altered in microarray analyses after 4-day repeat exposure to dinitrobenzene. Gene expression values were normalized to β -actin. Fold-change data are presented as individual animal data (symbols) and normalized to one control animal, *** p -value<0.001 (one-way ANOVA). The dotted line represents the fold-change for each gene as determined by microarray analyses (8-10 animals/group). (D, E, F and G,) Immunohistochemical analyses of seminiferous tubules for antibodies to cleaved Caspase-3 (D and E) and cleaved Caspase-6 (F and G), from control (D and F) and 4 mg/kg/day DNB-treated testis (E and G). After exposure to DNB, the proportion of cells positive for cleaved Caspase-3 and -6 increased : they are rare in the control (D and F), but several positive germinal cells are observed in the seminiferous tubule of treated rats. Most of the positive cells are spermatocytes (E and G).

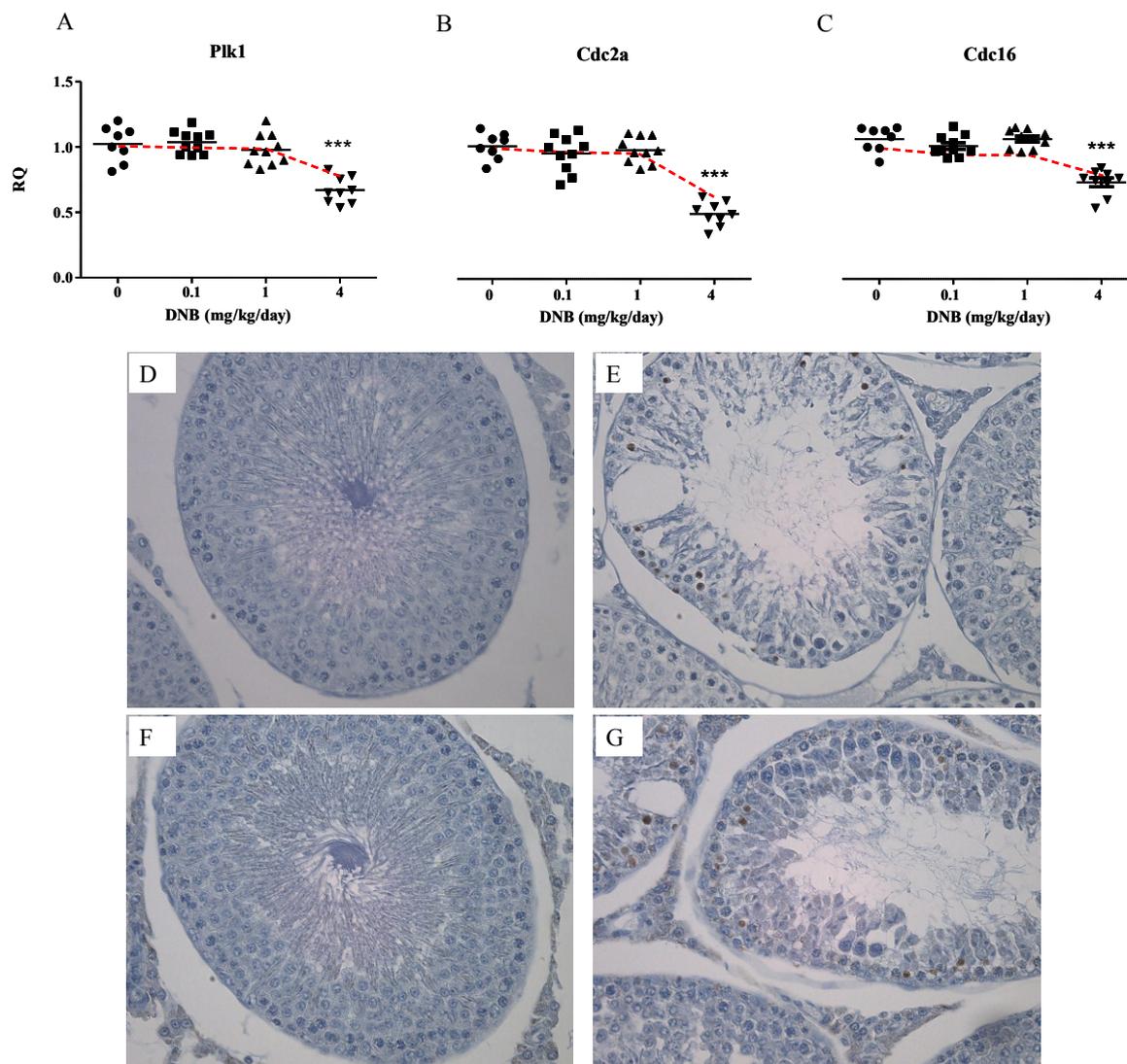


FIG. 4. Dinitrobenzene single oral dose study : evidence of its interference with the endocrine system. (A) Effect of a single exposure to DNB on plasma levels of testosterone in adult male rats; a biphasic profile for testosterone plasma level was recorded. For each time point, histograms represented mean hormone level (ng/mL) \pm SD (** p -value \leq 0.01) for control and treated group, based on 10 animals/group; data are also presented as a ratio (%) of mean hormone level of treated to the appropriate control group. (B and C) The expression level of LH (B) and Star (C) transcripts was evaluated by RT-qPCR analysis in control and treated samples after a single exposure to DNB. Gene expression values were normalized to β -actin. Fold-change data are presented as individual animal data (symbols) and normalized to one control animal, * p -value $<$ 0.05, *** p -value $<$ 0.001 (one-way ANOVA). Ratios (%) of mean gene expression of treated to the appropriate E control group are also presented.

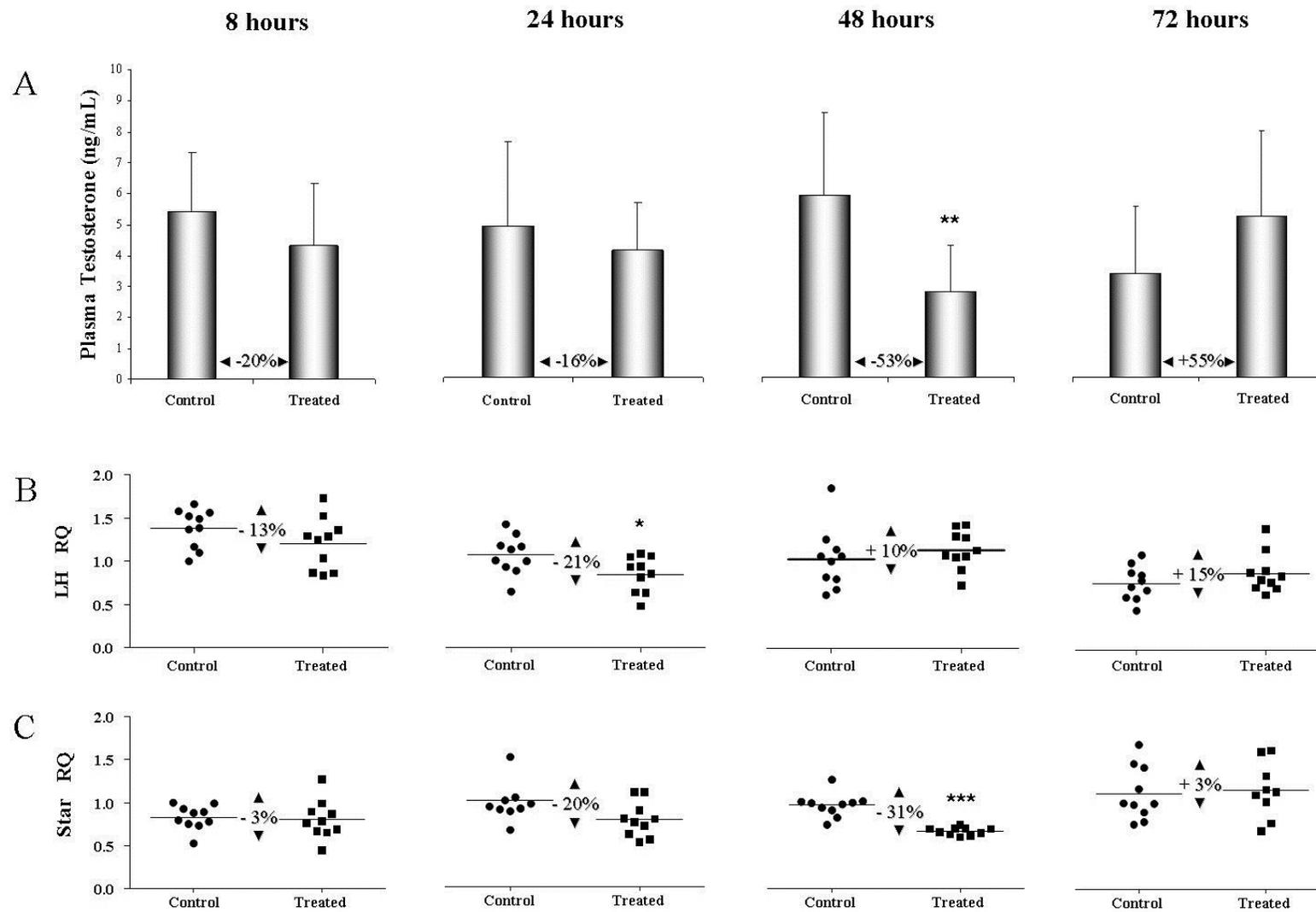
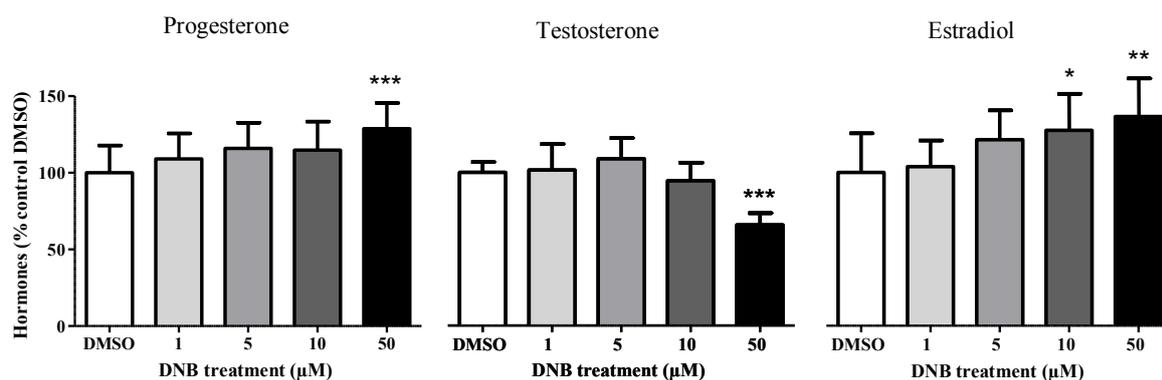
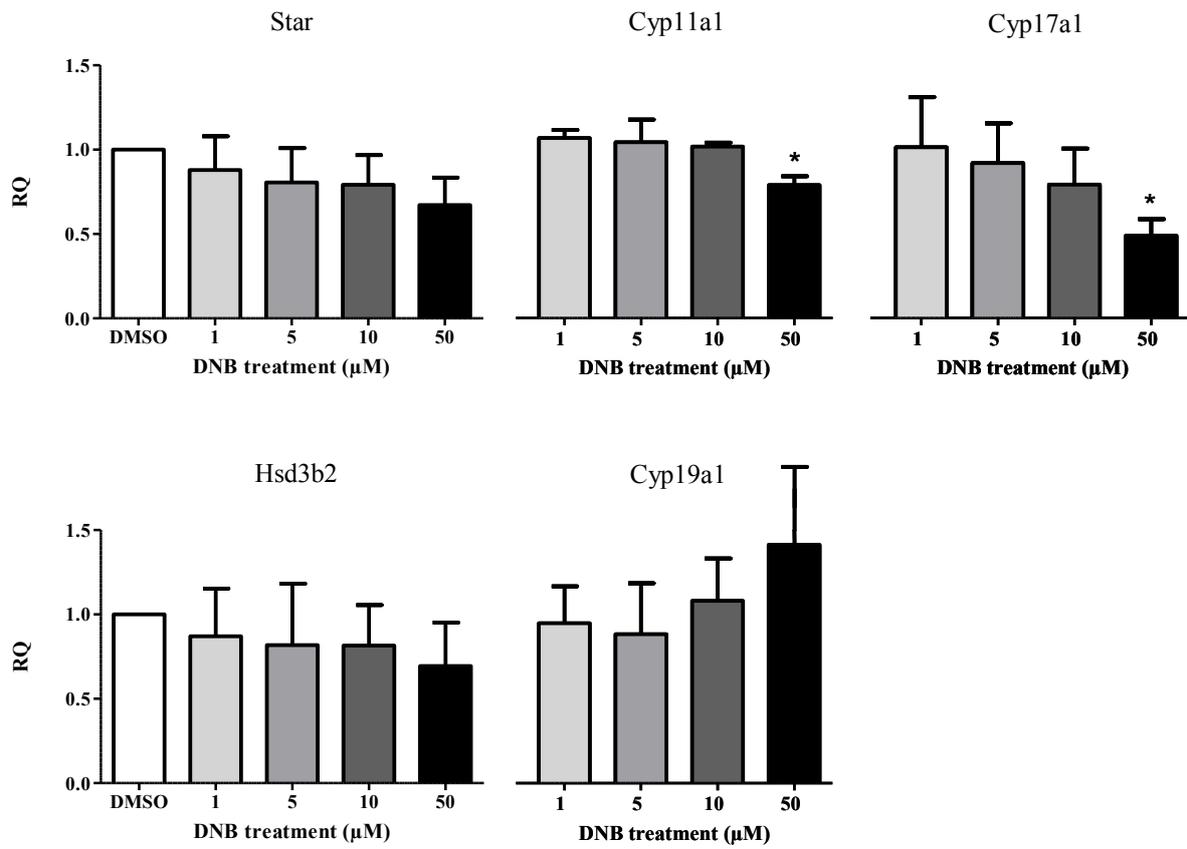


FIG. 5. *In vitro* endocrine disrupting potential of dinitrobenzene in the H295R steroidogenesis assay. (A) Effects of DNB on testosterone, progesterone and estradiol production in human adrenocortical carcinoma cells (H295R) after a 48-hour treatment. The results (steroid concentration in the supplemented medium, mean from three independent experiments) are expressed as relative changes (%) \pm SD compared to the appropriate solvent control; one-way ANOVA, ** p -value \leq 0.01. (B) Effects of DNB on expression of steroidogenic enzyme genes in H295R cells in culture after a 48-hours treatment. Expression of steroidogenic genes was normalized to the expression of 18S ribosomal RNA. Fold induction represents the increase/decrease in expression compared to the relevant solvent control. Values presented are the means \pm SD (one-way ANOVA, ** p -value \leq 0.01) of three determinations on each of three replicate exposures.

A



B



Données supplémentaires : Stéroïdogénèse et 1,3-Dinitrobenzène

Quelques précisions concernant le mécanisme d'action du DNB :

études sur cellules primaires de Leydig

Le mécanisme d'action à l'origine de la toxicité testiculaire induite par le DNB n'est à l'heure actuelle pas encore bien élucidé. Les données de notre précédente publication (cf. *Article 2*) suggèrent que cette substance est capable d'influencer l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique, et de moduler la sécrétion de testostérone chez le rat mâle suite à une administration unique. Afin d'expliquer un tel phénomène, l'une des premières étapes consiste à évaluer l'effet direct d'un traitement au DNB sur les cellules de Leydig, principal site de production des hormones stéroïdes.

Pour ce faire, des cellules de Leydig de rats ont été isolées, cultivées, puis exposées à 0.0001-10 μ M de DNB. Ces cellules et leurs surnageants ont été récoltés 24 heures après traitement, dans le but d'établir leur profil stéroïdogénique. Les résultats indiquent que la production en testostérone est significativement augmentée en réponse à ce composé, quelle que soit la concentration, en comparaison au contrôle DMSO (Figure 56 A). Une légère tendance à un "effet-dose" est observée, pour finalement atteindre une induction de la sécrétion en testostérone de l'ordre de +50% (p -value ≤ 0.001) aux deux concentrations les plus fortes.

Nous avons souhaité corrélérer ces données hormonales avec des données moléculaires, explorant ainsi l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes (Figure 56 B). Les analyses par PCR quantitative révèlent que seuls les niveaux d'accumulation des transcrits *Star* et *Hsd3b1* sont altérés suite à l'exposition au DNB. En effet, ce premier codant une protéine qui transfère le cholestérol dans les mitochondries, étape limitante de la stéroïdogénèse, voit son niveau significativement induit à partir de 1 μ M (+150% par rapport au contrôle DMSO ; p -value ≤ 0.01). De même, le niveau d'accumulation du transcrit *Hsd3b1*, codant l'enzyme capable de convertir la prégnénolone en progestérone, est augmenté en réponse au DNB uniquement à la forte dose (+ ~130% ; p -value ≤ 0.01).

En conséquence, ces données préliminaires indiquent qu'une exposition des cellules primaires de Leydig au composé nitré entraîne une altération de leur profil stéroïdogénique, tel qu'illustré par la stimulation de la synthèse en testostérone. Une baisse du niveau de testostérone plasmatique a été rapporté lors de l'étude aigüe *in vivo*, cette divergence dans les résultats sera discutée ultérieurement (p.236). Néanmoins, sur la base de cet essai, il

semblerait que le DNB soit capable d'interférer directement avec la production de testostérone.

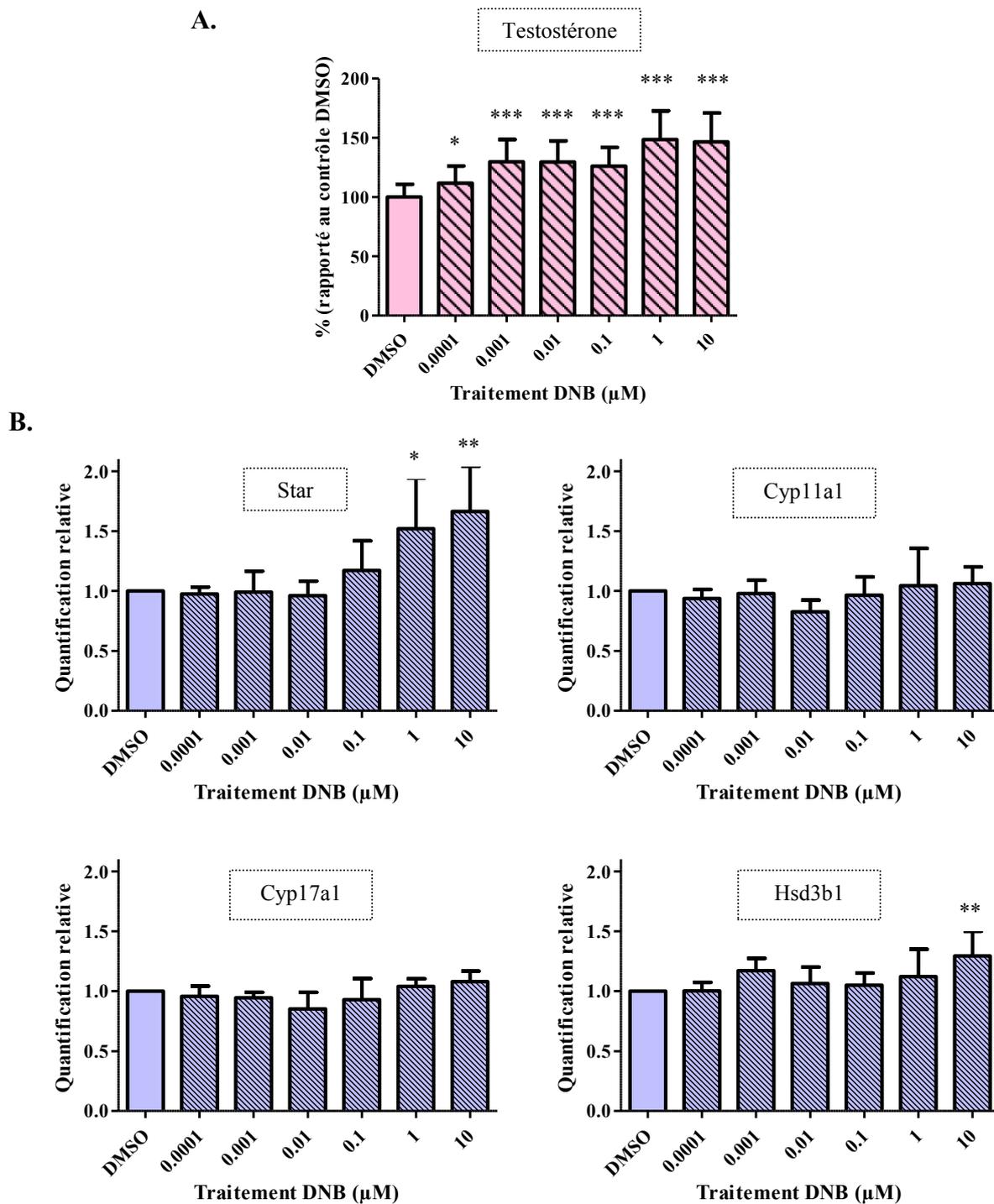


Figure 56 : Stimulation des cellules de Leydig primaires au DNB pendant 24 heures
 (A) Conséquence d'une exposition au DNB sur la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig. Les résultats (concentrations, n = 3) sont exprimés en pourcentages \pm SD, rapportés au contrôle DMSO ; one-way ANOVA, * p -value \leq 0.05, *** p -value \leq 0.001. (B) Effet du DNB sur le niveau d'accumulation des transcrits *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1* et *Hsd3b1* dans les cellules de Leydig. Les valeurs présentées sont les moyennes des ratios traité/contrôle DMSO \pm SD, normalisés à la β -actine (n=3 ; one-way ANOVA, * p -value \leq 0.05, ** p -value \leq 0.01, *** p -value \leq 0.001).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les humains sont exposés à plusieurs types de contaminants environnementaux qui peuvent exercer des effets nocifs sur les systèmes reproducteurs mâle et femelle, et parmi ceux-ci figurent les perturbateurs endocriniens (PE). La complexité du système endocrinien et reproducteur, associée à une connaissance insuffisante de la régulation endocrine dans un organisme sain, suggère qu'il est difficile de comprendre et d'évaluer les troubles induits par ces composés, au sein de ces processus biologiques. Par ailleurs, les mécanismes d'action diffèrent considérablement d'un PE à un autre ; qui plus est, un même PE peut également interagir avec diverses fonctions biologiques. Enfin, quelques études conduites avec le bisphénol A proposent également que ces composés ne suivent pas le vieux principe édicté depuis le 16^{ème} siècle, selon lequel c'est "la dose [qui] fait le poison" [121]. Par conséquent, il apparaît nécessaire d'acquérir de nouvelles connaissances dans le domaine des PE.

Dans ce contexte, un programme de recherche a été initié par le CEFIC, dans lequel s'inscrit ma thèse. Celui-ci vise à apprécier la mise en place de la toxicité testiculaire chez le rat adulte induite par des composés aux mécanismes d'action variés, dont un anti-androgène (flutamide) *versus* un toxique testiculaire à "action directe" (DNB). Le type de données collectées comprenait des variations hormonales et gravimétriques, l'évaluation des lésions histopathologiques, et l'identification de changements d'expression génique. Au final, des profils complets de toxicité testiculaire chez le rat, fonction de la dose et/ou du temps, ont pu être dressés pour chacun des deux composés, et leur spécificité comportementale appréciée.

Au vu des résultats établis lors de ce travail de thèse, cette discussion s'articule autour de cinq points. La première partie expose les éléments novateurs, révélés par les études "effet-dose", relatifs aux mécanismes d'action propres à chaque composé. La seconde partie évalue l'apport d'outils moléculaires au sein d'études conventionnelles de toxicologie, via l'identification et la comparaison des doses sans effet moléculaire et phénotypique, sur la base des études subaiguës. La troisième partie discute du caractère potentiel de PE du DNB suggéré lors de l'étude aiguë et d'approches *in vitro*. Les profils de toxicité testiculaire ont été dressés pour chaque composé au sein de la quatrième partie, afin de définir s'il est possible de

mettre en évidence des caractéristiques particulières dans le mode d'action toxique testiculaire d'un PE par rapport à une molécule exerçant également une toxicité testiculaire, mais considérée comme non PE. Pour finir, un dernier paragraphe vient conclure ce travail, amenant de nouvelles perspectives.

1. Etudes "effet dose", mécanismes d'action et éléments novateurs

Dans le but d'établir les profils de toxicité testiculaire relevant d'une exposition au flutamide ou au DNB, la première approche a consisté à réaliser des études distinctes de toxicologie à administrations répétées. Ces études ont permis d'apprécier les changements moléculaires associés aux effets toxiques, et ainsi de préciser dans une certaine mesure, les mécanismes d'action par lesquels ces composés de référence induisent des effets délétères sur l'appareil reproducteur mâle.

A. Flutamide : confirmation moléculaire de son anti-androgénicité et mise en évidence de l'altération du catabolisme des acides gras

L'étude subaiguë de 28 jours nous a tout d'abord permis de réaffirmer par des analyses conventionnelles de toxicologie, l'activité anti-androgénique du flutamide sur l'appareil reproducteur mâle : diminution significative du poids d'organes et de tissus sexuels accessoires androgéno-dépendants, hyperplasie des cellules de Leydig, et augmentation du niveau de testostérone plasmatique. En accord avec de précédentes études et publications, nos résultats ont ensuite été approfondis au travers d'approches transcriptomiques. Ces analyses ont révélé une altération dose-dépendante de l'accumulation de transcrits testiculaires impliqués dans le métabolisme des acides gras et dans la voie de biosynthèse des stéroïdes, confirmant également le caractère anti-androgénique du flutamide :

Sur la base de nos données moléculaires, le flutamide s'avère capable d'affecter l'expression de certaines enzymes stéroïdogéniques au niveau du testicule. En effet, l'expression des enzymes CYP17A1 et HSD3B1 est décrite dans la littérature comme étant régulée négativement par la testostérone [704, 705]. Or, l'augmentation du niveau d'accumulation de tels transcrits dans notre étude, en présence d'une concentration importante

de testostérone plasmatique, atteste de la capacité du flutamide à antagoniser la liaison de la testostérone à son récepteur. Il empêche ainsi la liaison du récepteur aux androgènes (AR) à l'ADN, et l'inhibition de la transcription de ces gènes androgéno-dépendants. De plus, le fait d'observer la modulation positive de tels gènes connus pour être régulés par la LH [706], confirme l'action antagoniste du flutamide sur les AR présents au niveau de la structure hypophyse/hypothalamus, bloquant le rétrocontrôle négatif exercé par la testostérone [517], et stimulant en conséquence la sécrétion de cette gonadotrophine par l'hypophyse. L'augmentation de la LH (constatée lors d'une précédente étude subaigüe [640]) induirait alors à son tour l'activation de l'expression des gènes stéroïdogéniques au niveau du testicule, et donc la synthèse de la testostérone. Ces données moléculaires démontrent donc l'effet anti-androgénique du flutamide sur l'axe cérébro-testiculaire, et son implication dans l'induction de la sécrétion de la testostérone par les cellules de Leydig.

De telles productions de testostérone nécessitent la mise à disposition d'importantes quantités de matières premières. La synthèse *de novo* du cholestérol, précurseur de la testostérone, a lieu dans le cytosol initiée à partir de l'acétyl-CoA. Celui-ci provient entre autres, de l'oxydation intra-mitochondriale des acides gras [707, 708]. Cette voie de dégradation s'inscrit dans un processus biologique plus large, le catabolisme des acides gras. Nos analyses transcriptomiques ont établi que le traitement au flutamide entraîne une expression différentielle positive de nombreux gènes impliqués dans chacune des quatre étapes du catabolisme, favorisant ainsi l'apport en acétyl-CoA : (i) *Le clivage des acides gras du glycérol* : première étape régulée par les lipases, il permet un traitement ultérieur des acides gras dans la cellule ; (ii) *L'activation des acides gras* : ayant lieu dans le cytosol, elle consiste en la transformation des acides gras en acyl-CoA par les acyl-CoA synthétases ; (iii) *Le transport des acyl-CoA dans la mitochondrie* : les acides gras à courte chaîne pénètrent directement dans la mitochondrie, alors que les acides gras à longue chaîne entrent dans la mitochondrie éventuellement par VDAC1 (*Voltage-dependent anion-selective channel protein 1*) [709], et/ou par l'intervention du système carnitine palmitoyl transférase (*Cpt*) ; (iv) *La β -oxydation* : l'oxydation mitochondriale des acides gras se fait au niveau de leur carbone β . C'est un cycle de quatre réactions qui raccourcit l'acyl-CoA de deux carbones, et libère un acétyl-CoA. Il se répète un certain nombre de fois, selon le nombre de paires de carbones de l'acide gras. Dans le cas d'un acide gras à nombre impair de carbones, le résidu final possédant trois carbones, le propionyl-CoA, est transformé en succinyl-CoA qui est un intermédiaire du cycle de Krebs. La voie de la β -oxydation a également lieu au niveau des peroxysomes pour

les acides gras à très longue chaîne. Il est essentiel de mentionner que le flutamide régule notamment les étapes limitantes de la β -oxydation au sein des peroxysomes (Acox1 [710]), et des mitochondries (CptI [711] et Acad [710]). Enfin, certaines des protéines codées par ces transcrits sont abondamment exprimées dans les cellules de Leydig [712], siège de la stéroïdogénèse. Puisque ces enzymes dont les transcrits sont sur-accumulés en réponse au flutamide, permettent la production d'énergie et de précurseurs nécessaires à la synthèse des stéroïdes, elles participent probablement de façon indirecte à la biosynthèse de la testostérone, fortement stimulée après traitement à l'anti-androgène.

La mise en place conjointe d'une analyse transcriptomique dans des études conventionnelles de toxicologie semble donc être une bonne stratégie, permettant de collecter de nombreuses informations complémentaires. Antérieurement, une étude aigüe avait également été menée au sein du laboratoire avec le flutamide, afin de se focaliser sur ses effets pharmacodynamiques, utilisant ces mêmes outils d'analyses. Les rats mâles avaient été traités avec 150 mg/kg de flutamide, et sacrifiés à différents temps (8-48 heures) après cette administration unique. Le profil du niveau de la testostérone plasmatique, ainsi que le profil d'expression des gènes androgéno-dépendants ou impliqués dans la stéroïdogénèse, laissaient penser que le flutamide posséderait une double activité agoniste/anti-androgénique, fonction de sa concentration plasmatique (cf. *Annexe*). Le flutamide induirait à 24 heures par un mécanisme de rétrocontrôle, une sous-accumulation des transcrits impliqués dans la synthèse de la testostérone, puis du fait de la restauration de son effet antagoniste à 48 heures, il provoquerait l'activation de ces transcrits, stimulant la synthèse de la testostérone.

☞ Enfin, nous avons l'intention de réaliser une étude à administrations répétées et en cinétique, qui compléterait la caractérisation globale du profil de toxicité testiculaire induit par le flutamide. Elle amènerait également des éléments de réponse supplémentaires et nécessaires à une meilleure compréhension du mécanisme d'action de cet anti-androgène, au niveau de l'appareil reproducteur chez le rat mâle adulte.

B. miARN : éléments de compréhension supplémentaires concernant le mécanisme d'action du flutamide

Plusieurs familles de miARN impliquées dans divers processus cellulaires, en particulier l'apoptose et la prolifération cellulaire, ont récemment été identifiées. Ceci nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle l'hyperplasie des cellules de Leydig observée après une exposition répétée au flutamide pendant 28 jours, pourrait en partie résulter de modifications du profil d'expression de ces miARN. En conséquence, nous avons évalué l'expression de ces petits ARN simple brin au sein de l'étude susmentionnée à l'aide de biopuces. L'analyse conjointe de données moléculaires (puces miARN/ADN) et *in silico*, combinée aux recherches bibliographiques suggère que les fonctions régulées par les miARN différenciellement exprimés après traitement au flutamide forte dose soient principalement associées au métabolisme des carbohydrates et des lipides, ainsi qu'à la croissance et la prolifération cellulaire. Ces résultats sont cohérents avec de précédentes investigations transcriptomiques [641] et protéomiques [640]. ☞ Ils nécessitent tout de même de s'y attarder plus longuement, en examinant par exemple l'expression des cibles des miARN au niveau protéique, ou la pertinence d'une dérégulation de certains miARN (ex. miR-210) vis-à-vis de la mise en place de la lésion.

Les recherches corrélant les miARN à la toxicité testiculaire ne sont encore qu'à leurs débuts ; trop peu d'études ont été publiées à ce sujet, et ne permettent donc pas d'interpréter convenablement nos résultats. Quelques éléments de réponse ont pu être apportés proposant l'implication de ces ARN simple brin dans la survenue des altérations phénotypiques induites par le flutamide (cf. prolifération cellulaire et métabolisme des acides gras). Mais, nos données sont également la porte ouverte à de nouvelles questions et investigations concernant ces nouveaux acteurs de la toxicité testiculaire : *Quels sont-ils ? Comment les caractériser ? Que régulent-ils, quelles sont leurs cibles ?...*

C. 1,3-dinitrobenzène : confirmation moléculaire de sa toxicité testiculaire et mise en évidence de perturbations du cycle cellulaire

Le DNB est une substance toxique puissante chez les animaux de laboratoire, ainsi que chez l'Homme [541, 617]. D'après des études réalisées chez le rongeur, il semble que les

cellules de Sertoli soient les cibles premières de la toxicité de ce composé au niveau testiculaire, la dégénérescence des cellules germinales voisines constituant un évènement secondaire [541]. Son mode d'action devrait donc être différent de celui d'un PE, mais reste encore inconnu. Nous avons de ce fait entrepris de caractériser la toxicité testiculaire résultant d'une exposition au DNB chez le rat mâle adulte, à l'aide des outils traditionnels de la toxicologie et des outils "-omiques".

Une étude DNB *in vivo* "effet-dose" a été menée, selon des exigences similaires à celles de l'étude flutamide précédemment décrite. Celle-ci nous a tout d'abord permis de confirmer le potentiel toxique et la spécificité testiculaire du composé nitré. En effet, les glandes accessoires ne montrent aucune variation gravimétrique, macroscopique ou microscopique. Bien qu'il puisse être argumenté que la courte durée de l'expérience n'était pas suffisante pour que de telles altérations apparaissent, d'autres investigations portant sur les effets du DNB chez le rat sur des temps plus longs, ne mentionnent pas plus de lésions de ces organes (ex. [618]). Dans notre étude, seuls les testicules présentent une baisse légère mais significative de leur masse, associée à de sévères lésions microscopiques. La concentration en testostérone plasmatique n'apparaît pas affectée en dépit de l'atteinte testiculaire marquée.

En accord avec de précédentes publications, nos résultats ont ensuite été approfondis au travers d'analyses transcriptomiques effectuées à partir des testicules de ces rats. Nous avons établi que le DNB est capable de moduler l'expression de milliers de gènes participant à des processus biologiques variés, dont nombreux sont ceux impliqués dans la mort et le cycle cellulaire.

L'apoptose des cellules germinales observée après exposition à ce composé a largement été décrite dans la littérature, d'un point de vue histologique (cf. chapitre III, *Modèle d'étude : toxique à "action directe", le 1,3-Dinitrobenzène*). A l'aide d'outils moléculaires, nous avons renforcé les données préexistantes, démontrant au travers de ce travail, l'altération de l'expression de multiples gènes associés au processus de mort cellulaire (ex. *Caspase-6*, *Bcl2l1*, *cFlar*, *Ciapi1*...). L'immunohistochimie est également venue corroborer nos résultats (marquages des caspases -3 et -6 activées). Le mécanisme conduisant à l'apoptose n'est pas clairement élucidé, mais nos données combinées à celles d'études précédentes (sur-accumulation des transcrits *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-xL*, et *Bcl-xs* dans les testicules de rats traités au DNB [638]) semblent indiquer que l'exposition au DNB entraîne

principalement une activation de la voie mitochondriale. Enfin, des souris mutantes présentant une inactivation des gènes *Fas* et *Fas-ligand* montrent les mêmes lésions testiculaires d'apoptose que les souris sauvages après un traitement au nitrobenzène : ceci suggère que la voie Fas, autre voie de l'apoptose, n'est pas mise en jeu [713].

Par ailleurs, nos rapports d'analyses moléculaires ont indiqué que l'une des principales voies biologiques dérégulées après administrations répétées de DNB, était associée aux Polo-like kinases (*Plk*). Les données bibliographiques ont révélé que ces protéines interviennent lors du contrôle de l'intégrité de l'ADN, et sont des régulateurs essentiels à l'entrée, la progression et la sortie de mitose [696-698]. Chez les mammifères, la famille Plk compte quatre membres : (i) la Plk1, la plus étudiée des Plk, détaillée ci-dessous ; (ii) la Plk2, initialement décrite comme un régulateur de la phase G1 du cycle cellulaire [714], également impliquée dans la réponse au stress et cible transcriptionnelle de p53 [715, 716] ; (iii) la Plk3, impliquée dans la réponse des cellules à des stress génotoxiques [717] ; et (iv) la Plk4, probablement impliquée dans la prolifération cellulaire [718].

Les fonctions mitotiques dans lesquelles est impliquée Plk1 sont brièvement mentionnées ci-après. (i) *Entrée en mitose* : Plk1 participe à l'activation du MPF (*Mitosis Promoting Factor*) en phosphorylant et activant la phosphatase activatrice du MPF, CDC25C. De plus, elle phosphoryle et entraîne la dégradation de Wee1 et Myt1, les kinases inhibitrices du MPF [719] ; (ii) *Mise en place du fuseau mitotique* : Plk1 est responsable de la maturation du centrosome en G2/M [700] ; (iii) *Régulation de la cohésion des chromatides sœurs et de la fonction des kinétochores* : Plk1 promouvoit le clivage de la cohésine par la séparase, clivage nécessaire à la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase [720] ; (iv) *Sortie de mitose* : elle se réalise grâce à la dégradation protéasome-dépendante de la cycline mitotique par l'anaphase promoting complex (APC/C), une fois celui-ci activé par la Plk1 ; (v) *Cytokinèse* : l'implication des Plks dans le processus de cytokinèse a été montrée pour la première fois chez *S. Pombe* [721]. Le traitement au DNB induit une répression générale du niveau d'accumulation des transcrits impliqués à ces différents stades de la mitose, dont Plk1. Ces résultats préliminaires suggèrent un arrêt du cycle cellulaire conséquent à l'exposition au composé nitré, et sont confortés par de récentes investigations. En effet, il a été démontré *in vitro* que l'apoptose des cellules murines de Sertoli TM4, induite par l'exposition à ce toxique, s'accompagne d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M [637].

☞ Il serait donc intéressant d'approfondir nos connaissances concernant l'altération de la voie Plk par le DNB, en appréciant par exemple, l'expression de certaines protéines

impliquées dans le cycle cellulaire au sein de notre étude "effet-dose". Une interrogation demeure toutefois : *l'arrêt du cycle cellulaire est-il le résultat de l'apoptose, ou inversement ?* Ainsi, de nombreux travaux, tels qu'une étude subaiguë et en cinétique, sont encore nécessaires afin d'appréhender la relation entre ces données novatrices, et la réponse du système biologique induite suite à l'exposition au DNB.

2. Dose sans effet et seuil de toxicité : cas de l'anti-androgène, flutamide et de la substance à "action directe", 1,3-dinitrobenzène

Les protocoles expérimentaux des deux études conventionnelles de toxicologie mentionnées plus haut, qui intègrent des techniques moléculaires au sein d'approches traditionnelles de toxicologie, nous ont également permis d'aborder un point délicat, controversé à l'heure actuelle par les toxicologues, présenté ci-après :

L'évaluation de la sécurité des produits chimiques pour l'Homme repose sur la détermination de la dose sans effet adverse observé (NOAEL) dans les études de toxicité, chez les animaux de laboratoire. Ce processus admet l'existence d'une dose seuil, en dessous de laquelle aucun effet adverse n'est constaté. Toutefois, des effets avérés à des doses bien inférieures à celles traditionnellement étudiées par les toxicologues ont été rapportés dans la littérature, et font actuellement l'objet de controverses [722]. La polémique qui en résulte, défie potentiellement le dogme intangible de la Toxicologie selon lequel c'est "la dose [qui] fait le poison" (Paracelse) [121], et ceci peut avoir des répercussions sur la manière d'aborder l'évaluation du risque des produits chimiques pour l'Homme et l'environnement. Ce débat repose en grande partie sur des données découlant d'études appréciant la toxicité de PE : certains composés, en particulier le bisphénol A, induiraient des effets adverses propres aux faibles doses, méconnus ou contraires à ceux observés aux doses plus élevées [723]. Lors d'études visant à établir la toxicité de cette molécule chez la souris, des augmentations du poids de la prostate ont été rapportées après exposition *in utero* à une dose de 2 µg/kg/jour [724]. Ce niveau de dose est 2500 fois plus faible que la NOAEL définie par les études standards de toxicologie. D'autres scientifiques ont tenté de reproduire les résultats, en vain [725, 726]. Ce sujet délicat, relatif à l'existence ou non pour les PE d'un seuil de toxicité, constitue un enjeu toujours d'actualité dans les débats scientifiques en toxicologie.

Par ailleurs, avec l'introduction des technologies "-omiques" au sein des études toxicologiques, un domaine riche en paramètres informatifs émerge. En plus de participer au développement de nouveaux biomarqueurs d'exposition et de toxicité [690-692, 727, 728], ces procédés peuvent également contribuer à lever les incertitudes et lacunes des actuelles et classiques stratégies d'évaluation des dangers et risques des substances chimiques, notamment en ce qui concerne la question des seuils de toxicité. Cette dernière interrogation a été approfondie au cours de ce travail de thèse. Dans ce but, la courbe "effet-dose" propre à chaque composé a été appréciée, et les seuils de toxicité évalués sur la base d'approches transcriptomiques et standards, dans le cas ou non de perturbation endocrinienne. Ces études ont utilisé un total de 15 animaux par groupe de dose, et il convient de noter que très peu de publications ne basent ses analyses sur un tel protocole expérimental. Celui-ci nous permet de nous affranchir du facteur limitant "variabilité inter-animale" pour garantir la validité de nos résultats.

Le travail de cette thèse reposant dans un premier temps sur l'étude du flutamide, a montré des altérations histopathologiques (hyperplasie des cellules de Leydig) et gravimétriques (diminution du poids des organes androgéno-dépendants) de l'appareil reproducteur mâle associées à une atteinte hormonale, après 28 jours de traitement à partir de 6 mg/kg/jour. L'analyse complète du génome testiculaire a révélé des changements moléculaires pertinents par rapport à la toxicité induite par l'anti-androgène, à partir de 1 mg/kg/jour. En effet, des modifications dose-dépendantes de l'expression génique ont été notées pour les voies métaboliques majeures associées à la lésion du testicule (ex. métabolisme des acides gras), et ont été confirmées par PCR. Néanmoins, à la dose de 0.2 mg/kg/jour, 18 gènes (sur ~40.000) ont été identifiés comme présentant une expression différentielle parmi lesquels, un seul est impliqué dans un processus biologique cohérent avec la lésion : *Adhfe1* (*alcohol dehydrogenase, iron containing, 1*). Cependant, la dérégulation d'un seul gène est rarement considérée comme suffisante pour définir l'altération d'une voie métabolique dans son entièreté. Cette conclusion a été corroborée par nos données de PCR, n'établissant aucune modulation significative de l'expression de ce gène à la faible dose. De ce fait, la dose seuil fondée sur l'identification de modifications moléculaires pertinentes relatives à la toxicité du flutamide (0.2 mg/kg/jour) est plus basse que celle basée sur les changements phénotypiques adverses (1 mg/kg/jour), dans le cas de notre étude. L'approche toxicogénomique ouvre ainsi l'accès à un niveau de sensibilité quelque peu supérieur à celui atteint par les analyses classiquement menées dans les études de toxicité. ☞ Dans le cadre de

la problématique des "faibles doses", il conviendrait de mener des études complémentaires avec notre substance d'intérêt, en diminuant davantage les niveaux d'exposition.

Dans la seconde partie de mon travail, le DNB a été étudié. Son exposition durant 4 jours cause une atteinte unique du testicule tant gravimétrique (8 mg/kg/jour) qu'histopathologique (apoptose des cellules germinales et vacuolisation de l'épithélium séminifère, 4 et 8 mg/kg/jour), identifiant une NOAEL à 1 mg/kg/jour. Les résultats moléculaires appuient les données phénotypiques. En effet, des modifications du niveau d'accumulation des transcrits comme ceux impliqués dans la mort et le cycle cellulaire, ont uniquement été détectées à la dose de 4 mg/kg/jour. Nous avons ainsi démontré au cours de cette étude de toxicité évaluant les conséquences d'une exposition au DNB sur la gonade mâle, que la dose sans effet basée sur les changements transcriptomiques est semblable à celle fondée sur les examens conventionnels, à savoir 1 mg/kg/jour. De fait, aucune zone de transition relative à la toxicité du DNB n'est perceptible.

☞ La réalisation d'une étude similaire sur 4 jours, avec administrations répétées du composé à 2 mg/kg/jour, permettrait peut-être de vérifier cette dernière conclusion. D'autre part, la réalisation d'une étude standard de 28 jours employant des niveaux de dose plus faibles faciliterait la comparaison avec le profil de toxicité que nous avons dressé pour l'anti-androgène.

Les courbes "effet-dose" spécifiques à chaque composé ont pu être établies comme suit :

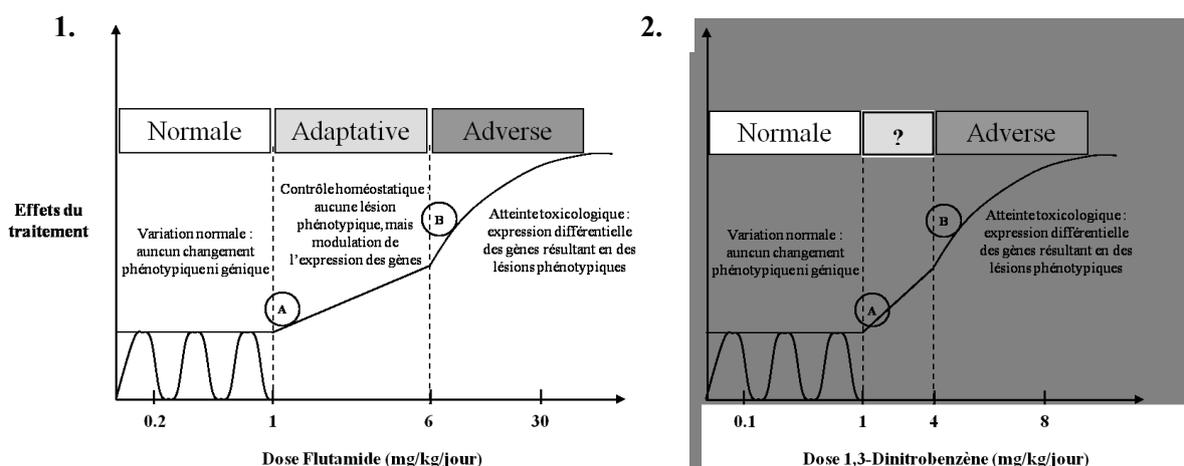


Figure 57 : Modélisation des courbes "effet-dose" du Flutamide (1) et du 1,3-Dinitrobenzène (2) avec A. Seuil : variabilité normale / réponse adaptative ; et B. Seuil : réponse adaptative / effets toxiques

En conclusion, des designs expérimentaux distincts sur la base de la durée d'exposition ne nous permettent pas de comparer *stricto sensu* les profils de toxicité établis pour chaque composé. Néanmoins, un seuil en dessous duquel l'exposition est sans effet a pu être spécifié au sein de chaque étude, et des profils monotoniques ont été identifiés. En effet, aucun profil singulier de courbe "effet-dose" n'a été apprécié tant sur le plan moléculaire que phénotypique, qu'il s'agisse de l'anti-androgène ou du toxique à "action directe". Nos analyses transcriptomiques viennent donc conforter des observations conventionnelles de toxicologie préexistantes pour le flutamide (ex. [531]) comme le DNB (ex. [682]), et constituent autant d'arguments forts en faveur d'une similitude des comportements. En effet, qu'une substance soit un PE ou non PE, elle répondrait tout autant au principe fondamental de la toxicologie, selon lequel un produit devient nocif pour la santé lorsqu'un certain niveau d'exposition est atteint.

☞ Des investigations intégratives supplémentaires sont bien sûr nécessaires pour compléter une base de données encore limitée, via l'utilisation de composés aux propriétés diverses, et en élargissant à d'autres organes et lésions.

Résultats supplémentaires : miARN et dose sans effet

Dans le cadre de la controverse "faibles doses", nous avons également défini la "dose sans effet moléculaire" se rapportant à l'expression des miARN au sein de l'étude flutamide. Elle apparaît supérieure à celle établie sur la base du génome complet d'après nos premières données : 1 mg/kg/jour (PCR quantitative) contre 0.2 mg/kg/jour (puces à ADN/PCR quantitative). Aucune interprétation claire ne peut être avancée pour expliquer un tel écart. Toutefois, les outils statistiques ainsi qu'une analyse moléculaire restreinte peuvent conduire à un tel résultat. Nous pouvons éventuellement supposer que cette entité n'interviendrait que lors de pertes sérieuses du contrôle homéostatique. Enfin, il est également possible que le changement d'expression des miARN soit visible à des temps plus courts, en ce qui concerne les doses plus faibles. Il conviendrait donc de mener de multiples études aiguës à administrations répétées pour vérifier ces dernières hypothèses.

Aucune étude jusqu'ici n'a évalué la dose sans effet relative à l'expression des miARN, et ce, malgré l'ampleur des recherches portant sur ces petits ARN et de la polémique sur les effets à faibles doses. De nombreux progrès et travaux sont encore nécessaires afin d'intégrer et interpréter correctement l'ensemble de ces données novatrices générées dans le cadre de la problématique posée.

3. Réévaluation de la toxicité testiculaire induite par le 1,3-dinitrobenzène

A. 1,3-Dinitrobenzène, substance supposée à action testiculaire directe...

I. Evaluation *in vivo* des propriétés de perturbateur endocrinien du DNB

Au cours de l'étude *in vivo* réalisée avec le DNB, nous avons été capables d'interpréter certaines données moléculaires relatives aux effets les plus marqués, à savoir l'induction de l'apoptose et l'atteinte du cycle cellulaire, détectées par les approches conventionnelles. Mais aucune phase adaptative n'a pu être appréciée, et nombreuses sont les modulations géniques obtenues après 4 jours de traitements successifs (plus de 4500 gènes dérégulés à 4 mg/kg/jour). Ces données reflètent à la fois des effets primaires du DNB, des effets secondaires et/ou compensatoires induits, et correspondent donc à un mélange d'effets difficilement dissociables, et donc interprétables. En conséquence, nous avons décidé de mener une étude aiguë par administration unique afin de nous soustraire des multiples effets toxiques du DNB, et de nous focaliser sur ses effets pharmacodynamiques.

Les données gravimétriques, histologiques et moléculaires (PCR quantitative, résultats préliminaires : cf. *Annexe*) se rapportant au testicule, ne suggèrent aucune atteinte cellulaire impliquant les phénomènes d'apoptose ou d'arrêt du cycle cellulaire. De façon surprenante, les dosages hormonaux établissent une réduction significative de la concentration en testostérone plasmatique 48 heures après administration unique, suivie d'une élévation vraisemblablement compensatoire de son niveau. Deux précédentes études avaient déjà fait état de tels changements hormonaux après exposition unique de rats mâles au DNB [620, 622]. Bien qu'intéressants, ces résultats n'ont pas donné lieu à des recherches complémentaires. A l'époque, ils n'avaient en effet pas été considérés à leur juste valeur, les inquiétudes et pressions réglementaires relatives aux substances susceptibles de perturber le système endocrinien n'étant pas aussi fortes qu'aujourd'hui.

Dans le contexte actuel, nous avons cherché à corroborer et expliquer nos données hormonales. Celles-ci ont pu être reliées à : (i) une sous-accumulation significative 48 heures après exposition, du transcrite du gène *StAR* au niveau du testicule, qui code pour une protéine de transport, étape limitante dans la production d'hormones stéroïdes ; (ii) une tendance à la répression de l'accumulation des transcrits testiculaires codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des androgènes à ce même temps ; et (iii) une diminution précoce (24

heures) significative de l'accumulation du transcrit codant pour la *LH*, la gonadotrophine hypophysaire modulant la production de testostérone. Les résultats moléculaires viennent donc confirmer et compléter les observations conventionnelles, suggérant que le DNB affecte le système endocrinien, en particulier la production de testostérone au niveau de l'appareil reproducteur mâle.

II. Evaluation in vitro des propriétés de perturbateur endocrinien du DNB

Nous avons par ailleurs mené deux études *in vitro* : l'une visant à détecter et évaluer les propriétés de PE du composé nitré au travers d'un test accepté de criblage des PE (cellules H295R) [694], et l'autre, dans le but de préciser le mécanisme d'action par lequel cette substance pourrait interférer sur la production de testostérone au niveau de l'appareil reproducteur mâle, via la culture primaire de cellules de Leydig de rat (siège de la stéroïdogénèse).

Le traitement des cellules H295R (cf. chapitre I, *Test de stéroïdogénèse sur des cellules H295R*) avec le DNB induit une altération de leur profil génique et hormonal ; la production de testostérone apparaît particulièrement inhibée. Malgré la récurrence de cette dernière atteinte, celle-ci demeure faible (-35%) en comparaison par exemple au kétoconazole (-80%), un antifongique de référence et inhibiteur de la stéroïdogénèse [133, 134]. Néanmoins, cet essai propose de classer le DNB en tant que composé potentiellement capable de perturber le système endocrinien.

Nos études sur cultures primaires indiquent que le DNB peut agir directement sur les cellules de Leydig, stimulant la sécrétion en testostérone. Le mécanisme précis à l'origine de cette induction est une énigme qu'il nous faut encore élucider. Il semblerait toutefois que l'AR ne soit pas impliqué dans cette réponse, sur la base d'un test de liaison au récepteur réalisé au sein de notre laboratoire (cf. *Annexe*). D'autre part, l'implication d'un métabolite comme le NNB (nitrosonitrobenzène) dans la toxicité testiculaire induite par le DNB, tel que suggérée par Cave et Foster [634], pourrait expliquer la divergence des atteintes endocrines observées *in vitro* et *in vivo*, à savoir augmentation et réduction respectives du niveau de testostérone et d'accumulation des transcrits impliqués dans sa synthèse. On peut également supposer que l'élévation du niveau de testostérone *in vitro* pourrait révéler un éventuel phénomène de compensation mis en place par les cellules, similaire à celui observé *in vivo* au

temps 72 heures. ☞ La réalisation d'essais *in vitro* complémentaires avec les cellules primaires de Leydig (cinétique, antagonisation de récepteur/voies d'activation, exposition au NNB...) semblent nécessaires pour confirmer ces hypothèses, et amèneraient de nouveaux éléments dans la compréhension du mécanisme d'action de ce toxique.

Bien que les données *in vivo* et *in vitro* ne coïncident pas totalement, on peut penser que le mécanisme d'action du DNB soit plus complexe que celui initialement décrit, et que ce composé perturberait également le système hormonal.

III. Perturbation du système endocrinien : quelques explications ...

Basé sur la littérature, nous avons considéré le DNB comme une substance toxique à action testiculaire directe. Nous ne suspectons pas que ce composé soit responsable d'une modification de la concentration en testostérone plasmatique. Afin d'apporter une explication, les recherches bibliographiques ont révélé deux pistes à explorer en relation avec les cellules de Sertoli, principales cibles du DNB en théorie :

› Un lien étroit entre les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig a été établi dans le testicule [729]. Il a ainsi été rapporté que des mutations au niveau du gène codant pour la FSH, hormones hypophysaire régulant les fonctions des cellules de Sertoli, sont aussi responsables de troubles de la stéroïdogenèse [386, 730, 731]. Par ailleurs, d'autres études ont révélé qu'en l'absence du récepteur à la FSH chez des souris mutantes, le niveau de testostérone apparaît diminué [213] et ce, suite à une réduction de la réponse à la LH chez ces animaux [732]. Ces résultats suggèrent une interaction paracrine entre les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig *in vivo*. La communication cellulaire entre ces deux types de cellules dans le testicule est donc une voie à approfondir ;

› Certaines publications ont proposé que les cellules de Sertoli expriment également la protéine StAR *in vitro* en réponse à divers stimuli (par ex. FSH, AMPc) [733, 734]. Des études supplémentaires ont conforté ces données, et démontré que l'accumulation de cytokines (IL-1 β) en réponse à un stress tel que l'inflammation, inhibe la synthèse de la protéine StAR au sein de ces cellules [735]. Par conséquent, le profil d'expression des cellules de Sertoli ne doit pas être négligé dans notre cas de figure.

En conclusion, l'altération des cellules de Sertoli pourrait conférer un pouvoir toxique indirect au DNB sur la biosynthèse des stéroïdes.

☞ Afin d'explorer ces pistes, des études *in vitro* sur cellules de Sertoli en co-culture ou non avec les cellules de Leydig seraient à envisager.

B. 1,3-Dinitrobenzène, réel perturbateur endocrinien ?

I. Basé sur la bibliographie et les résultats actuels

Pour rappel, les PE se définissent comme : « *des substances exogènes qui modifient la(les) fonction(s) du système endocrinien et qui ont pour conséquence de provoquer des effets néfastes sur la santé dans un organisme intact, ou sa descendance, ou (sous-) populations* » d'après l'Organisation Mondiale de la Santé. La première notion sur laquelle repose cette définition à savoir, la perturbation de l'homéostasie endocrinienne après exposition à une substance exogène, a été validée au travers de nos approches *in vivo* et *in vitro*. En effet, une administration ou exposition unique au DNB selon l'étude, est responsable d'une modulation de la production d'hormones stéroïdes confirmée par l'altération de l'accumulation des transcrits impliqués dans leur synthèse. D'autre part, au cours de l'étude subaiguë, il a été établi que le DNB perturbe la spermatogenèse et provoque l'apoptose des cellules germinales. Ceci répond donc au second concept sur lequel repose cette définition, relatif à l'induction d'effets délétères sur la santé d'organisme sain. Toutefois, de nombreuses interrogations subsistent concernant la contribution de la perturbation hormonale dans les dommages testiculaires : *est-ce que la réduction du niveau de testostérone plasmatique constatée lors de l'étude aigüe est à l'origine des lésions histopathologiques sévères observées après exposition répétée au DNB ?* Afin de confirmer ou d'infirmer les propriétés de PE de ce composé, son mode d'action qui apparaît complexe, doit d'abord être élucidé. Néanmoins, au regard de la littérature et de nos résultats, quelques éléments de réponse peuvent être apportés. Un premier travail met en parallèle les résultats gravimétriques et hormonaux après exposition unique au DNB : il montre une réduction significative du niveau de testostérone plasmatique 24 heures après administration (32 mg/kg), en l'absence de lésion phénotypique. La concentration hormonale regagne son niveau d'origine une semaine après traitement, alors qu'à cette même période une atrophie des testicules est constatée [622]. Au sein de notre projet, nous avons également rapporté une diminution du niveau de testostérone plasmatique 48 heures après exposition unique (4 mg/kg) en l'absence d'atteinte

gravimétrique et histopathologique ; alors qu'une administration répétée du DNB à cette même dose (voire supérieure) pendant 4 jours cause de sévères lésions testiculaires, mais à terme aucune modification hormonale. Les deux études ont donc démontré que le DNB provoquait des variations hormonales, détectables uniquement dans les heures qui suivent le traitement. Quand les effets phénotypiques sont observés, l'équilibre hormonal apparaît rétabli.

Par conséquent, nous pouvons simplement conclure à l'heure actuelle que le DNB ne devrait plus être considéré uniquement comme un reprotoxique à "action directe". En effet, il semblerait que sa toxicité testiculaire ne soit pas simplement due à une activité toxique directe sur les cellules de Sertoli, mais implique également dans une certaine mesure une composante hormonale.

II. Basé sur les réglementations en cours

Récemment, la réglementation concernant les PE a été modifiée dans le cadre de la révision de la directive 91/414 des produits de protection des végétaux (Plant Protection Products). Le nouveau règlement (CE) n°1107/2009 du Parlement Européen et du Conseil, d'octobre 2009, précise que les substances actives présentes dans les produits phytosanitaires, qui induisent une perturbation endocrinienne et peuvent être toxiques pour les humains ou les organismes non-cibles, ne seront dorénavant plus autorisées au sein de l'Union Européenne. Cette nouvelle réglementation va prochainement impliquer les biocides [736]. Ceci indique que les substances ayant des propriétés de PE nécessiteront une étude plus approfondie.

Cependant, les critères scientifiques fondamentaux nécessaires à l'évaluation et à la définition des PE n'ont pas été mentionnés dans la directive révisée, en dépit des progrès dans le développement de méthodes d'essai et dans la recherche portant sur le système endocrinien. De même, aucune explication n'a été fournie justifiant le fait qu'un composé aux propriétés de PE soit plus dangereux qu'un toxique d'un autre rang (interférant par ex. au niveau du système nerveux central, du foie ou du rein). Enfin, il n'existe actuellement aucune stratégie et consigne de dépistage pour identifier les effets relevant d'une exposition à un PE. Par conséquent, la possibilité d'une interprétation inappropriée concernant les effets endocriniens existe, pouvant conduire à des décisions réglementaires inadaptées.

En réponse à de telles évolutions réglementaires politiquement motivées, un groupe de travail européen nommé "Task Force Perturbateur Endocrinien", rassemblant les industriels

autour du thème des perturbations endocriniennes, a été formé par l'ECETOC (Centre Européen d'Ecotoxicologie et de Toxicologie des Produits Chimiques) en 2008/2009. Celui-ci a pour objectif : (i) d'examiner toutes les définitions disponibles relatives à la perturbation endocrinienne qui s'appliquent à la fois à la santé humaine et aux autres organismes dans l'environnement ; (ii) d'identifier les thèmes principaux et communs à toutes les définitions, ainsi que de vérifier leur pertinence dans la classification chimique et l'évaluation du risque ; et (iii) de fournir des indications quant à la nature et la qualité des données nécessaires pour conclure sur l'induction de la perturbation du système endocrinien et sur la causalité des effets indésirables. Leur approche est basée sur les connaissances scientifiques qui se sont accumulées au cours des dernières décennies.

Un rapport résumant les principaux concepts qui ont émergé de ce groupe de travail s'intitule "Guidance on Identifying Endocrine Disrupting Effects" [72]. Il a été transmis à la Direction Générale de l'Environnement, une direction de la Commission Européenne chargée de proposer de nouvelles mesures législatives en matière d'environnement, et de suivre leur mise en œuvre au sein des états membres de l'Union Européenne. Celle-ci va prochainement élaborer des critères scientifiques spécifiques pour les produits chimiques, afin de permettre une définition claire des PE au sens réglementaire du terme, tenant éventuellement compte du document soumis par l'ECETOC.

Sur la base du rapport établi par le groupe de travail, nous avons apprécié le potentiel de PE du DNB. Deux modèles ont été réalisés : l'un antérieur à la prise de conscience des autorités sanitaires, gouvernementales et scientifiques, et précédant la réalisation d'études mécanistiques visant à évaluer le potentiel de perturbateur du système endocrinien (A), l'autre postérieur (B) (Figure 58). Aujourd'hui, les données semblent suffisantes pour considérer le DNB comme un PE, en se référant aux critères établis par l'ECETOC. Toutefois, le travail à effectuer pour mettre à jour la contribution de la perturbation endocrinienne dans les effets adverses testiculaires induits par le DNB reste bien évidemment énorme.

Figure 58 : Profils de toxicité testiculaire du DNB établis d'après les critères de l'ECETOC
(A) avant, (B) après que les PE aient été considérés comme un problème de santé publique

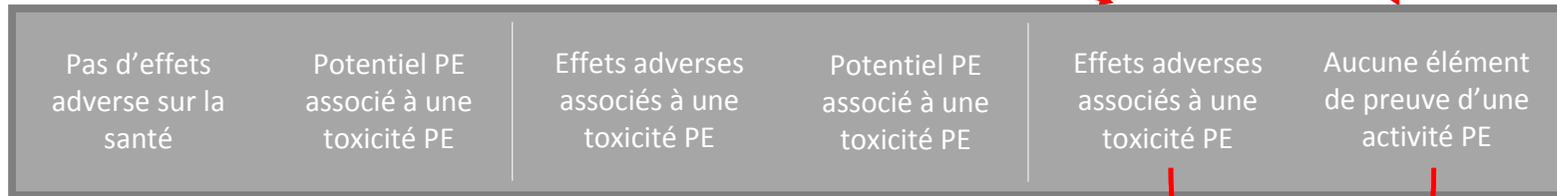
A

Profil de toxicité testiculaire du 1,3-Dinitrobenzène (DNB)

Antérieur aux études mécanistiques évaluant le potentiel de perturbateur du système endocrinien (PE)

Etudes précoces	Résultat(s)
Rat 4, 8, 16 semaines	↓ Poids des testicules, ↓ spermatogenèse, formation de cellules géantes
Rat: 7 jours	Dégénération des spermatides, ↑ débris cellulaires, vacuolisation des cellules épithéliales, spermatides multinucléées, altération de l'expression de gènes impliqués dans le processus d'ubiquitination
Rat: 4 jours	↓ Poids des testicules, vacuolisation des cellules de Sertoli, dégénération des cellules germinales, pas d'effet sur la testostérone plasmatique

Données mécanistiques limitées
 Pas de changement hormonaux plasmatiques pertinents : FSH, LH et Testostérone
 Liaison du DNB à l'ER ou l'AR?



L'exposition au DNB induit des lésions testiculaires; aucune perturbation endocrinienne évidente

Eléments insuffisants pour définir/identifier le DNB en tant que PE

Toxique de la reproduction

Etude	Références
Etudes précoces	
Rat 4, 8, 16 semaines	Cody et al (1981). J Toxicol Environ Health 7:829-847. Irimura et (2000). J Toxicol Sci 25:251-258.
Rat: 7 jours	Tengowski et al (2007). Biol Reprod 76:149-163.
Rat: 4 jours	Ma thèse : LRI EMSG46, 2010
Etudes mécanistiques	
Rat: Dose unique (48h à 1 semaine)	Rehnberg et al (1988). Toxicol Appl Pharmacol 95: 255-264 Reader et al (1991). Fundam Appl Toxicol 16: 61-70.

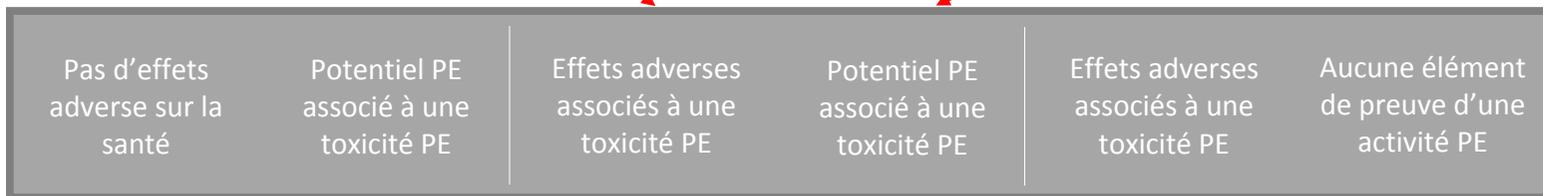
B

Profil de toxicité testiculaire du 1,3-Dinitrobenzène (DNB)

Postérieur aux études mécanistiques évaluant le potentiel de perturbateur du système endocrinien (PE)

Etudes précoces	Résultat(s)
Rat 4, 8, 16 semaines	↓ Poids des testicules, ↓ spermatogenèse, formation de cellules géantes
Rat: 7 jours	Dégénération des spermatides, ↑ débris cellulaires, vacuolisation des cellules épithéliales, spermatides multinucléés, altération de l'expression de gènes impliqués dans le processus d'ubiquitination
Rat: 4 jours	↓ Poids des testicules, vacuolisation des cellules de Sertoli, dégénération des cellules germinales, pas d'effet sur la testostérone plasmatique

Données mécanistiques	
Etudes	Résultat(s)
Test de liaison à l'AR	Négatif
<i>In vitro</i> stéroïdogénèse (H295R)	Production de testostérone affectée
<i>In vitro</i> stéroïdogénèse (Leydig cells)	Production de testostérone affectée
Rat: Etude aiguë, administration unique	Réduction de la concentration en testostérone plasmatique



L'exposition au DNB induit des lésions testiculaires; évidence de perturbation endocrinienne

Éléments suffisants : DNB potentiel PE

Etude	Références
Etudes précoces	
Rat 4, 8, 16 semaines	Cody et al (1981). J Toxicol Environ Health 7:829-847. Irimura et al (2000). J Toxicol Sci 25:251-258.
Rat: 7 jours	Tengowski et al (2007). Biol Reprod 76:149-163.
Rat: 4 jours	Ma thèse : LRI EMSG46, 2010
Etudes mécanistiques	
Test de liaison à l'AR	LRI EMSG46, 2010
<i>In vitro</i> stéroïdogénèse (H295R)	Ma thèse : LRI EMSG46, 2011
<i>In vitro</i> stéroïdogénèse (Leydig cells)	Ma thèse : LRI EMSG46, 2011
Rat: Dose unique (8h à 1 semaine)	Rehnberg et al (1988). Toxicol Appl Pharmacol 95: 255-264 Reader et al (1991). Fundam Appl Toxicol 16: 61-70. Ma thèse : LRI EMSG46, 2011

Enfin, compte tenu des données obtenues pour le DNB au travers d'investigations permettant d'apprécier son potentiel de PE, une question évidente hante bon nombre de scientifiques et d'industriels : *combien de substances courantes, telles que le DNB, se révéleront être des PE après études pertinentes ?*

C. 1,3-Dinitrobenzène et perspectives

☞ La partie du travail de thèse qui concerne le DNB conduit à de nombreuses perspectives dont certaines, résumées ci-dessous, sont en cours d'évaluation au sein du laboratoire. La première concerne la validation ou non de ses propriétés de PE, sur la base d'essais *in vitro* (ex. test d'activité de l'aromatase à l'aide d'échantillons tissulaires [737]) et/ou *in vivo* (ex. test de Hershberger) développés au sein de programmes visant à détecter de telles substances. Une seconde approche consiste en une caractérisation encore plus fine du mécanisme d'action moléculaire et cellulaire, par lequel le DNB induit des effets toxiques sur l'appareil reproducteur mâle, aussi bien hormonaux qu'histologiques. Pour ce faire, on peut envisager : (i) l'analyse globale des données d'expression génique à partir des échantillons testiculaires de l'étude de toxicité aiguë ; (ii) la définition du niveau de LH plasmatique au sein de l'étude aiguë pour conforter les résultats moléculaires ; (iii) la mesure de la testostérone testiculaire pour confirmer/infirmier l'absence d'atteinte hormonale après administrations répétées ; (iv) l'évaluation des profils testiculaires d'accumulation des protéines et d'expression des miARN modulés par ce toxique, au sein des études aiguë et subaiguë mentionnées dans ce projet ; (v) la réalisation d'études *in vivo* supplémentaires, dont une étude subaiguë similaire à celle décrite dans ce travail, soit (a) avec administrations répétées du composé (par ex. 2 mg/kg/jour) afin d'apprécier ou non l'existence d'une phase adaptative, soit (b) en cinétique après administrations répétées du composé (sur 4 jours, 4 mg/kg/jour), dans le but de compléter la caractérisation globale du profil de toxicité testiculaire induit par le DNB ; ou (c) en parallèle à une antagonisation du récepteur à la GnRH, afin de définir si l'atteinte hormonale décelée après administration unique est à l'origine des lésions histopathologiques sévères observées après exposition répétée au DNB.

4. Comportements du flutamide et du 1,3-dinitrobenzène relatifs à la mise en place de la toxicité

Les travaux réalisés lors de ce projet de thèse nous ont permis de collecter de nombreuses informations complémentaires, d'émettre des hypothèses relatives au mécanisme d'action par lequel le flutamide ou le DNB induit des effets potentiels toxiques sur l'appareil reproducteur mâle, et de préciser les profils de toxicité testiculaires propres à chaque composé. Un dernier point reste toutefois à aborder, et concerne l'éventuelle différenciation du comportement toxique d'un PE par rapport à une molécule exerçant une toxicité testiculaire "directe". Pour ce faire, nous tenterons d'apporter quelques éléments de réponse à la lumière des principaux résultats obtenus au cours de ce travail.

A. Profil de toxicité du flutamide

Etudes *in vitro* :

› La capacité du flutamide à lier l'AR a été vérifiée grâce aux tests d'activation transcriptionnelle et de liaison au récepteur, au sein du laboratoire (cf. *Annexe*). Puisque son métabolite est considéré comme l'agent inhibiteur actif capable de se lier au récepteur au niveau des cellules cibles avec une affinité supérieure, l'absence de réponse au sein du test de stéroïdogénèse (H295R) n'est pas surprenante (cf. *Annexe*) ;

Etude *in vivo* subaigüe :

› D'un point de vue gravimétrique, une diminution du poids des organes androgéno-dépendants (prostate, vésicules séminales et épидидymes) a été rapportée en l'absence de changement au niveau testiculaire ;

› L'histopathologie révèle une atteinte spécifique des cellules de Leydig (siège de la stéroïdogénèse) en réponse à l'anti-androgène. Le flutamide affecte la fonction endocrine du testicule ;

› Un dérèglement de la balance hormonale (testostérone) a été constatée, dont l'origine et les conséquences sont assez bien connues : antagonisme de l'AR, rétrocontrôle défaillant, niveau de LH induit, hyperplasie des cellules de Leydig, expression génique et protéique altérée... (cf. discussion, *Flutamide : confirmation moléculaire de son anti-androgénicité et mise en évidence de l'altération du catabolisme des acides gras*) ;

- › Les données transcriptomiques renforcent la compréhension des mécanismes d'action du flutamide, identifiant la perturbation principale du métabolisme des acides gras après exposition ;
- › Moléculaire comme phénotypique, des effets dose-reliés ont pu être mis en évidence, arborant ainsi un profil monotonique en réponse au flutamide ;
- › Enfin, nous avons été en mesure d'identifier des doses sans effet : celle fondée sur l'identification de modifications transcriptomiques pertinentes relatives à la toxicité induite par le flutamide est inférieure à celle basée sur les changements phénotypiques adverses.

B. Profil de toxicité du 1,3-dinitrobenzène

Etudes *in vitro* :

- › Le DNB qui devait théoriquement ne pas être actif dans les essais de stéroïdogénèse (cellules de Leydig primaires comme test de criblage des PE), s'avère capable de moduler la synthèse des hormones stéroïdes ;

Etudes *in vivo* subaigüe et aigüe :

- › D'un point de vue gravimétrique, des administrations répétées au DNB provoque uniquement une diminution du poids des testicules. Ces résultats attestent de la spécificité testiculaire de l'action toxique du DNB ;
- › Lors de l'étude subaigüe, l'histopathologie révèle une atteinte des cellules germinales et des cellules de Sertoli. Le composé nitro-aromatique affecte la fonction exocrine du testicule ;
- › Les données transcriptomiques relatives à l'étude subaigüe renforcent la compréhension des mécanismes d'action de ce composé identifiant une vaste toxicité du DNB, au travers de la modulation de deux processus biologiques intimement liés, essentiels au développement et à l'homéostasie : l'apoptose et le cycle cellulaire ;
- › Nous avons été en mesure d'identifier une dose sans effet : quel que soit le paramètre étudié dans l'étude subaigüe menée avec le DNB, la dose sans effet est analogue. En réduisant l'intervalle de doses et/ou en augmentant la durée d'exposition, cette dernière conclusion peut toutefois être corrigée ;
- › Enfin, lors de l'étude aigüe, un dérèglement de la balance hormonale a été rapporté, cependant le phénomène responsable d'une réduction de la concentration en testostérone plasmatique n'est pas clair : évènement résultant de la méthémoglobinémie induite par le DNB ? Cible(s) cellulaire(s) ? Atteinte primaire ou secondaire ? Voie(s) moléculaire(s) et

récepteur(s) impliqués ?... (cf. discussion, *1,3-Dinitrobenzène, substance supposée à action testiculaire directe...*).

C. Conclusions

Au cours de ce travail, l'association des données de transcriptomique aux données d'approches conventionnelles de toxicologie a permis : (i) de renforcer la compréhension des mécanismes d'action moléculaires par lesquels le flutamide et le DNB induisent certains effets sur l'appareil reproducteur mâle, (ii) et d'y amener de nouveaux éléments. En effet, les atteintes phénotypiques caractéristiques majeures induites par le flutamide et le DNB, dont la modulation hormonale et l'apoptose des cellules germinales respectivement, ont pu être confirmées au niveau transcriptomique. Nous avons également été en mesure d'identifier de nouvelles cibles moléculaires pour chacun des composés, à savoir les gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras (flutamide) et associés à la voie des Polo-like kinases (DNB).

D'autre part, pour chaque paramètre étudié, des comportements similaires quel que soit le composé PE ou non PE, flutamide ou DNB, ont été constatés relatif à la mise en place de la toxicité testiculaire et ce, malgré des protocoles expérimentaux distincts. En effet, un seuil en-dessous duquel l'exposition est sans effet a pu être spécifié au sein de chaque étude subaiguë, et des profils monotoniques ont été identifiés. En conséquence, nos analyses transcriptomiques appuient les données phénotypiques et proposent que le principe fondamental de la toxicologie, selon lequel c'est "la dose [qui] fait le poison", s'applique autant à une substance aux propriétés de PE qu'à une substance d'un autre rang.

☞ Néanmoins, de nombreux points sont à approfondir, et la réalisation d'études supplémentaires, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, fonction de la dose et du temps, utilisant un éventail de composés et élargissant à d'autres organes, est nécessaire afin de confirmer/infirmier notre hypothèse.

Enfin, nos résultats ont permis d'apporter un nouveau regard sur l'implication des miARN dans la problématique des PE. Ils suggèrent également que la conduite d'essais spécifiques aux PE puisse remettre en cause la frontière, si tant est qu'elle existe, entre des molécules ayant une toxicité sur l'appareil reproducteur considérées comme PE et celles considérées initialement comme non PE.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc démontré que la mise en place conjointe d'une analyse moléculaire dans des études conventionnelles de toxicologie semble être une bonne stratégie, permettant de collecter de multiples informations. Des progrès semblent encore être nécessaires afin d'appréhender au mieux la relation qui existe entre ces données moléculaires, et la réponse du système biologique induite suite à l'exposition à un xénobiotique. Mais ces procédés ouvrent tout de même la voie à de nouvelles perspectives. Nul doute que s'ils pouvaient permettre à la fois de caractériser spécifiquement et plus sensiblement les composés toxiques, et notamment les PE tel que suggéré au travers de ces travaux, les applications seraient nombreuses et l'approche de la toxicologie en serait changée [686, 738].

5. Perspectives

Au-delà des aspects que nous venons d'évoquer, la problématique des PE soulève également d'autres questions non résolues. Sur le plan scientifique, on s'interroge sur les effets transgénérationnels des PE et les fenêtres d'exposition. On invoque de plus en plus des modifications épigénétiques qui pourraient rendre compte des effets qui se manifestent tardivement en fonction du mode de vie, voire transgénérationnels. On s'interroge également sur les interactions à faible dose (additive, multiple, antagoniste) qui pourraient résulter d'expositions simultanées à de multiples substances chimiques, présentant des activités hormonales variées. Nombre de scientifiques s'accordent à penser que les "effets cocktail" des polluants est un domaine de la toxicologie moderne encore largement inexploré, qu'il est nécessaire d'étudier. Enfin, jusqu'à maintenant, la mise en évidence de ces problématiques s'est généralement cantonnée à une approche réductionniste : les chercheurs étudient les effets de substances sur une espèce donnée et dans un environnement défini, voire contrôlé. Or, face à la spécificité des mécanismes d'actions des PE, cette approche ne semble pas toujours réaliste. La thématique des PE représente donc un challenge auquel la communauté scientifique et les autorités sanitaires ont à faire face.

Cette conclusion reflète parfaitement la situation des PE : une problématique riche en concept, mais parfois pauvre en preuves. Ces notions sont à souligner alors qu'il est commun d'entendre que les effets nocifs sur la santé humaine des PE sont une évidence.

ANNEXES

Annexes : Article 1

Tableau S1. Liste des gènes différentiellement exprimés dans les testicules de rat, après traitement au flutamide. Les données de fold-change ont été calculées par rapport à la valeur moyenne du groupe contrôle (véhicule). (7-9 animaux/groupe ; FDR \leq 0.05 ; one-way ANOVA)

Common Name	FM (mg/kg/day)			
	0.2	1	6	30
A_44_P898713				0.820
NM_053019				0.748
NM_001024751			0.813	0.781
CB547154				0.668
NM_134415				0.825
NM_175761				0.758
ENSRNOT00000030579			0.826	0.749
ENSRNOT00000017812				0.828
NM_012588				0.491
ENSRNOT00000009115		0.802	0.786	0.697
NM_001004082				0.736
NM_012569			0.901	0.838
A_44_P959751			0.869	0.879
ENSRNOT00000020767				0.788
NM_001079897				0.764
NM_001025050				0.798
NM_012751				0.786
ENSRNOT00000038162				0.878
XM_215641				0.768
NM_001004281			0.885	0.852
ENSRNOT00000009169				0.630
NM_001013972			0.866	0.838
NM_019129				0.885
ENSRNOT00000004006			0.748	0.586
NM_031798				0.792
NM_001085475				0.845
ENSRNOT00000034994				0.749

NM_001017448				0.882
NM_001004264				0.819
XR_005652			0.847	0.776
XM_001053262			0.844	0.848
ENSRNOT00000004614				0.881
ENSRNOT00000001975				0.577
ENSRNOT00000038285				0.794
AT_ssR_AB_3			0.903	0.886
ENSRNOT00000041731			0.752	0.707
XM_001058929				0.668
NM_001037782				0.608
ENSRNOT00000031291				0.723
ENSRNOT00000010097				0.660
XM_001072321				0.862
ENSRNOT00000008459				0.663
NM_053473				0.757
NM_001025127			0.892	0.852
TC605809				0.778
ENSRNOT00000031262			0.810	0.712
A_44_P297805				0.685
NM_139186				0.820
NM_001009602				0.871
CO401386			0.856	0.839
M61725			0.744	0.675
ENSRNOT00000024599			0.787	0.692
ENSRNOT00000010366				0.685
NM_020305			0.903	0.894
ENSRNOT00000009261			0.802	0.696
NM_013088				0.691
NM_176075				0.853
NM_001005529				0.818
ENSRNOT00000006237			0.738	0.678
XM_214391			0.865	0.818
ENSRNOT00000003318				0.774
NM_001007656			0.840	0.834
NM_022629				0.887
ENSRNOT00000023827			0.702	0.591
NM_001025699				0.731
TC603711				0.665
NM_001008359				0.695
ENSRNOT00000005740				0.821
NM_001013925			0.714	0.590
NM_001000727				0.582
ENSRNOT00000014640		0.850		0.819
NM_017004		0.492	0.458	0.270
AA850372				0.537
ENSRNOT00000013378				0.734

NM_001008526				0.771
NM_052809				0.761
NM_001012179		0.858	0.846	0.723
XR_006423				0.600
NM_078622				0.734
ENSRNOT00000015813				0.780
ENSRNOT00000027893			0.774	0.765
NM_031542				0.720
NM_017322				0.808
NM_145678				0.607
ENSRNOT00000010676			0.757	0.640
ENSRNOT00000021484			0.840	0.806
XM_345073				0.824
NM_001024297			0.916	0.879
ENSRNOT00000017448				0.646
ENSRNOT00000056592				0.752
NM_001047087				0.633
ENSRNOT00000008630		0.828	0.837	0.774
ENSRNOT00000008757				0.629
ENSRNOT00000007777			0.836	0.766
TC589300				0.702
ENSRNOT00000006809				0.782
ENSRNOT00000021437				0.643
NM_001047936				0.651
NM_134335			0.844	0.814
ENSRNOT00000037389			0.747	0.568
ENSRNOT00000007073				0.797
ENSRNOT00000043545			0.793	0.751
AF361755		0.788	0.790	0.725
NM_001025735			0.834	0.804
NM_053988			0.449	0.264
NM_001013434		0.902	0.885	0.827
NM_001044290				0.777
NM_001034994		0.905		0.854
ENSRNOT00000017590				0.804
ENSRNOT00000013265				0.799
ENSRNOT00000007710				0.561
DN934467				0.816
XM_222652				0.838
ENSRNOT00000025426				0.679
NM_153740				0.862
ENSRNOT00000017233				0.625
ENSRNOT00000007701			0.808	0.716
XM_236501			0.817	0.730
ENSRNOT00000057956				0.587
NM_001014128				0.712
NM_001011947			0.869	0.816

NM_175603				0.623
ENSRNOT00000051612				0.633
ENSRNOT00000024864				0.619
NM_016995			0.885	0.851
ENSRNOT00000017137				0.754
CO386862		0.783	0.763	0.678
AW915009				0.841
ENSRNOT00000027087				0.713
ENSRNOT00000009115				0.682
NM_017103				0.658
CF110246				0.792
NM_001008314		0.880	0.881	0.820
ENSRNOT00000020377				0.763
ENSRNOT00000057423				0.719
NM_001024882				0.705
NM_012588				0.475
XM_343002			0.861	0.863
ENSRNOT00000010223			0.701	0.655
NM_053561				0.872
ENSRNOT00000010628			0.844	0.786
NM_001024886				0.896
ENSRNOT00000059984		0.836	0.833	0.757
NM_001013946				0.694
A_44_P377355				0.873
ENSRNOT00000028869	0.879	0.864	0.778	0.719
NM_172023				0.788
XM_001053087				0.810
NM_001024324			0.902	0.888
XM_343351				0.716
NM_001010963				0.912
XM_001058968			0.743	0.706
NM_001014112			0.867	0.844
AF468695			0.812	0.717
ENSRNOT00000014943			0.828	0.836
ENSRNOT00000048838				0.869
ENSRNOT00000007221			0.821	0.834
ENSRNOT000000022751				0.842
NM_001017466			0.871	0.800
NM_001017472				0.883
ENSRNOT00000049662				0.823
ENSRNOT00000038176				0.734
XR_006182			0.849	0.745
ENSRNOT00000057756				0.590
ENSRNOT00000035596				0.719
NM_001017483				0.805
NM_001005903			0.884	0.837
ENSRNOT00000012219			0.771	0.715

ENSRNOT00000049300				0.811
NM_173105	0.903		0.898	0.887
XM_232850			0.879	0.850
U18650				0.644
NM_012824				0.638
NM_057104			0.886	0.853
BE117489		0.800	0.694	0.627
NM_001013983				0.878
XM_225559				0.659
ENSRNOT00000058148		0.824	0.785	0.686
ENSRNOT00000057901				0.724
ENSRNOT00000055831				0.769
ENSRNOT00000048711				0.829
ENSRNOT00000015467				0.637
ENSRNOT00000015625				0.823
ENSRNOT00000048026			0.773	0.733
NM_019185				0.711
ENSRNOT00000049060				0.557
XM_220256				0.879
ENSRNOT00000021693			0.746	0.746
XM_224829			0.815	0.749
ENSRNOT00000019617			0.632	0.582
ENSRNOT00000021024				0.900
ENSRNOT00000017291			0.871	0.862
NM_133398				0.837
NM_181473				0.792
NM_022232				0.882
ENSRNOT00000034956				0.730
ENSRNOT00000004513				0.772
ENSRNOT00000046509				0.689
XM_343446				0.729
ENSRNOT00000045795			0.862	0.836
ENSRNOT00000012131				0.753
TC594039			0.752	0.667
NM_030844			0.891	0.825
NM_001014020				0.631
NM_173133				0.747
AF164039			0.730	0.682
ENSRNOT00000014481				0.710
ENSRNOT00000058514			0.826	0.802
NM_030866				0.666
NM_053655				0.685
XM_235088			0.771	0.645
BF391710			0.774	0.639
ENSRNOT00000024172			0.779	0.651
NM_001012019				0.890
ENSRNOT00000010427				0.754

XM_213773	0.882			0.886
ENSRNOT0000006755				0.795
ENSRNOT00000017391				0.783
XM_220055			0.791	0.768
NM_001077673			0.891	0.878
TC608935			0.826	0.770
ENSRNOT00000050748				0.617
NM_031762				0.559
ENSRNOT00000059246				0.765
ENSRNOT00000038162			0.913	0.856
ENSRNOT00000001049				0.748
ENSRNOT00000012490				0.779
XM_219796			0.877	0.877
ENSRNOT00000027125				0.624
ENSRNOT00000024854				0.754
ENSRNOT00000016804		0.864	0.847	0.765
NM_001012036				0.813
NM_001017476	0.887		0.899	0.862
XM_001057645				0.635
ENSRNOT00000021621			0.776	0.664
NM_031358				0.660
ENSRNOT00000030246				0.841
NM_001012345	0.870		0.850	0.833
XM_232992			0.833	0.743
NM_001013073				0.845
NM_001033666				0.844
NM_001012134				0.513
CB545427				0.626
A_44_P400591				0.740
NM_001009698			0.878	0.824
BF522086			0.869	0.838
NM_001014120			0.804	0.776
ENSRNOT00000046798				0.886
ENSRNOT00000046032				0.882
NM_001014203			0.923	0.906
ENSRNOT00000029764				0.767
XM_345295				0.674
ENSRNOT00000039434			0.752	0.688
NM_001015015				0.853
XM_224672			0.816	0.772
ENSRNOT00000005071				0.731
ENSRNOT00000038020			0.790	0.735
ENSRNOT00000007776				0.601
NM_022213			0.757	0.670
ENSRNOT00000023550			0.728	0.615
XM_237316				0.657
ENSRNOT00000020377			0.862	0.739

NM_023989				0.826
NM_001004223	0.906		0.883	0.831
NM_001025036				0.777
ENSRNOT00000040923				0.662
NM_031042			0.868	0.838
XM_342683				0.665
ENSRNOT00000002150				0.588
ENSRNOT00000058098			0.813	0.706
NM_001024786				0.777
ENSRNOT00000029993				0.761
ENSRNOT00000006995				0.726
NM_199497				0.731
ENSRNOT00000005423			0.836	0.766
XM_231560				0.732
AW142013				0.919
NM_001017484				0.835
ENSRNOT00000016804				0.812
XR_007342				0.853
XM_001070056				0.895
NM_001014203	0.881			0.839
XR_009418				0.676
ENSRNOT00000057681				0.797
CB546262			0.869	0.863
XM_219796				0.690
NM_001014266				0.664
XM_001068589				0.745
ENSRNOT00000024568				0.803
BF561497			0.798	0.694
XM_224759			0.868	0.830
XM_230564				0.887
XM_345411			0.870	0.838
NM_001025013			0.860	0.785
NM_013223				0.835
TC586471			0.849	0.814
ENSRNOT00000021096			0.913	0.889
ENSRNOT00000046486				0.817
ENSRNOT00000023143				0.671
XM_001066988				0.727
ENSRNOT00000010014				0.696
ENSRNOT00000023214				0.835
XM_001077843			0.907	0.853
NM_001025127				0.803
XM_218790			0.769	0.747
ENSRNOT00000062087			0.734	0.636
NM_001047916				0.689
NM_019124				0.548
XM_341227			0.773	0.769

XM_347116				0.781
A_44_P845705				0.629
ENSRNOT00000024465			0.790	0.748
AI058259			0.817	0.769
NM_012532				0.634
NM_001003978			0.787	0.739
XM_226278				0.792
ENSRNOT00000010277				0.725
NM_001005873				0.851
NM_001007630			0.895	0.897
ENSRNOT00000014278				0.651
XR_005646			0.917	0.888
ENSRNOT00000022176			0.730	0.676
XM_001073245			0.841	0.774
ENSRNOT00000031792			0.752	0.657
AW144312				0.673
ENSRNOT00000017391				0.727
NM_001012160				0.770
CK595416				0.720
XR_008618				0.867
XM_214420			0.767	0.685
XM_001065973				0.639
NM_001034004				0.772
NM_001024299				0.806
NM_138525				0.645
XM_001063544		0.874	0.867	0.792
NM_001025775			0.737	0.631
ENSRNOT00000056944			0.822	0.722
ENSRNOT00000038369			0.786	0.732
ENSRNOT00000018475				0.777
XM_213983				0.853
TC622940			0.819	0.747
ENSRNOT00000014373				0.793
XR_007502				0.693
ENSRNOT00000058070				0.670
ENSRNOT00000006549			0.860	0.810
ENSRNOT00000007515				0.785
ENSRNOT00000060054				0.669
NM_001002851				0.869
NM_001007652				0.831
NM_019149				0.779
NM_001037653			0.769	0.656
XR_007342			0.891	0.855
NM_024002			0.817	0.764
NM_001000446				0.641
ENSRNOT00000006507				0.686
ENSRNOT00000041473				0.765

XM_225086			0.838	0.776
ENSRNOT00000018266				0.825
ENSRNOT00000023319				0.746
ENSRNOT00000021909			0.665	0.756
NM_001008775				0.841
NM_013088				0.686
ENSRNOT00000017233				0.553
TC589562				0.663
XM_218993			0.856	0.784
ENSRNOT00000000095			0.753	0.682
ENSRNOT00000018692			0.742	0.708
ENSRNOT00000017847				0.755
XM_001058603				0.785
NM_012820				0.881
ENSRNOT00000036402			0.858	0.757
XM_231705			0.753	0.672
NM_001009424				0.814
TC626632				0.608
ENSRNOT00000059442				0.595
ENSRNOT00000015156				0.689
ENSRNOT00000013095				0.851
A_44_P543711				0.681
ENSRNOT00000009083				0.789
TC603087			0.728	0.703
NM_147211				0.858
NM_001024261				0.757
ENSRNOT00000001421			0.762	0.740
NM_053295			0.822	0.779
ENSRNOT00000004747			0.896	0.874
NM_001024254			0.793	0.697
NM_182736				0.821
XM_343644				0.630
NM_001008354				0.871
XM_001053368				0.766
XM_342380				0.554
NM_001012043				0.791
ENSRNOT00000000345				0.735
ENSRNOT00000019968			0.809	0.744
TC603970				0.542
ENSRNOT00000047029				0.734
NM_001024790			0.716	0.638
A_44_P621605				0.707
ENSRNOT00000020757				0.729
ENSRNOT00000006290				0.605
A_44_P636957			0.827	0.831
XM_221604				0.767
XM_001060967				0.619

NM_001004098			0.774	0.658
NM_031552				0.742
ENSRNOT00000031672			0.788	0.726
TC617673				0.699
ENSRNOT00000015847			0.840	0.722
ENSRNOT00000051653				0.674
AB262979			0.722	0.681
NM_012637				0.791
ENSRNOT00000024730			0.764	0.636
NM_001008721			0.903	0.831
CB557036				0.551
NM_001024793				0.658
ENSRNOT00000041420				0.740
XM_343876				0.795
XR_005587				0.789
NM_133423				0.653
XM_237365				0.610
ENSRNOT00000042103				0.549
XM_341337			0.888	0.869
XM_001064372				0.675
ENSRNOT00000002395				0.738
BG666666				0.746
ENSRNOT00000028506				0.789
XM_001069774			0.843	0.869
NM_001008759				0.697
NM_001008366			0.892	0.889
NM_001012053			0.871	0.864
XM_001054874				0.702
NM_053890				0.779
AW918487			0.822	0.750
XR_006653				0.601
CK470667				0.654
NM_022683			0.852	0.763
NM_001014061				0.841
XM_345463			0.787	0.758
NM_001024352				0.770
NM_001012086			0.906	0.913
ENSRNOT00000009018				0.791
NM_001024366			0.890	0.843
NM_001037209				0.869
NM_013135			0.862	0.847
NM_001007713				0.910
NM_019349				0.807
BC083640			0.828	0.709
ENSRNOT00000012779				0.858
ENSRNOT00000014859				0.875
NM_024145			0.788	0.780

ENSRNOT00000027629			0.832	0.789
NM_001037361			0.828	0.761
NM_175761				0.788
XM_235839			0.770	0.681
ENSRNOT00000037376			0.812	0.795
ENSRNOT00000029191			0.852	0.839
ENSRNOT00000018936			0.825	0.771
NM_031771				0.543
ENSRNOT00000036915				0.656
NM_001014035			0.807	0.742
XM_001066920			0.737	0.666
ENSRNOT00000007003				0.631
NM_001004223				0.865
ENSRNOT00000037765			0.854	0.762
ENSRNOT00000060847				0.850
NM_001008321			0.846	0.813
ENSRNOT00000057902				0.643
NM_138502			0.787	0.730
XR_009411			0.837	0.806
ENSRNOT00000013781			0.754	0.710
NM_001009637				0.654
ENSRNOT00000012164			0.872	0.794
ENSRNOT00000010856				0.729
AY623039				0.846
BC062001				0.654
NM_147146			0.841	0.792
ENSRNOT00000035338			0.847	0.766
XM_235326				0.620
NM_199119				0.794
ENSRNOT00000002163				0.744
A_44_P852564				0.698
ENSRNOT00000012286		0.806	0.799	0.771
TC605833				0.746
ENSRNOT00000011455				0.878
ENSRNOT00000051494		0.825	0.787	0.670
ENSRNOT00000011326				0.622
ENSRNOT00000000085				0.727
NM_057188				5.205
NM_031127			1.156	1.219
NM_053674			1.510	1.727
AA996955				1.213
NM_031558			2.506	4.977
XM_001080742			1.178	1.521
M31178			1.354	1.640
XM_216186				1.147
NM_139104			1.144	1.253
ENSRNOT00000019993				1.217

NM_139342				1.335
ENSRNOT00000046563			1.252	1.515
NM_080411			2.606	7.963
NM_012823				1.801
L10336				1.382
XM_001068826				1.254
TC636017			1.359	1.593
ENSRNOT00000010593				1.222
NM_012766				1.234
NM_053819			1.495	2.073
NM_172040				1.254
NM_031561		1.401	1.936	2.525
NM_057137			1.416	2.393
ENSRNOT00000007470				1.721
NM_022500				1.204
AW918597			1.523	2.004
ENSRNOT00000028010				1.291
BM391963			1.905	2.191
XM_239269	1.118	1.104	1.134	1.229
NM_001007667		1.318	1.847	2.307
ENSRNOT00000049856				1.234
NM_001025155			1.287	1.221
NM_001009399				2.206
NM_017008				1.144
NM_012721		1.253	1.560	2.063
ENSRNOT00000011347				1.636
XM_213513				1.228
NM_053291			1.368	1.557
ENSRNOT00000030975				1.767
NM_134395			1.266	1.336
NM_199408				1.218
XM_215562			1.398	1.668
ENSRNOT00000012415		1.327	1.787	2.770
BG666368			1.195	1.326
NM_145774			2.062	2.744
NM_024359			1.197	1.371
NM_153315			1.723	1.996
ENSRNOT00000008882			1.124	1.212
NM_022936			1.767	2.070
NM_001013958				1.327
NM_012752				1.447
XM_214014			1.235	1.356
NM_012567			1.309	1.458
NM_130433			1.410	1.713
ENSRNOT00000015568				1.245
TC591196				1.404
XM_001062645				1.230

NM_001004282				1.406
NM_134390			1.471	1.721
ENSRNOT00000051254				1.205
ENSRNOT00000036838				1.347
NM_001044275			1.164	1.265
ENSRNOT00000008647			1.283	1.366
BQ205131				1.357
NM_031831				1.317
NM_001025563				1.181
BC098813			1.182	1.348
ENSRNOT00000010241			1.550	1.938
ENSRNOT00000027809				1.208
BF558512			1.200	1.355
XR_006750				1.409
BC098717				1.353
ENSRNOT00000000801		1.232	1.877	2.780
NM_033096			1.122	1.225
NM_013113				1.240
AI103224				1.634
NM_001011946			1.166	1.259
NM_001013127			1.389	1.536
XM_343271				1.157
XM_347141			1.236	1.326
AA874941			1.259	1.357
ENSRNOT00000005774				1.559
ENSRNOT00000020609			1.206	1.336
CB547915			1.851	2.459
AW141855			1.346	1.665
NM_001025719				1.444
NM_199105			1.351	1.693
AY011335				1.410
NM_031510			1.157	1.354
NM_031665				1.151
NM_016987			1.181	1.555
TC618461				1.274
XR_008469				1.214
ENSRNOT00000011158		1.210	1.446	1.651
NM_053442			1.359	1.337
NM_012939			1.631	1.876
ENSRNOT00000004815			3.289	10.818
NM_031011			1.118	1.224
TC600004			1.344	1.543
ENSRNOT00000002576			1.486	1.685
NM_212532			1.192	1.373
NM_030826				1.305
XM_001056213				1.313
TC629018				1.223

DV717733			1.357	1.494
NM_012570			1.212	1.369
AW915141				2.680
AA858745			1.297	1.483
NM_080586			1.281	1.453
NM_001025118			1.222	1.224
AA924847				1.305
NM_001006963			1.120	1.201
NM_019259				1.094
NM_001082479			1.303	1.305
ENSRNOT00000016499			1.277	1.499
AA801075			1.573	2.316
NM_001014223			1.144	1.326
NM_001077683			1.156	1.266
ENSRNOT00000015928			1.484	2.029
NM_024125			1.560	2.291
NM_001039008			1.577	1.514
DV729235			1.218	1.356
NM_031721				1.306
TC581852				1.227
XM_343404			1.316	1.469
NM_001013082			1.349	1.526
ENSRNOT00000022941				1.312
XM_343667				1.271
XM_220219			1.181	1.262
NM_139189				1.210
DV718464			1.433	1.848
CB545196			1.398	1.570
AI011151				1.246
ENSRNOT00000019574				1.181
CF110587			1.230	1.311
BI395586				1.193
ENSRNOT00000003503				1.345
U73142			1.171	1.255
XM_218529				1.462
NM_012823				1.567
NM_001030026			1.295	1.552
AF012714				1.188
NM_001013089				1.240
XM_001070712			1.347	1.643
BQ192866				1.453
NM_031689			1.976	2.628
NM_001005330			1.185	1.223
ENSRNOT00000027345			1.681	1.834
NM_012630			2.209	2.912
NM_130426			1.672	1.839
NM_053290			1.189	1.369

ENSRNOT00000027998				1.240
NM_198785			1.154	1.158
NM_017006			1.793	2.681
BE107760				1.538
NM_001014274				1.166
XR_008754				1.227
NM_183054			2.099	2.794
NM_001025027			1.310	1.534
NM_030996				1.170
NM_019359				1.308
TC626294				1.256
NM_017084				1.302
AT_ssR_GD_3			1.152	1.261
NM_022500				1.201
NM_017098			4.315	17.595
NM_031353				1.458
DV726678		1.249	1.285	1.579
ENSRNOT00000031026				1.246
NM_001037199			1.256	1.536
NM_033235			1.160	1.342
NM_001004224			1.194	1.287
NM_013087			1.347	1.584
XM_341319			1.511	1.939
DV724088				1.236
NM_019288			1.250	1.475
NM_017094			1.783	2.429
XM_001058939			1.380	1.545
NM_017080			1.408	1.703
CO389876				1.224
NM_017307				1.198
NM_017075			1.191	1.324
NM_212466			2.100	4.222
NM_013218			1.303	1.414
CK475991			1.626	2.070
NM_012545			1.694	2.521
NM_031559				1.340
NM_012692		2.541	4.734	5.389
NM_001025407				1.190
NM_176856				1.159
TC585749			1.400	1.695
NM_031655			1.240	1.503
XM_344812			1.336	1.956
NM_022597			1.347	1.561
ENSRNOT00000013249				1.314
ENSRNOT00000000078			1.204	1.443
ENSRNOT00000027237			1.270	1.584
XM_217208			1.158	1.292

NM_001033700			1.322	1.663
ENSRNOT00000030559			1.464	2.003
NM_022512			1.371	1.575
XM_001053199				1.111
NM_001017385				1.229
NM_133295			1.314	1.365
XR_007169				1.216
NM_001007733			1.205	1.382
CO386194			1.285	1.444
XM_223745			1.449	1.384
ENSRNOT00000023329	1.249	1.374	1.920	1.785
NM_001007714				1.161
NM_017173			1.155	1.230
NM_017060			1.516	1.744
K01930				1.175
TC588898				1.286
NM_001024327				1.501
NM_053596			1.215	1.344
NM_030850			1.269	1.204
NM_001024900				1.423
NM_012621		1.585	2.210	2.406
NM_017126			1.347	2.035
NM_001031641				1.152
NM_031987			1.659	1.798
NM_001012237			1.804	2.462
NM_001009625			1.380	1.413
TC643238				1.447
DV728042			1.179	1.419
NM_133387			1.276	1.492
ENSRNOT00000014301				1.180
ENSRNOT00000019500				1.297
NM_173123		1.403	2.018	2.250
ENSRNOT00000038075			1.181	1.280
NM_001013082			1.372	1.574
NM_001024368				1.388
ENSRNOT00000040802			1.764	2.103
TC607764			1.248	1.351
A_44_P667768				1.428
NM_001014204			1.231	1.666
XM_234370				1.252
ENSRNOT00000012204			1.154	1.177
CB544298			1.338	1.491
CO571318				1.211
NM_001025717			1.136	1.223
AA859348				1.849
NM_053853			1.206	1.301
TC584381			1.111	1.210

NM_031612				1.245
ENSRNOT00000035566				1.228
NM_021766			1.373	1.732
NM_153630		1.181	1.308	1.409
NM_001044294			1.227	1.319
BQ210017				1.341
NM_024149				1.197
NM_022380			1.446	1.744
ENSRNOT00000021284				1.194
TC586010				1.606
NM_001034147				1.146
NM_001013082			1.414	1.639
NM_021868			1.150	1.262
TC584975				1.306
NM_012600			1.241	1.376
ENSRNOT00000022122				1.187
ENSRNOT00000012327				1.403
NM_001009540			2.656	4.088
AW142654			1.397	1.912
AI013204				1.234
XM_343421				1.217
TC645077				1.410
NM_133380				1.532
BM986434			1.527	2.029
NM_133522			1.875	2.204
XM_242062			1.265	1.522
NM_001004231				1.158
NM_031546		1.252	1.749	2.132
NM_133383			1.250	1.331
NM_001012741				1.841
NM_053445			1.868	2.197
ENSRNOT00000000233			1.238	1.250
ENSRNOT00000011183				1.260
ENSRNOT00000009998				1.284
DV729193				1.211
XM_214777				1.415
NM_033098				1.210
BF554994			1.269	1.723
TC600128			1.143	1.179
NM_019237			1.412	1.703
XM_001053627			1.288	1.377
NM_031353				1.427
X53232			1.139	1.174
DV727304				1.197
NM_021681			1.232	1.373
NM_133539				1.166
XM_213823			1.281	1.491

NM_001013427		1.297	1.715	1.934
NM_017014			1.345	1.407
NM_134349			1.315	1.478
AA925792				1.269
XM_237286			1.288	1.411
NM_012752				3.069
NM_019165				1.527
ENSRNOT00000050653			1.376	1.572
ENSRNOT00000026271			1.131	1.300
TC598491				1.163
NM_017154			1.195	1.200
NM_031345			1.326	1.477
BF563817				1.417
TC595471			1.912	2.988
NM_001009541				1.362
NM_019225			1.524	1.604
XM_342062				1.353
AI031053			1.598	1.569
BC087069				1.276
ENSRNOT00000013979			1.244	1.416
BF551342				1.603
TC649810				1.311
ENSRNOT00000020815			1.498	1.593
NM_001004220			1.316	1.414
NM_001024823			1.136	1.178
NM_031834		1.209	1.546	1.729
TC617071			1.153	1.269
XR_005551				1.301
NM_017013			1.558	1.645
XM_578417			1.327	1.636
DV723306			1.163	1.165
NM_001005530		1.181	1.498	1.926
TC618529			1.219	1.631
TC623018			1.505	1.953
XM_001077518				1.102
BC099136				1.714
NM_022921			1.327	1.530
NM_021671				1.317
NM_022280				2.359
NM_053522				1.542
CX570147				1.189
CV104092				1.169
NM_053680				1.388
ENSRNOT00000005039			1.222	1.304
XM_343330			1.142	1.156
ENSRNOT00000006566			1.142	1.168
NM_001011959			1.193	1.323

NM_001014088			1.367	1.493
NM_001002807			1.361	1.644
NM_031682			1.619	2.074
ENSRNOT00000012348			1.202	1.184
NM_134383				1.541
BF289650			1.363	1.880
NM_019363			1.354	1.460
ENSRNOT00000027055		1.192	1.267	1.547
TC638207				1.376
TC613185				1.176
ENSRNOT00000000890				1.100
NM_001007556			1.653	2.527
NM_053302			1.663	1.990
NM_031684			1.131	1.164
BC099122			1.211	1.499
A_44_P744264			1.288	1.536
TC634704			1.101	1.149
CB546753				1.281
ENSRNOT00000012564			1.225	1.461
NM_017264			1.210	1.250
ENSRNOT00000017601			1.175	1.217
NM_001037769				1.169
NM_017172				1.243
NM_022229			1.288	1.691
NM_001017500			1.865	2.779
NM_001009692			1.186	1.344
TC592774			1.147	1.198
XR_006750				1.306
NM_001014156			1.156	1.149
TC588871			1.091	1.138
XM_343248				1.187
XM_225314			4.180	7.495
TC585807				1.198
XM_001066058			1.178	1.290
NM_001013960			1.293	1.403
NM_012608			1.173	1.333
NM_032066			1.169	1.189
BF289184			1.331	1.403
NM_032074				1.548
NM_017284				1.123
NM_207601				1.427
NM_017013			1.453	1.597
NM_032616			1.291	1.591
NM_019291				1.202
ENSRNOT00000000737			1.135	1.166
TC600839				1.504
NM_001007672				1.395

NM_012527			1.891	2.902
NM_139100				1.233
NM_001004072			1.237	1.511
NM_022540		1.241	1.753	2.335
NM_001014090				1.419
NM_212529				1.193
TC582220				1.190
NM_138850		1.357	1.657	1.575
NM_001009275				1.690
BI289678				1.470
ENSRNOT00000004494			1.240	1.454
NM_001040019				1.406
ENSRNOT00000050860				1.348
CF106882				1.357
A_44_P800548			1.414	1.620
ENSRNOT00000015546				1.401
A_44_P100565			1.356	1.576
XR_005908				1.195
NM_001012183			1.436	1.355
ENSRNOT00000056305			1.302	1.532
NM_001033883				1.454
TC591295				1.167
NM_012889			1.659	1.896
NM_181363				1.112
ENSRNOT00000007552			1.235	1.370
NM_022960			1.409	1.892
XM_236351			1.202	1.190
NM_030836			1.342	1.567
ENSRNOT00000007552			1.245	1.336
ENSRNOT00000015225				1.814
NM_031541			2.436	5.193
NM_001014162			1.737	2.110
XM_001069404			1.800	2.353
NM_019216			3.344	15.760
NM_012497			1.626	1.958
NM_001012467		1.692	2.060	2.071
NM_017008				1.232
NM_017210			2.133	2.930
TC594748				1.574
NM_022392				1.326
NM_001031822				1.273
ENSRNOT00000009712				1.459
NM_031643				1.169
NM_177421				1.332
NM_133577			1.663	2.233
XM_343173			1.159	1.247
NM_013177				1.210

NM_031757			1.417	3.503
NM_012582		1.551	2.328	2.682
NM_212494			1.119	1.131
NM_207615			1.249	1.439
AW143132			2.276	3.670
XM_579917				1.165
NM_012590				1.177
NM_017079			1.640	1.961
U42975				1.691
BC091324				1.490
NM_172336				1.318
NM_001005539			1.344	1.436
NM_017268				1.732
DV728042			1.224	1.359
NM_199097				1.245
NM_031356			1.175	1.369
XM_001081315			1.326	1.512
ENSRNOT00000042335				1.443
NM_131910				1.170
TC622489			1.242	1.620
NM_080479				1.227
XM_215220		1.165	1.323	1.691
NM_001013957			1.212	1.387
NM_001009668			1.222	1.295
NM_053857			1.140	1.230
TC596716			1.422	1.874
NM_053539				1.421
XR_006895				1.226
NM_001004274		2.153	4.140	7.868
NM_024356			2.072	1.968
NM_053908				1.355
NM_001007622			1.330	1.527
NM_001025629				1.127
TC589665				1.306
NM_181371			1.359	1.631
NM_001004274			2.591	5.051
DV728275			1.549	1.954
ENSRNOT00000025433			1.142	1.385
AW914006			1.376	1.457
BF282429				1.333
ENSRNOT00000014300				1.249
NM_001008508			1.239	1.411
TC599445			1.407	1.985
A_44_P347283				1.746
NM_020656			1.322	1.409
TC604908			1.519	2.679
NM_022245			1.142	1.331

NM_199114			1.210	1.301
XR_006649				1.166
NM_173114		1.291	1.921	2.932
XM_213333			1.134	1.137
NM_001004226			1.357	1.981
ENSRNOT00000006454			1.586	1.734
ENSRNOT00000006454				1.496
NM_053674			1.420	1.704
NM_080892			1.549	1.590
NM_012543			1.258	1.319
XM_219540				1.351
NM_017244				1.723
XM_213518		1.209	1.418	1.666
BF289878		1.316	1.785	1.525
NM_001033656			1.459	1.693
TC594998		1.242	1.290	1.398
ENSRNOT00000013780			1.248	1.368
XR_007085				1.359
NM_001008770			1.349	1.421
NM_012861			1.308	1.405
NM_080886			1.284	2.434
M63574			1.515	1.712
XM_342979			1.217	1.280
NM_001011959				1.277
NM_017030			1.453	1.638
AW915800				1.282
NM_053401		1.177	1.582	2.111
NM_001012206				1.329
NM_001034148			1.296	1.457
ENSRNOT00000028262			1.545	1.921
NM_019195				1.239
NM_053310				1.330
XM_001072574		1.796	3.934	10.277
NM_012542		1.711	3.173	3.489
NM_001007719			2.094	4.300
NM_001009536			1.216	1.355
NM_080479				1.236
NM_031100				1.216
ENSRNOT00000058306			1.347	1.685
XM_001073696				1.158
NM_017226				3.573
NM_001082409				1.176
ENSRNOT00000045710				1.224
NM_031027				1.940
NM_024359			1.239	1.450
NM_017311				1.131
BF564217			1.416	1.528

CO396428		1.202	1.407	1.830
NM_017061				3.050
NM_013122		1.260	1.884	2.448
XM_001056392				1.251
XM_213595				1.291
NM_017274			1.252	1.475
NM_021266			1.611	2.378
BC079339			1.179	1.334
NM_031841				1.364
NM_138839				1.129
NM_031853				1.189
BC087069				1.214
ENSRNOT00000041878				1.383
BC091425				1.396
TC610847			1.268	1.416
NM_001006966			1.206	1.445
NM_080783				1.490
NM_001024781				1.301
NM_001014274				1.198
ENSRNOT00000032865				1.218
TC614770				1.320
NM_022392				1.272
NM_032613				1.239
NM_024484				1.629
AW915538				1.165
DV725436				1.323
NM_138904				1.313
ENSRNOT00000003473				1.169
NM_001009622				1.242
NM_134468			1.492	1.757
NM_021989			1.183	1.346
ENSRNOT00000056316			1.362	1.784
ENSRNOT00000029001				2.127
ENSRNOT00000056518			1.363	1.743
NM_022407			1.618	2.252
TC606168				1.279
NM_173094			1.554	1.616
CF110279			1.237	1.409
NM_057105			1.604	1.782
NM_080767				1.560
XM_221100				1.837
XR_008803			1.278	1.424
NM_001009620				1.289
AI029786				1.569
NM_017081			1.979	3.851
NM_031087			1.440	1.734
XM_230583			1.354	1.462

NM_022268			1.805	2.260
ENSRNOT00000056329				1.282
NM_022229				1.406
ENSRNOT00000023506				1.359
ENSRNOT00000022534			1.224	1.384
NM_022224			1.861	2.061
NM_053664			1.554	1.657
AI235576			1.568	2.919
XM_217566				1.275
ENSRNOT00000004519			1.487	1.765
CB569110				1.200
AI235446				1.389
CA504340		1.571	1.723	1.955
NM_031527				1.221
NM_199493				1.216
XR_009251				1.233
NM_012681				1.362
NM_001006989			1.221	1.393
XR_006005				1.190
XM_344643		1.154		1.212
NM_001014242			1.230	1.421
NM_031027			1.366	1.650
NM_173114		1.442	2.405	3.642
NM_031612				1.363
ENSRNOT00000019080				1.588
NM_199394			1.159	1.276
NM_019195			1.324	1.492
NM_053637				1.140
XM_001067852				1.226
NM_054006		1.110	1.123	1.197
CO388388				1.417
TC575970				1.206
ENSRNOT00000021103			1.749	2.256
ENSRNOT00000015568			1.177	1.265
ENSRNOT00000019302			1.802	2.152
TC593314			1.325	1.326
NM_001007602				1.229
NM_022547			1.389	1.860
BF556192			1.269	1.427
CB547833			1.212	1.471
NM_001013071			1.851	4.187
NM_139105				1.172
NM_031785			1.260	1.478
NM_012661				1.259
NM_053523			1.182	1.315
NM_012891			1.203	1.313
NM_001008770			1.355	1.511

NM_001034952			1.446	1.749
NM_031587		1.232	1.308	1.524
NM_022278				1.415
NM_012823				1.569
AI232320			1.340	1.479
DY471385				1.330
ENSRNOT00000056312			1.245	1.406
BC104705				1.222
NM_053959			1.182	1.367
XM_234942			1.226	1.363
XM_223745			1.543	1.465
TC597682			1.167	1.184
AA956338				1.302
ENSRNOT00000027173		1.226	1.555	1.810
BC090008			1.227	1.311
NM_012520			1.584	1.737
NM_022392				1.320
NM_053882				1.277
XM_001081607		1.311	1.601	1.996
XM_215147			1.240	1.336
XM_001069404			1.644	2.044
NM_017342				1.547
NM_001006995			1.369	2.002
NM_001025423	1.291	1.381	1.769	2.132
NM_031742			1.340	1.862
TC625992			1.485	2.280
NM_017198				1.233
NM_012940			1.460	1.659
XM_001075009				1.230
NM_145085				1.187
NM_133441			1.540	2.085
ENSRNOT00000028275				1.425
NM_053850			1.352	1.239
BF548067			1.249	1.363
ENSRNOT00000013582			1.281	1.464
NM_012966			1.364	2.050
XM_342166				1.251
AW143016		1.303	1.574	1.661
NM_178847			1.266	1.339
XM_001065468		1.222	1.510	1.848
TC639761				1.254
DV714333				1.244
AW142962			1.631	2.487
XM_215278			1.500	1.824
ENSRNOT00000020646				1.217
XM_001063895				1.399
NM_133557				1.173

NM_001014206		1.171	1.199	1.345
U53184			1.389	1.773
TC597117			1.366	1.664
XM_215626			1.269	1.373
AW917204				1.450
TC584023				1.188
NM_031819				1.289
XR_009038				1.381
NM_080580				1.200
ENSRNOT00000036706				1.131
XM_001053469				1.150
BC101897	1.181	1.262	1.575	1.718
ENSRNOT00000020810			1.184	1.270
BG671786				1.629
NM_031020			1.183	1.228
XM_234405				1.215
ENSRNOT00000001048			1.464	1.831
BF548552				1.239
A_44_P785849				1.390
NM_013157			1.640	2.743
XR_005900				1.224
NM_053800				1.277
NM_001008520		1.296	1.894	2.418
NM_012708			1.332	1.366
NM_024352		1.124		1.158
NM_031827				1.219
TC578689			1.180	1.270
ENSRNOT00000017727			1.316	1.625
CO401680			1.397	1.577
NM_172091			1.746	2.091
NM_001002289				1.204
BF551363				2.590
BF555105				1.264
NM_177426			1.371	1.454
NM_133299			1.274	1.467
NM_017306			1.349	1.617
NM_012753			2.085	4.554
ENSRNOT00000019500				1.379
TC595980				1.383
XM_341127			1.132	1.174
NM_001034150				1.236
XM_216272			1.172	1.287
NM_031509		1.126	1.292	1.464
XR_006879			1.201	1.274
DN932947				2.217
A_44_P900229				1.368
ENSRNOT00000019080				1.416

ENSRNOT00000026327				1.121
NM_001024304				1.229
CO382328			1.389	2.129
NM_019232				1.376
TC589094			1.368	1.616
NM_178866			1.291	1.291
NM_139113				1.234
ENSRNOT00000014323			1.272	1.430
NM_134334			1.366	1.612
NM_022303		1.255	1.531	2.010
NM_053507			1.196	1.141
ENSRNOT00000013845				1.140
DV713989			1.506	2.247
NM_024162			1.437	1.543
NM_001013137			2.158	3.786
NM_053924			1.180	1.472
ENSRNOT00000015941			1.624	1.619
NM_022224			1.915	2.264
NM_030833			1.308	1.655
AW915396			1.305	1.545
NM_030847		1.174	1.573	1.908
XR_008245				1.231
NM_001034952			1.717	2.067
XR_006635				1.219
NM_031770				1.286
TC621252			1.155	1.232
XM_221074				1.286
XR_008980				1.230
NM_017006		1.280	1.909	2.940
TC624323	1.108		1.132	1.148
CB568740			1.343	1.568
NM_001080148				1.454
AA849718				1.522
AW917383			1.247	1.387
NM_032082		1.346	1.888	1.990
TC589805				1.319
CX569261			1.197	1.213
TC587895				1.216
NM_012512			1.278	1.330
XM_340887			1.424	1.646
XM_001069386				1.218
NM_001034932			1.643	2.040
NM_134369			1.358	1.614
ENSRNOT00000020532			1.314	1.558
TC608445				1.292
TC619306				1.486
A_44_P213139				1.266

TC588170			1.216	1.317
DV728333				1.401
CV795401				1.222
XM_228713			1.319	1.661
XM_001055992				1.180
ENSRNOT00000003076			1.497	1.798
TC594174			1.371	1.558
NM_198742			1.398	1.587
NM_019623		1.218	1.404	1.399
NM_144755				3.079
AW143275				1.243
NM_001025686				1.163
BF564888	1.206		1.383	1.542
AW143671				1.300
NM_031541			2.628	5.477
ENSRNOT00000034749			1.254	1.338
NM_201423			1.456	1.623
BG378227			1.388	1.544
BC097278				1.373
AA944326	1.406		1.849	2.527
TC587898			1.499	1.710
NM_031835				2.119
NM_001007700				1.179
M31178			1.266	1.578
ENSRNOT00000047137				1.298
AJ308109				1.256
A_44_P480533				1.410
XM_343337			1.296	1.493
XM_342871			1.872	3.086
NM_012964				1.536
NM_022229			1.257	1.738
NM_001007008				1.248
BG663067				1.246
NM_053736				1.433
ENSRNOT00000023221			1.239	1.307
NM_053530				1.283
BX883045			1.368	1.653
ENSRNOT00000025372	1.403	1.767	2.532	3.331
ENSRNOT00000036027		1.490	3.121	6.941
CB547155	1.223			1.218
XM_344243				1.230
NM_019244				1.237
BF562149			1.345	1.504
ENSRNOT00000037333			1.172	1.272
XM_341940			1.538	2.012
BF403483				1.239
NM_022500			1.183	1.264

CO396335			1.590	2.012
A 44 P806889			1.447	1.309
NM_001013932			1.297	1.333
NM_031735				1.261
AW916443				1.137
ENSRNOT00000029787				1.311
NM_199372			1.143	1.186
TC614250			1.403	1.509
TC583309			1.147	1.211
ENSRNOT00000006767			1.252	1.409
XR_006575				1.418
NM_001034132				1.153
XR_005793				1.265
CF108700			1.341	1.337
ENSRNOT00000006321				1.269
XM_001055728			1.278	1.385
AI171355				1.600
ENSRNOT00000024428				1.444
NM_133304			1.454	1.834
NM_031853				1.241
TC611227		1.235	1.632	2.286
TC585395				1.194
AY549448			1.175	1.455
NM_001013195				1.262
ENSRNOT00000019644				1.365
AI008498				2.567
NM_001013179				1.153
NM_139329			1.306	1.649
NM_031695				1.222
ENSRNOT00000018897			1.207	1.418
NM_134389		1.154	1.379	1.479
NM_021576				1.398
ENSRNOT00000016860				1.215
XM_230497		1.267	1.291	1.482
ENSRNOT00000005267				1.203
A 44 P899175			1.493	1.805
NM_001008553				1.235
NM_001085353			1.366	1.836
AW921183			1.145	1.249
TC616139				1.566
NM_022526			1.242	1.362
NM_144737		1.402	1.686	2.042
ENSRNOT00000024675			1.577	1.798
ENSRNOT00000027047				1.333
TC598824				1.286
ENSRNOT00000008032			2.256	2.688
ENSRNOT00000032822			1.828	1.798

NM_017298		1.354	1.337	1.571
ENSRNOT00000016722			1.798	1.656
NM_199404				1.250
XM_217361				1.260
NM_201423			1.721	2.010
NM_001007612				2.767
NM_022389			1.417	2.234
BF556841				1.189
ENSRNOT00000026716			1.179	1.363
NM_001014027			1.685	2.271
NM_021909			1.612	2.276
NM_173328			1.198	1.246
NM_013218			1.332	1.413
NM_057114			1.261	1.358
XR_007080				1.251
NM_022230		2.253	4.235	13.076
NM_031781				1.161
XM_225203			1.166	1.256
NM_022706				1.191
NM_017090				1.304
XR_005902				1.552
XM_001067603			1.216	1.350
NM_001037355			1.170	1.213
BM383868			1.530	2.008
AI228202				1.335
NM_001007633				1.406
XM_346881				1.779
NM_031551			1.250	1.370
NM_057107				1.166
U68562				1.655
NM_057197		1.316	1.886	2.076
XM_001068488				1.290
TC593539			1.382	1.663
NM_053290				1.234
NM_017286		1.626	3.204	6.023
AW920987				1.221
NM_019144				1.357
NM_001007612				2.772
TC588663				1.260
XM_573949			1.298	1.686
AW143890			1.364	1.496
NM_017080			1.511	1.765
NM_001044275				1.250
NM_001009920			1.376	1.596
NM_182819				1.493
ENSRNOT00000059191				1.481
NM_001031646			1.211	1.276

NM_053596			1.291	1.522
BC101897			1.442	1.502
NM_133624			1.341	1.542
ENSRNOT00000028725			1.154	1.130
NM_001011959				1.338
BC131845				1.238
ENSRNOT00000009491				1.557
NM_173136			1.467	1.998
NM_024153			1.389	1.761
NM_001002807			1.297	1.581
BC104704				1.252
NM_017340		1.166	1.374	1.568
NM_012515			1.312	1.460
NM_031125			1.164	1.225
ENSRNOT00000001581				1.161
NM_019225			1.515	1.615
NM_017075			1.208	1.289
XM_001061391			1.313	1.568
BC129127				1.228
ENSRNOT00000013224				1.212
XM_217218				1.874
NM_022592			1.317	1.589
AI407449			1.375	1.456
NM_057186			1.307	1.718
U09540		1.364	1.754	2.135
NM_001014133			1.282	1.446
M34230		1.571	2.318	2.767
NM_012821			1.285	1.714
NM_199208				1.579
A_44_P213371			1.217	1.613
NM_001085406			1.423	1.979
DV716763				1.358
NM_031579				1.325
DV727084			1.281	1.367
BF556870				1.592
NM_017257			1.203	1.324
CO396428			1.558	2.028
NM_001025423			1.664	2.127
BG666460				1.427
ENSRNOT00000037489			1.261	1.465
NM_019220				1.245
NM_080581				1.366
AI008646				7.910
NM_024354		1.370	1.634	1.707
NM_133590		1.187	1.246	1.435
CV108400				1.230
NM_019286			1.825	2.041

NM_053358				1.234
ENSRNOT00000003959			2.048	2.346
NM_130433			1.379	1.674
ENSRNOT00000004494				1.462
NM_001008521			1.104	1.152
XR_007103				1.157
ENSRNOT00000035259			1.195	1.361
ENSRNOT00000016464				1.132
ENSRNOT00000034930				1.332
NM_017060			1.476	1.687
NM_012891			1.144	1.347
NM_024386				1.145
NM_053851			1.275	1.424
ENSRNOT00000026914			1.406	1.858
NM_031151				1.177
TC595416		1.199	1.345	1.536
NM_031049				1.275
XM_001060616			1.686	2.067
AA925831				1.165
NM_017265			1.957	4.117
ENSRNOT00000033720				2.111
NM_022197				1.465
BG667093				1.362
NM_053716			1.367	1.474
L10336		1.347	1.303	1.682
AI169327				1.662
XM_001080233		1.347	1.721	2.120
BC087069				1.193
CO559017			1.310	1.527
NM_031830			1.386	1.640
A_44_P452527				1.241
NM_022686			1.506	1.727
NM_017064			1.312	1.715
NM_001014088			1.383	1.500
NM_001014242				1.274
TC627588			1.169	1.400
AA955605				1.513
NM_001009708				1.434
NM_053420			1.250	1.605
NM_031345			1.280	1.374
XM_216520			1.642	1.871
XM_214993				1.677
NM_031749			1.099	1.095
NM_001033656			1.536	2.013
NM_133527				1.440
NM_017024			1.290	1.260
J05087		1.311	1.486	1.572

NM_001034938			1.237	1.239
NM_022392				1.329
ENSRNOT00000000018			1.430	1.673
XM_229115			1.198	1.609
NM_053623				1.360
XM_215110				1.375
BC099150			1.169	1.236
NM_134459				1.253
NM_030826				1.243
NM_022219			1.341	1.639
BF555763				1.278
XM_345164			1.379	1.231
NM_138843			1.203	1.310
CF110270				1.228
NM_001008297				1.405
XR_008037				1.302
NM_012899			1.304	1.529
NM_138508			1.296	1.329
ENSRNOT00000015526			1.196	1.284
NM_012763				1.229
XM_222276				1.183
TC598357				1.587
NM_001009283			1.260	1.476
ENSRNOT00000006943				1.469
NM_012884			1.725	2.077
A_44_P898999			1.164	1.306
NM_053770				1.262
NM_012844			1.274	1.432
NM_022229			1.261	1.721
CF110653				1.283
A_44_P475804				1.296
M30596			1.203	1.368
BF555796			1.941	1.826
XM_223981				1.164
AW914793				1.146
AI233993				1.459
BG666843			1.137	1.257
NM_178102				1.243
NM_023104				1.387
NM_139192			3.159	15.516
NM_017235				1.227
XM_214027			1.225	1.301
BC079339			1.342	1.557
NM_013007				1.921
NM_031241			1.831	2.477
ENSRNOT00000060168				1.320
NM_031344			1.412	1.637

NM_031817			1.562	1.985
NM_001012118			1.404	1.617
NM_198755			1.803	2.515
XR_005712				1.262
ENSRNOT00000009797			1.168	1.316
ENSRNOT00000011402			1.434	1.896
XM_225257			1.236	1.458
ENSRNOT00000021729			1.215	1.276
TC611736				1.520
NM_001014242			1.349	1.495
ENSRNOT00000025767				1.407
ENSRNOT00000026141				1.262
NM_078623		1.256	1.635	2.022
NM_001039010			1.298	1.435
NM_032612			1.258	1.412
NM_053857				1.256
L24776				1.373
NM_057186			1.348	1.632
NM_177928				1.528
ENSRNOT00000026794			1.155	1.199
ENSRNOT00000008868		1.513	2.297	4.328
ENSRNOT00000023519			2.084	3.346
NM_016986			1.254	1.377
NM_022500				1.217
NM_017097				1.374
NM_001009671				1.273
XM_215147			1.254	1.366
AW918437				1.526
NM_017091			2.979	5.246
NM_017181			1.548	1.634
NM_138840			1.336	1.309
NM_053549				1.258
NM_012808			1.404	1.495
AA848813			1.645	1.803
BF564469	1.620			
NM_145780	0.903			
ENSRNOT00000058312		0.777		
BF564469		1.385		
ENSRNOT00000043210		1.133		
AA998073		0.838		
NM_001013037		1.129		
ENSRNOT00000012383			0.845	
ENSRNOT00000006531			0.802	
NM_001013432			1.158	
NM_001012222			0.892	
ENSRNOT00000018373			1.366	
CX569150			1.465	

NM_130744			1.135	
AI137249			0.773	
ENSRNOT00000014695			0.826	
NM_145780			0.890	
ENSRNOT00000024967			0.726	
AW143532			0.788	
NM_012780			0.828	
ENSRNOT_00000043907			0.912	
NM_001025026			0.741	

Tableau S2. Comparaison des données issues de puces à ADN *versus* celles obtenues par RT-qPCR, pour une sélection de gènes modulés après une exposition au flutamide. Les valeurs d'expression génique (qPCR) ont été normalisées à la β -actine (10 animaux/groupe). Les données de fold-change ont été calculées par rapport à la valeur moyenne du groupe contrôle (véhicule). * p -value ≤ 0.05 ; ** p -value ≤ 0.01 , *** p -value $\leq 0,001$ (one-way ANOVA)

GenBank	Gene Description (gene symbol)	FM (mg/kg/day)				
			0.2	1	6	30
NM_017340	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl (<i>Acox1</i>)	Array	1.102	1.166 *	1.374 ***	1.568 ***
		qPCR	1.16	1.197 *	1.213 **	1.336 ***
NM_001025423	Alcohol dehydrogenase, iron containing, 1 (<i>Adhfe1</i>)	Array	1.291 **	1.381 ***	1.769 ***	2.132 ***
		qPCR	1.267	1.166	1.701 ***	1.925 ***
XM_239269	Ankyrin repeat and FYVE domain containing 1 (<i>Ankfy1</i>)	Array	1.118 *	1.104 *	1.134 **	1.229 ***
		qPCR	0.998	1.02	0.967	1.022
NM_173105	Aquaporin11 (<i>Aqp11</i>)	Array	0.903 *	0.955	0.898 *	0.887 *
		qPCR	0.993	1.006	1.039	0.959
NM_053988	Calbindin2 (<i>Calb2</i>)	Array	0.856	0.665	0.449 ***	0.264 ***
		qPCR	0.909	0.67	0.502 **	0.253 ***
NM_031561	Cd36 molecule (thrombospondin receptor) (<i>Cd36</i>)	Array	1.135	1.400 *	1.936 ***	2.525 ***
		qPCR	1.002	1.256	1.884 ***	2.349 ***
NM_017286	Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (<i>Cyp11a1</i>)	Array	1.075	1.626 **	3.204 ***	6.023 ***
		qPCR	1.24	1.797 ***	3.624 ***	6.476 ***
NM_012753	Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1 (<i>Cyp17a1</i>)	Array	0.913	1.252	2.085 ***	4.554 ***
		qPCR	1.104	1.45	2.620 ***	5.926 ***
U09540	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (<i>Cyp1b1</i>)	Array	1.067	1.364**	1.754 ***	2.135 ***
		qPCR	1.081	1.302 *	1.882 ***	2.490 ***
NM_001013137	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14 (<i>Cxcl14</i>)	Array	1.188	1.221	2.158 ***	3.786 ***
		qPCR	1.086	1.234	1.858 ***	3.194 ***
NM_057197	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial (<i>Decr1</i>)	Array	1.138	1.316 **	1.886 ***	2.076 ***
		qPCR	1.132	1.297 **	1.710 ***	1.972 ***
NM_001012345	Diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (<i>Dgat2</i>)	Array	0.870*	0.975	0.850**	0.833**
		qPCR	0.972	0.895	0.903**	0.862***
NM_078623	Enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial (<i>Echs1</i>)	Array	1.116	1.256 **	1.635 ***	2.022 ***
		qPCR	1.118	1.204 *	1.711 ***	2.068 ***
NM_001004223	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (<i>Eef1g</i>)	Array	0.906*	0.968	0.883**	0.830***
		qPCR	0.992	0.912	0.954	0.948
NM_017004	Esterase 2 (<i>Es2</i>)	Array	0.729	0.491 **	0.458 **	0.270 ***
		qPCR	0.714	0.461 **	0.435 ***	0.256 ***
NM_017006	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (<i>G6pdx</i>)	Array	1.067	1.280 *	1.909 ***	2.940 ***
		qPCR	1.07	1.233 **	1.944 ***	3.209 ***
NM_017268	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble) (<i>Hmgcs1</i>)	Array	1.079	1.079	1.107	1.732 ***
		qPCR	1.129	1.011	0.949	1.116
NM_012582	Haptoglobin (<i>Hp</i>)	Array	1.239	1.551 **	2.328 ***	2.682 ***
		qPCR	1.177	1.512 *	2.583 ***	3.023 ***

NM_001007719	Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (<i>Hsd3b1</i>)	Array	1.016	1.162	2.094 ***	4.420 ***
		qPCR	1.099	1.264	2.324 ***	4.300 ***
NM_053539	Isopentenyl-diphosphate D-isomerase (<i>Idi1</i>)	Array	1.042	0.995	1.053	1.421 ***
		qPCR	0.996	0.916	0.861 *	0.846 **
NM_012588	Insulin-like growth factor binding protein 3 (<i>Igfbp3</i>)	Array	1.117	1.005	0.785	0.491***
		qPCR	1.008	1.019	0.782	0.501 ***
NM_001004274	Insulin-like growth factor binding protein 4 (<i>Igfbp4</i>)	Array	1.386	2.153 ***	4.140 ***	7.868 ***
		qPCR	1.317	1.946 **	4.036 ***	8.021 ***
NM_017061	Lysyl oxidase (<i>Lox</i>)	Array	0.945	1.058	1.447	3.050 ***
		qPCR	1.048	1.113	1.258 *	1.996 ***
ENSRNOT00000023329	Malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial (<i>Me3</i>)	Array	1.249 *	1.374 ***	1.920 ***	1.785 ***
		qPCR	1.321 **	1.352 **	1.916 ***	1.877 ***
NM_001008314	Makorin ring finger protein 2 (<i>Mktn2</i>)	Array	0.962	0.880 *	0.881 *	0.820 **
		qPCR	1.017	1.007	1.037	0.989
XM_213773	M-phase phosphoprotein 9 (<i>MPhosph9</i>)	Array	0.882 *	0.982	0.909	0.886 *
		qPCR	1.021	0.943	0.888 *	0.860 **
NM_017226	Peptidyl arginine deiminase, type II (<i>Padi2</i>)	Array	0.973	1.082	1.175	3.573 ***
		qPCR	1.04	0.937	1.003	3.294 ***
NM_022540	Peroxiredoxin 3 (<i>Prdx3</i>)	Array	1.075	1.241 **	1.753 ***	2.335 ***
		qPCR	1.10	1.266 *	1.763 ***	2.100 ***
NM_145780	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4 (<i>Psg4</i>)	Array	0.903 *	0.985	0.890 *	0.912
		qPCR	1.032	1.049	1.072	1.044
ENSRNOT00000025372	Solute carrier family 16, member 11 (monocarboxylic acid transporter 11) (<i>Scl16a11</i>)	Array	1.403 *	1.767 ***	2.532 ***	3.331 ***
		qPCR	1.365	1.304	2.016 ***	2.865 ***
NM_031558	Steroidogenic acute regulatory protein (<i>Star</i>)	Array	1.241	1.117	2.506 ***	4.977 ***
		qPCR	1.178	1.183	2.792 ***	5.273 ***
NM_022230	Stanniocalcin 2 (<i>Stc2</i>)	Array	1.359	2.253 *	4.235 ***	13.076 ***
		qPCR	1.197	1.883 *	3.074 ***	11.971 ***
NM_001024790	Ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated) (<i>Usp7</i>)	Array	0.917	0.841	0.716 *	0.638**
		qPCR	0.86	1.008	0.93	0.93

Fig. S1. Comparaison des cinq principaux processus biologiques affectés à chaque niveau de dose, sur la base des listes de gènes différentiellement exprimés après traitement au flutamide. p -value ≤ 0.05 (Fisher test, Ingenuity Pathways Analysis)

0.2 mg/kg/day	Number of genes	1.0 mg/kg/day	Number of genes
Glycerolipid Metabolism	2	Fatty Acid Metabolism	8
		Metabolism of Xenobiotics by Cytochrome P450	6
		LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	7
		Arachidonic Acid Metabolism	5
		Tryptophan Metabolism	5
6.0 mg/kg/day	Number of genes	30.0 mg/kg/day	Number of genes
Fatty Acid Metabolism	21	Fatty Acid Metabolism	38
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	25	LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	27
Metabolism of Xenobiotics by Cytochrome P450	19	Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	18
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	13	Butanoate Metabolism	16
Xenobiotic Metabolism Signaling	27	Glutathione Metabolism	16

Tableau S3. Effets du flutamide sur le poids corporel absolu, le poids du foie, des organes sexuels, des tissus accessoires, et sur le niveau de testostérone plasmatique. Les moyennes des données \pm écart-type sont présentées dans ce tableau, sur la base de 15 animaux/groupe. Le poids des testicules et des épидидymes représente la moyenne des organes gauche et droit. * p -value $\leq 0,05$, ** p -value $\leq 0,01$ (analyses statistiques effectuées selon Kennel *et al.*, 2004).

	Flutamide				
	Control	0.2 mg/kg/d	1 mg/kg/d	6 mg/kg/d	30 mg/kg/d
Body weight (g)					
Initial	263 \pm 10	262 \pm 11	262 \pm 12	262 \pm 10	264 \pm 7
Terminal	417 \pm 29	417 \pm 29	418 \pm 21	413 \pm 26	401 \pm 26
Absolute organ weight (g)					
Liver	14.73 \pm 1.34	14.90 \pm 1.82	14.81 \pm 1.53	15.02 \pm 1.28	16.75 \pm 1.18**
Testis	1.83 \pm 0.11	1.78 \pm 0.14	1.78 \pm 0.24	1.85 \pm 0.23	1.98 \pm 0.52
Epididymis	0.52 \pm 0.04	0.48 \pm 0.03	0.48 \pm 0.07	0.40 \pm 0.04**	0.37 \pm 0.05**
Prostate	0.44 \pm 0.12	0.39 \pm 0.09	0.38 \pm 0.15	0.29 \pm 0.07**	0.21 \pm 0.05**
Seminal Vesicle	1.39 \pm 0.30	1.29 \pm 0.32	1.13 \pm 0.26*	0.90 \pm 0.22**	0.55 \pm 0.19**
Adrenal glands	0.05 \pm 0.005	0.05 \pm 0.009	0.05 \pm 0.007	0.05 \pm 0.008	0.06 \pm 0.011*
Pituitary glands	0.01 \pm 0.003	0.01 \pm 0.002	0.01 \pm 0.002	0.01 \pm 0.002	0.01 \pm 0.002
Plasma testosterone levels (ng/mL)	2.77 \pm 2.34	4.00 \pm 3.92	3.81 \pm 2.96	9.56 \pm 6.15**	29.58 \pm 12.94**

Annexes : données supplémentaires miARN/Flutamide

Tableau : Liste des gènes cibles potentiels des miARN différentiellement exprimés après traitement au flutamide à la forte dose (30 mg/kg/jour), identifiés à partir de données *in silico* et expérimentales. Les cibles potentielles des miARN différentiellement exprimés ont été prédites à l'aide d'une analyse bioinformatique par algorithmes, TargetScan. Cette liste a été comparée à celle précédemment établie grâce aux puces d'expression du génome testiculaire pour la même dose. Parmi les gènes en commun, seuls ont été considérés ceux présentant une dérégulation inverse à celle du miARN régulant leur expression. Cette analyse a ainsi permis l'identification de 29 cibles répondant à ces critères :

ID	Symbol	Entrez Gene Name
A_44_P400147	ADD3	adducin 3 (gamma)
A_44_P345009	BAG5	BCL2-associated athanogene 5
A_44_P1015069	BTBD9	BTB (POZ) domain containing 9
A_42_P711741	CAPZB	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta
A_44_P508264	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
A_44_P165870	CDO1	cysteine dioxygenase, type I
A_44_P411635	CNOT4	CCR4-NOT transcription complex, subunit 4
A_44_P417051	DCUN1D3	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 3 (S. cerevisiae)
A_43_P15649	DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2
A_43_P19497	EPS15	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
A_44_P835214	KLHL24	kelch-like 24 (Drosophila)
A_44_P254283	MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3
A_44_P883154	MATR3	matrin 3
A_44_P268864	MGLL	monoglyceride lipase
A_44_P448083	MKRN2	makorin ring finger protein 2
A_44_P384937	MTERFD2	MTERF domain containing 2
A_44_P263957	OXR1	oxidation resistance 1
A_44_P538381	PPP1R12A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A
A_44_P451638	Ppp1r9a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A
A_44_P999869	PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
A_44_P219481	RABEP1	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1
A_44_P272035	SEN2	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2
A_44_P381906	SLK	STE20-like kinase
A_43_P21605	TARSL2	threonyl-tRNA synthetase-like 2
A_43_P10591	TCEA1	transcription elongation factor A (SII), 1
A_43_P15023	THBD	thrombomodulin
A_44_P461989	WDR78	WD repeat domain 78
A_44_P524911	WNT2	wingless-type MMTV integration site family member 2
A_42_P755052	ZFP91	zinc finger protein 91 homolog (mouse)

Annexes : Article 2

Tableau S1. Changements histopathologiques testiculaires fonction de la dose, après exposition répétée au 1,3-dinitrobenzène. Les données représentent le nombre d'animaux atteints dans chaque groupe, sur la base de 10 animaux/groupe.

INCIDENCE AND SEVERITY OF MICROSCOPIC CHANGES IN THE TESTIS					
Dose group (mg/kg/day)	0	0.1	1	4	8
Number examined	10	10	10	10	10
Germ cell degeneration/depletion					
Slight	0	0	0	8	0
Moderate	0	0	0	1	0
Marked	0	0	0	0	10
Total	0	0	0	9	10
Multinucleated giant spermatids					
Minimal	0	0	0	7	1
Slight	0	0	0	0	8
Moderate	0	0	0	0	1
Total	0	0	0	7	10
Sertoli cell vacuolation					
Minimal	0	0	0	8	0
Slight	0	0	0	1	4
Moderate	0	0	0	0	5
Marked	0	0	0	0	1
Total	0	0	0	9	10

Tableau S2. Comparaison des données issues de puces à ADN *versus* celles obtenues par RT-qPCR, pour une sélection de gènes modulés après exposition répétée au 1,3-dinitrobenzène. Les valeurs d'expression génique (qPCR) ont été normalisées à la β -actine. Les données de fold-change ont été calculées par rapport à la valeur moyenne du groupe contrôle (véhicule). * p -value ≤ 0.05 ; ** p -value ≤ 0.01 , *** p -value $\leq 0,001$ (9-10 animaux/groupe ; one-way ANOVA)

GenBank	Gene Description (gene symbol)		DNB (mg/kg/day)		
			0.1	1	4
NM_001033670	Bcl2-like 1	Array	0.94	0.97	0.69***
	<i>(Bcl2l1)</i>	qPCR	0.99	0.96	0.60***
NM_031775	caspase 6 <i>(Casp6)</i>	Array	1.04	1.06	1.29**
		qPCR	0.97	1.02	1.24
NM_012747	signal transducer and activator of transcription 3 <i>(Stat3)</i>	Array	1.01	1.07	1.35***
		qPCR	0.97	1.00	1.16*
NM_058208	suppressor of cytokine signaling 2 <i>(Socs2)</i>	Array	0.86	0.859	0.47***
		qPCR	0.92	0.94	0.39***
NM_017019	interleukin 1 alpha <i>(Il1a)</i>	Array	1.37	1.28	2.74**
		qPCR	1.09	1.03	2.07***
NM_030858	MAD homolog 7 <i>(Smad7)</i>	Array	1.05	1.12	1.26***
		qPCR	0.90	0.99	0.94
NM_012671	transforming growth factor alpha <i>(Tgfa)</i>	Array	1.04	1.11	0.38***
		qPCR	0.99	1.00	0.38***
NM_181086	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a <i>(Tnfrsf12a)</i>	Array	1.07	1.20	3.67***
		qPCR	0.94	1.05	4.60***
NM_022391	pituitary tumor transforming 1 <i>(Pttg1)</i>	Array	1.00	0.98	0.47***
		qPCR	1.04	0.98	0.28***
NM_012548	endothelin 1 <i>(Edn1)</i>	Array	1.04	1.07	2.77***
		qPCR	0.88	0.91	2.52***
NM_053612	heat shock 22kDa protein 8 <i>(Hspb8)</i>	Array	1.14	0.97	0.48***
		qPCR	1.01	0.99	0.36***
NM_173331	mitogen-activated protein kinase 15 <i>(Mapk15)</i>	Array	1.01	0.98	0.48***
		qPCR	0.95	0.96	0.45***
NM_019334	paired-like homeodomain transcription factor 2 <i>(Pitx2)</i>	Array	1.03	1.00	0.38***
		qPCR	0.87	0.95	0.36***
NM_019296	cell division cycle 2 homolog A <i>(Cdc2a)</i>	Array	0.97	0.96	0.63***
		qPCR	0.94	0.97	0.48***
XM_229115	heat shock protein 1, alpha <i>(Hsp90aa)</i>	Array	0.96	0.91	0.72***
		qPCR	1.01	1.02	0.66***
NM_019349	serine/threonine kinase 2 <i>(Sik)</i>	Array	0.99	1.03	1.38***
		qPCR	1.00	1.02	1.19***

NM_00102541	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, beta isoform <i>(Ppp2r1b)</i>	Array	1.01	0.97	0.71***
		qPCR	1.02	0.96	0.65***
NM_00102474	cell division cycle 16 homolog <i>(Cdc16)</i>	Array	0.95	0.95	0.79***
		qPCR	0.95	1.00	0.69***
NM_031683	structural maintenance of chromosomes 1A <i>(Smc11)</i>	Array	0.99	1.00	1.21***
		qPCR	1.09	1.19	1.36*
NM_171993	cell division cycle 20 homolog <i>(Cdc20)</i>	Array	1.01	1.02	0.78***
		qPCR	0.96	0.99	0.61***
NM_017100	polo-like kinase 1 <i>(Plk1)</i>	Array	0.99	0.98	0.77***
		qPCR	1.02	0.96	0.65***
NM_031821	polo-like kinase 2 <i>(Plk2)</i>	Array	1.06	1.06	1.45***
		qPCR	1.00	0.99	1.11
NM_021752	baculoviral IAP repeat-containing 2 <i>(Birc2)</i>	Array	1.06	1.01	0.72***
		qPCR	1.06	0.92	0.51***
NM_001013434	RAS viral oncogene homolog 2 <i>(Rras2)</i>	Array	1	1.02	1.33***
		qPCR	1.08	0.99	1.04
NM_001007689	cytokine induced apoptosis inhibitor 1 <i>(Ciapin1)</i>	Array	1.09	0.96	0.69***
		qPCR	0.99	0.94	0.47***
NM_173837	bcl-2 binding component 3 <i>(Bbc3)</i>	Array	1.01	1.09	1.88***
		qPCR	0.97	0.96	1.29*
NM_057138	Casp8 and FADD-like apoptosis regulator <i>(cFlar)</i>	Array	0.90	0.96	1.21*
		qPCR	1.02	1.04	1.06
NM_013091	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a <i>(Tnfrsf1a)</i>	Array	1.00	1.02	1.45**
		qPCR	1.01	1.06	1.36**
NM_080400	Checkpoint kinase 1 homolog <i>(Chk1)</i>	Array	1.04	1.06	1.42***
		qPCR	1.05	1.12	1.2
NM_053593	Cyclin dependent kinase 4 <i>(Cdk4)</i>	Array	1.03	1.02	1.23***
		qPCR	0.99	1.00	1.00

NM_017286	Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 <i>(Cyp11a1)</i>	Array	0.82	1.23	0.90
		qPCR	0.74	1.01	0.87
NM_012753	Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1 <i>(Cyp17a1)</i>	Array	0.80	1.21	1.28
		qPCR	0.81	1.21	1.00
NM_001007719	Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 <i>(Hsd3b1)</i>	Array	1.12	1.13	1.30
		qPCR	1.05	1.08	0.98
NM_031558	Steroidogenic acute regulatory protein <i>(Star)</i>	Array	0.77	1.02	1.07
		qPCR	0.81	0.9	0.81

Tableau S3. Effets d'une administration unique de 1,3-dinitrobenzène sur le poids corporel absolu, le poids du foie, des organes sexuels, et des tissus accessoires. Les moyennes des données \pm écart-type sont présentées dans ce tableau, sur la base de 10 animaux/groupe. Le poids des testicules et épидидymes représente la moyenne des organes gauche et droit. (analyses statistiques effectuées selon Kennel *et al.*, 2004).

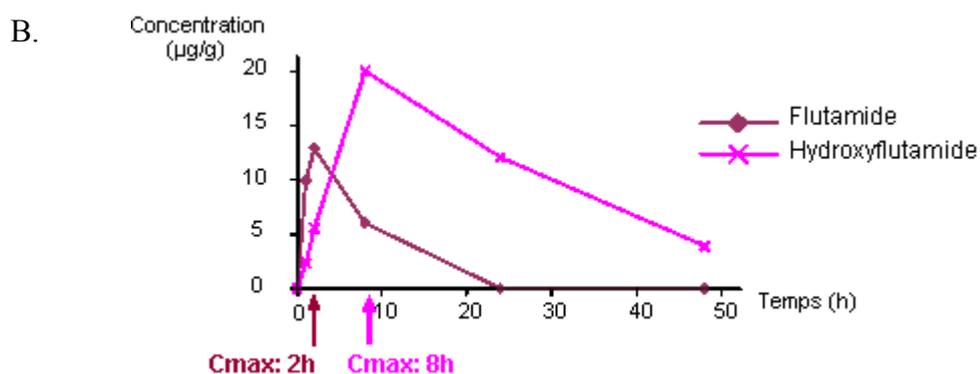
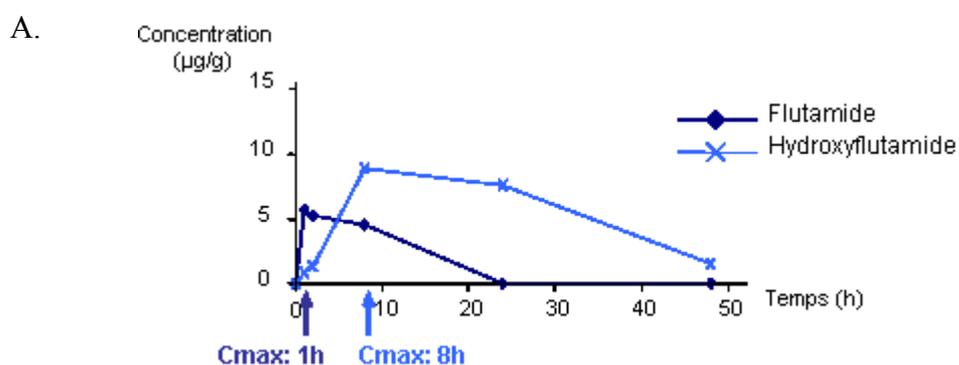
	1,3-Dinitrobenzene (4 mg/kg)							
	Control 8 hours	Treated 8 hours	Control 24 hours	Treated 24 hours	Control 48 hours	Treated 48 hours	Control 72 hours	Treated 72 hours
Body weight (g)								
Initial	399 \pm 17	403 \pm 14	401 \pm 17	402 \pm 20	400 \pm 16	399 \pm 20	395 \pm 14	399 \pm 17
Terminal	406 \pm 16	410 \pm 16	406 \pm 16	405 \pm 19	408 \pm 15	408 \pm 22	407 \pm 18	412 \pm 18
Absolute organ weight (g)								
Liver	14.09 \pm 1.20	13.68 \pm 1.10	13.92 \pm 1.28	14.50 \pm 1.06	14.06 \pm 1.17	14.17 \pm 1.39	14.17 \pm 0.98	14.88 \pm 1.36
Testis	1.73 \pm 0.11	1.75 \pm 0.12	1.68 \pm 0.20	1.80 \pm 0.11	1.77 \pm 0.13	1.71 \pm 0.12	1.73 \pm 0.16	1.70 \pm 0.15
Epididymis	0.50 \pm 0.05	0.48 \pm 0.03	0.47 \pm 0.06	0.49 \pm 0.03	0.50 \pm 0.05	0.50 \pm 0.05	0.50 \pm 0.05	0.50 \pm 0.04
Prostate	0.41 \pm 0.09	0.41 \pm 0.06	0.43 \pm 0.07	0.48 \pm 0.09	0.46 \pm 0.08	0.44 \pm 0.07	0.40 \pm 0.07	0.42 \pm 0.05
Seminal vesicles	1 \pm 0	2 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 0	2 \pm 1	1 \pm 0
Adrenal gland	0.0638 \pm 0.0075	0.0570 \pm 0.0083	0.0544 \pm 0.0093	0.0573 \pm 0.0118	0.0574 \pm 0.0082	0.0538 \pm 0.0079	0.0573 \pm 0.0083	0.0569 \pm 0.0097
Pituitary gland	0.0163 \pm 0.0117	0.0108 \pm 0.0015	0.0126 \pm 0.0064	0.0104 \pm 0.0020	0.0102 \pm 0.0018	0.0102 \pm 0.0017	0.0118 \pm 0.0012	0.0119 \pm 0.0060

Tableau S4. Analyse par qPCR de l'expression de gènes sélectionnés, impliqués dans les voies associées au "Rôle mitotique des Polo-like kinase" et à la stéroïdogénèse, après une exposition unique au 1,3-dinitrobenzène. Le niveau d'expression de sept gènes liés au cycle cellulaire, et quatre gènes liés à la biosynthèse des hormones stéroïdes a été évalué par RT-qPCR dans les échantillons contrôles et traités. Les valeurs d'expression génique ont été normalisées à la β -actine. Les données de fold-change, exprimées en moyenne \pm écart-type, ont été calculées par rapport à un individu du groupe contrôle (véhicule); t-test, * p -value ≤ 0.05 (10 animaux/groupe; t-test non apparié). Les ratios (%) de l'expression génique moyenne groupe traité/groupe contrôle approprié sont également présentés.

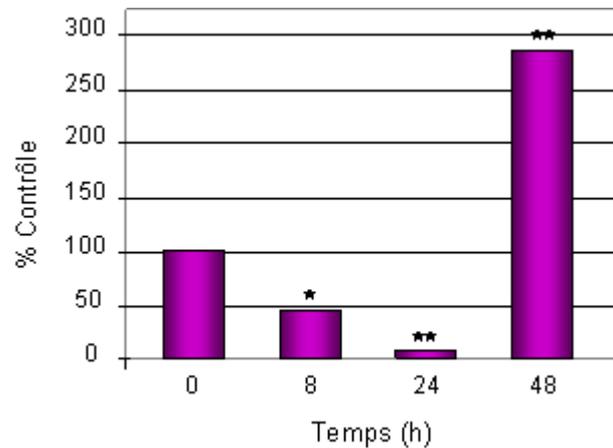
Gene Symbol (gene description)	GenBank	Control 8 hrs	Treated 8 hrs	Ratio 8 hrs	Control 24 hrs	Treated 24 hrs	Ratio 24 hrs	Control 48 hrs	Treated 48 hrs	Ratio 48 hrs	Control 72 hrs	Treated 72 hrs	Ratio 72 hrs
Mitotic Roles of Polo-like Kinases													
Cdc2a (<i>cell division cycle 2 homolog A</i>)	NM_019296	1.002 \pm 0.074	0.953 \pm 0.084	- 4.1	0.979 \pm 0.063	1.103 \pm 0.123	+ 12.7	0.895 \pm 0.076	0.853 \pm 0.099	- 4.7	1.160 \pm 0.084	1.172 \pm 0.105	+ 1.0
Plk1 (<i>polo-like kinase 1</i>)	NM_017100	0.987 \pm 0.037	0.937 \pm 0.080	- 5.1	0.910 \pm 0.097	0.931 \pm 0.074	+ 2.3	0.937 \pm 0.077	0.937 \pm 0.068	+ 1.0	1.187 \pm 0.109	1.184 \pm 0.097	- 0.3
Cdc20 (<i>cell division cycle 20 homolog</i>)	NM_171993	0.968 \pm 0.062	0.942 \pm 0.074	- 2.7	1.009 \pm 0.054	1.048 \pm 0.057	+ 3.9	1.058 \pm 0.065	1.157 \pm 0.112	+ 9.3	1.053 \pm 0.073	1.018 \pm 0.115	- 3.4
Hsp90aa (<i>heat shock protein 1, alpha</i>)	XM_229115	1.037 \pm 0.057	1.029 \pm 0.094	- 0.8	0.956 \pm 0.083	1.055 \pm 0.133	+ 10.4	0.908 \pm 0.076	0.845 \pm 0.089	- 6.9	1.054 \pm 0.077	1.004 \pm 0.073	- 4.8
Pttg1 (<i>pituitary tumor-transforming 1</i>)	NM_022391	1.000 \pm 0.051	0.956 \pm 0.056	- 4.4	0.816 \pm 0.111	0.946 \pm 0.072*	+ 15.9	0.986 \pm 0.054	0.997 \pm 0.076	+ 1.1	0.955 \pm 0.059	0.963 \pm 0.066	+ 0.2
Slk (<i>serine/threonine kinase 2</i>)	NM_019349	1.010 \pm 0.082	1.009 \pm 0.095	+ 1.0	0.898 \pm 0.076	0.980 \pm 0.065	+ 9.1	0.927 \pm 0.053	0.924 \pm 0.063	- 0.3	1.150 \pm 0.110	1.188 \pm 0.152	+ 3.3
Wee1 (<i>wee 1 homolog</i>)	NM_00101274	0.993 \pm 0.057	1.077 \pm 0.067	+ 8.5	0.867 \pm 0.082	0.863 \pm 0.092	- 0.5	1.006 \pm 0.065	0.986 \pm 0.087	- 2.0	1.000 \pm 0.093	0.994 \pm 0.078	- 0.6
Steroidogenesis													
Cyp11a1 (<i>Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1</i>)	NM_017286	0.707 \pm 0.167	0.767 \pm 0.183	+ 8.5	0.958 \pm 0.185	0.780 \pm 0.213	- 18.6	0.939 \pm 0.132	0.862 \pm 0.347	- 8.2	1.068 \pm 0.272	1.178 \pm 0.493	+ 10.3
Cyp17a1 (<i>Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1</i>)	NM_012753	0.623 \pm 0.259	0.666 \pm 0.282	+ 6.9	1.018 \pm 0.221	0.905 \pm 0.370	- 11.1	1.098 \pm 0.307	0.867 \pm 0.222	- 21.0	0.876 \pm 0.234	0.853 \pm 0.373	- 2.6
Hsd3b1 (<i>Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1</i>)	NM_001007719	0.994 \pm 0.172	1.252 \pm 0.418	+ 25.9	1.099 \pm 0.276	0.836 \pm 0.204	- 23.9	0.941 \pm 0.323	1.044 \pm 0.254	+ 10.9	0.831 \pm 0.259	0.994 \pm 0.415	+ 19.6
Star (<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>)	NM_031558	0.829 \pm 0.143	0.803 \pm 0.224	- 3.2	1.005 \pm 0.234	0.777 \pm 0.202	- 22.7	0.975 \pm 0.138	0.672 \pm 0.046	- 31.1	1.113 \pm 0.310	1.152 \pm 0.323	+ 3.5

Annexes : Etude aigüe flutamide

1. Niveau de flutamide et d'hydroxyflutamide plasmatique et testiculaire 1 à 48 heures après une administration unique de flutamide à 150 mg/kg. La concentration maximale (C_{max}) du flutamide et de l'hydroxyflutamide plasmatique (A) est mesurée à 1 et 8 heures, respectivement ; le C_{max} du flutamide et de l'hydroxyflutamide testiculaire (B) est mesurée à 2 et 8 heures, respectivement.



2. Niveau de testostérone plasmatique à 8, 24 et 48 heures, après une seule administration de flutamide à 150 mg/kg. Les résultats sont présentés en pourcentage, rapportés au groupe contrôle approprié pour chaque temps (t-test ; * p -value ≤ 0.05 , ** p -value ≤ 0.01).



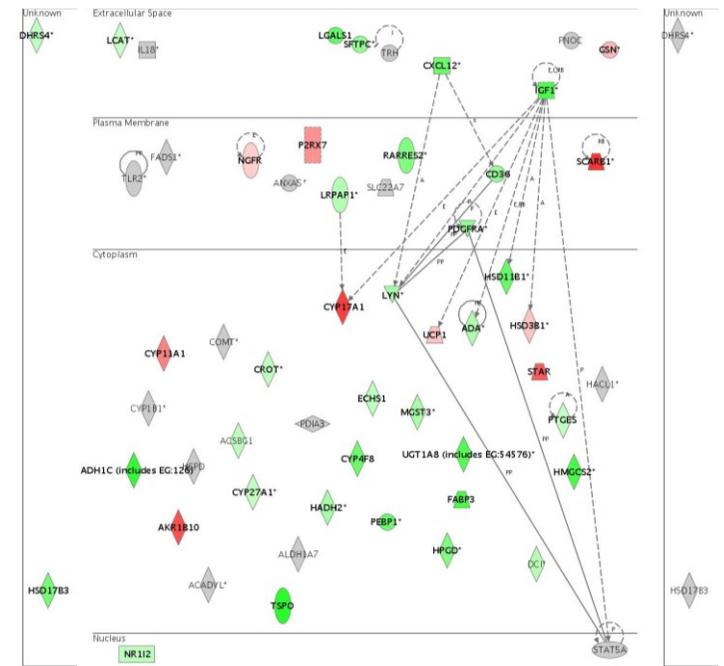
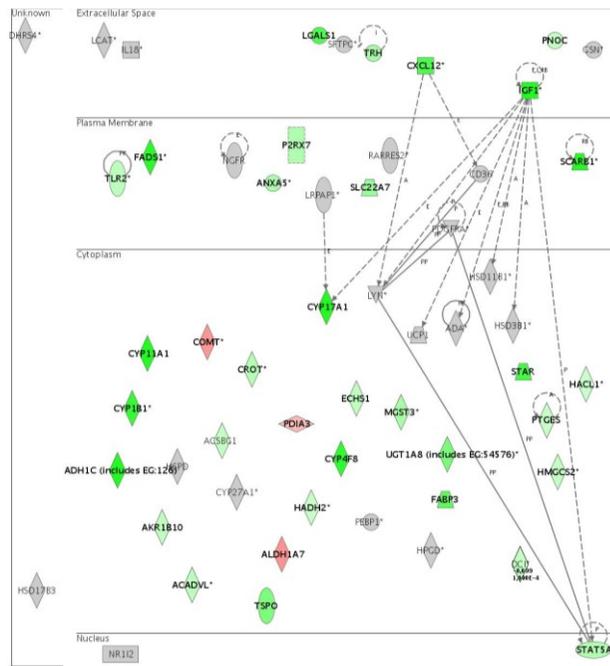
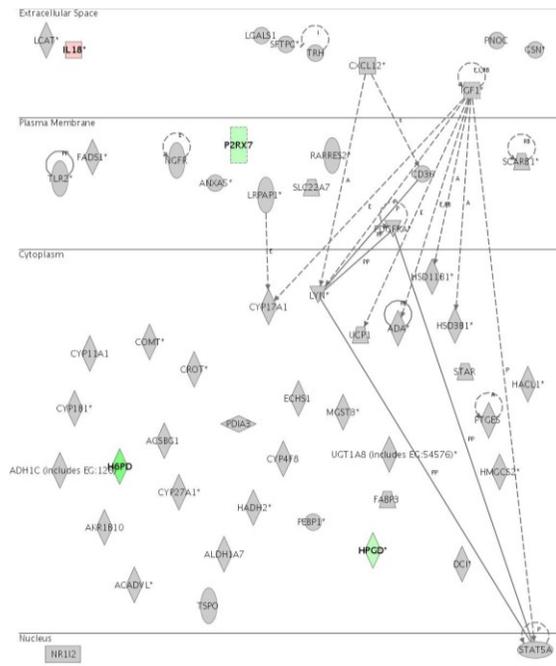
3. Transcrits impliqués dans le métabolisme des lipides, dont le niveau d'accumulation est modulé après une administration unique de flutamide à 150 mg/kg. L'intensité de coloration des transcrits indique le degré de sur- (rouge) ou de sous-accumulation (vert). Les transcrits en gris correspondent aux gènes présents sur la puce, mais ne répondant pas aux critères de sélection. Les transcrits en gras correspondent aux "focus gene". Les flèches représentent les relations rapportées dans la littérature, entre les différents gènes/produits de gènes.

Métabolisme des lipides

8h

24h

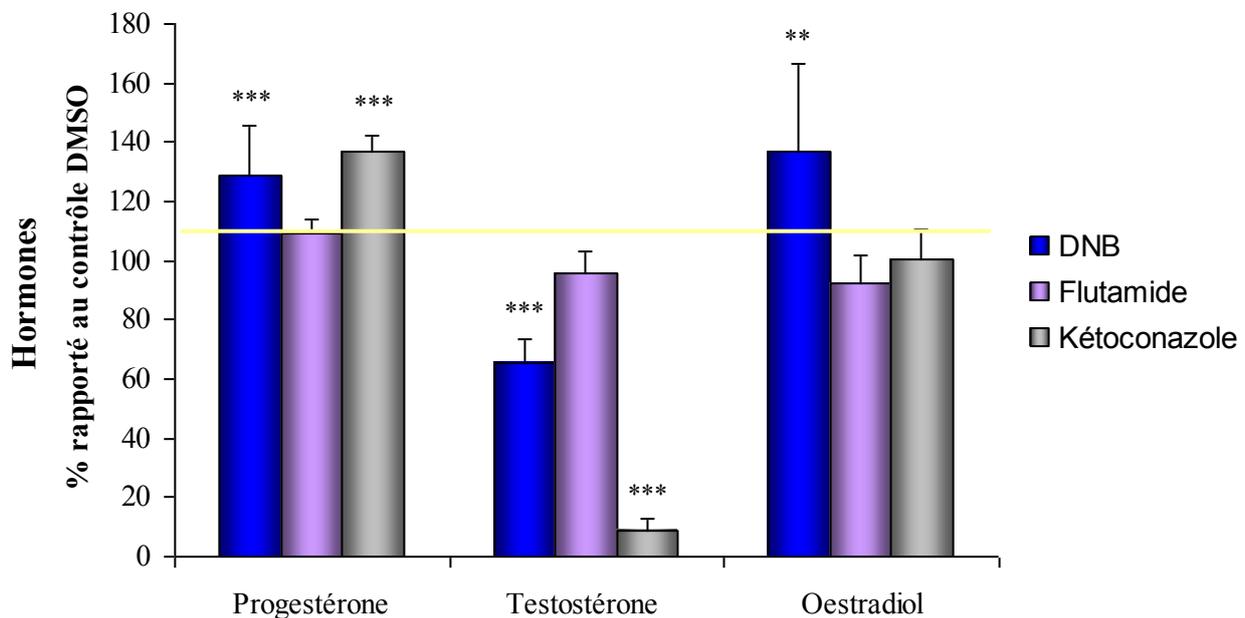
48h



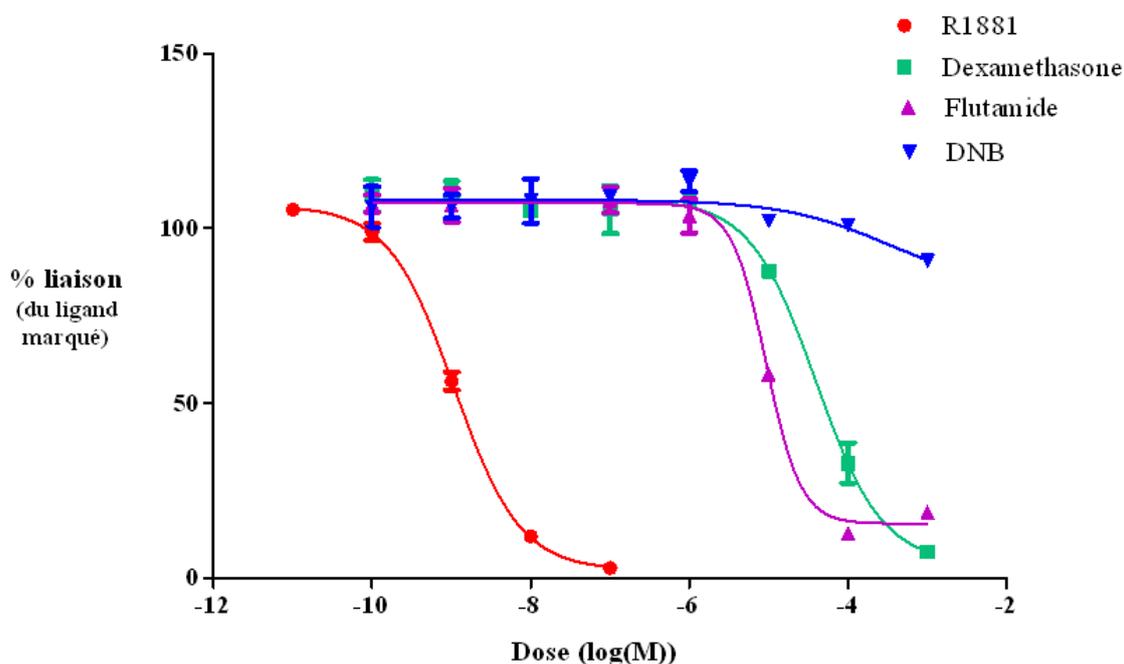
On constate qu'à 8 heures, très peu de transcrits participant à cette voie métabolique sont modulés. A 24 heures, pratiquement tous les transcrits modulés sont sous-accumulés, et à 48 heures, seuls quelques transcrits de cette voie sont sur-accumulés. Parmi les transcrits dont le niveau d'accumulation est modulé après une seule administration de flutamide, on retrouve Cyp17a1, Cyp11a1, Star et Scarb1. Ceux-ci sont sous-accumulés à 24 heures, alors qu'ils sont sur-accumulés à 48 heures, ainsi qu'après 28 jours de traitement. Le profil d'accumulation des transcrits Cyp17a1, Cyp11a1 participant à la biosynthèse de la testostérone, et de Star et Scarb1 codant pour des protéines de transport du cholestérol, corrobore donc le profil du niveau de testostérone plasmatique mesuré aux différents temps de sacrifice. Ces observations supposent que ces transcrits soient des gènes clefs, modulés dans un premier temps pour répondre au besoin de la cellule. On peut supposer que les autres transcrits, retrouvés sous-accumulés à 48 heures malgré l'induction de la synthèse de la testostérone, soient induits plus tardivement pour répondre à l'effet du flutamide.

Annexes : Études *in vitro* associées à un programme de criblage des perturbateurs endocriniens

1. Potentiels de perturbateur endocrinien concernant nos deux composés d'intérêt, le 1,3-dinitrobenzène (DNB) et le flutamide, sur la base du test H295R. Effets du DNB et du flutamide sur la production de testostérone, progestérone et œstradiol dans les cellules humaines de carcinome corticosurrénalien après un traitement de 48 heures. Les résultats se rapportant aux concentrations les plus fortes précédant la cytotoxicité sont présentés : DNB, 50 μM ; Flutamide 1 μM ; Kétoconazole (contrôle inhibant la synthèse de testostérone) : 1 μM . Les données (concentration des stéroïdes dans le milieu conditionné, moyenne de trois expériences indépendantes) sont exprimées en variations relatives (%) \pm écart-type, rapportées au contrôle DMSO (t-test ; ** p -value ≤ 0.01 , *** p -value ≤ 0.001).

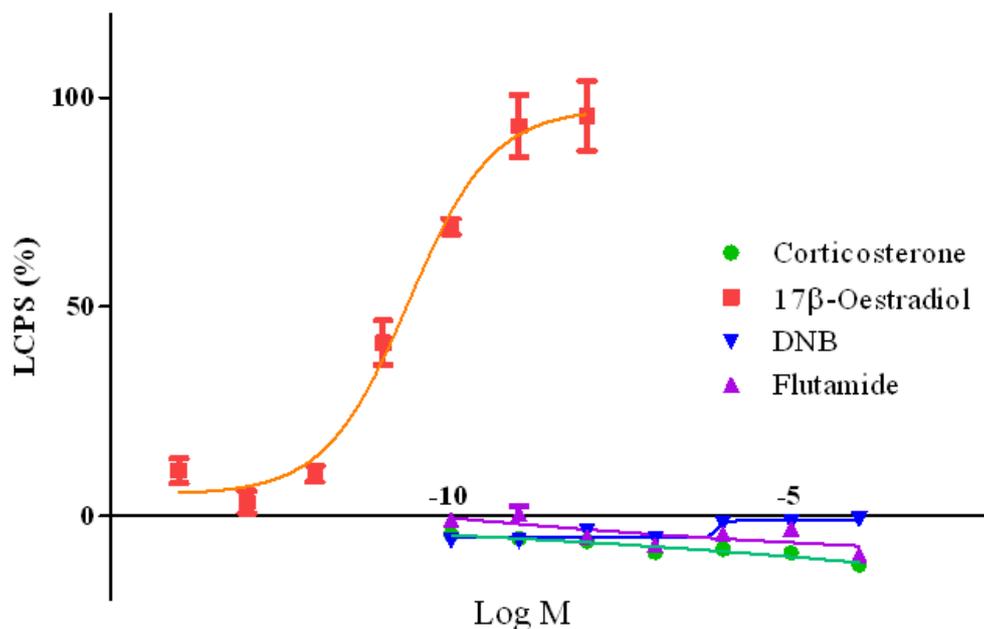


2. Potentiels de perturbateur endocrinien concernant nos deux composés d'intérêt, le 1,3-dinitrobenzène (DNB) et le flutamide, sur la base du test de liaison au récepteur aux androgènes. La liaison du DNB ou du flutamide au récepteur aux androgènes a été évaluée et comparée à celle de contrôles positifs (faible : dexaméthasone ; fort : R1881). Le principe général de l'expérience est basé sur l'étude de la compétition entre la molécule testée non radiomarquée, et un androgène standard radiomarqué (au tritium) pour le récepteur. Dans ces essais de liaison au récepteur, la fixation de la molécule testée non radiomarquée est démontrée par sa capacité à réduire la quantité d'androgènes de référence radiomarqués, à se lier aux récepteurs à la fin de la période d'incubation. Plus la substance d'intérêt présentera une forte affinité pour le récepteur aux androgènes, moins la substance marquée se fixera. La radioactivité mesurée sera donc inversement proportionnelle à l'affinité de la substance d'intérêt. Les résultats (duplicats), fonction de la concentration (en M), sont présentés sous forme de ratio (%), rapportés au contrôle DMSO.



	R1881	Dexamethasone	Flutamide	DNB
Bottom	2.361	4.308	15.61	/
Top	106.5	108.3	107.2	/
LogIC50	-8.894	-4.304	-4.921	/
Hillslope	-1.048	-1.048	-1.994	/
IC50	1.276e-009	4.967e-005	1.199e-005	/

3. Potentiels de perturbateur endocrinien concernant nos deux composés d'intérêt, le 1,3-dinitrobenzène (DNB) et le flutamide, sur la base du test d'activation transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes. La liaison ainsi que l'activation du récepteur aux œstrogènes par le DNB ou le flutamide, ont été évaluées et comparées à celles de contrôles (positif : 17 β -œstradiol ; négatif : corticostérone). Le principe général de l'expérience est le suivant : l'exposition à une molécule active possédant une affinité pour le récepteur hormonal induit *in fine* une activation de la transcription, et l'expression du gène rapporteur. La cellule va donc synthétiser la luciférase dans notre cas, qui est mise en évidence par une mesure de luminescence après ajout de substrats adéquats. Ainsi, les substances à effet agoniste vont stimuler cette émission de lumière de manière dose-dépendante. Les résultats (triplicats), normalisés au contrôle DMSO, sont présentés en fonction du logarithme de la concentration (M) sous forme de ratio (%LCPS : % luminescence count per second), rapportés au contrôle positif 17 β -œstradiol à 1 nM.



17 β -Oestradiol

Bottom	5.092
Top	97.40
LogEC50	-10.62
HillSlope	0.7048
EC50	2.415e-011

BIBLIOGRAPHIE

1. Adams, N.R., *Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle*. J Anim Sci, 1995. 73(5): p. 1509-15.
2. Marty, M.S., E.W. Carney, and J.C. Rowlands, *Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing*. Toxicol Sci, 2010. 120 Suppl 1: p. S93-108.
3. Colborn, T., M. Smolen, and R. Rolland, *Taking a lead from wildlife*. Neurotoxicol Teratol, 1996. 18(3): p. 235-7; discussion 271-6.
4. McLachlan, J.A., R.R. Newbold, and B. Bullock, *Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol*. Science, 1975. 190(4218): p. 991-2.
5. Newbold, R.R., E. Padilla-Banks, and W.N. Jefferson, *Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations*. Endocrinology, 2006. 147(6 Suppl): p. S11-7.
6. Hunter, D.J. and K.T. Kelsey, *Pesticide residues and breast cancer: the harvest of a silent spring?* J Natl Cancer Inst, 1993. 85(8): p. 598-9.
7. Carlsen, E., et al., *Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years*. Bmj, 1992. 305(6854): p. 609-13.
8. Skakkebaek, N.E., E. Rajpert-De Meyts, and K.M. Main, *Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects*. Hum Reprod, 2001. 16(5): p. 972-8.
9. Davis, D.L., et al., *Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer*. Environ Health Perspect, 1993. 101(5): p. 372-7.
10. Barlow, S., et al., *Teratology Society Public Affairs Committee position paper: developmental toxicity of endocrine disruptors to humans*. Teratology, 1999. 60(6): p. 365-75.
11. Sumpter, J.P., *Feminized responses in fish to environmental estrogens*. Toxicol Lett, 1995. 82-83: p. 737-42.
12. Groff, T., *Bisphenol A: invisible pollution*. Curr Opin Pediatr, 2010. 22(4): p. 524-9.
13. Adamopoulos, D.A., et al., *Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977-1993*. Hum Reprod, 1996. 11(9): p. 1936-41.
14. Auger, J., et al., *Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years*. N Engl J Med, 1995. 332(5): p. 281-5.
15. de Mouzon, J., et al., *Declining sperm count. Semen quality has declined among men born in France since 1950*. Bmj, 1996. 313(7048): p. 43; author reply 44-5.
16. Irvine, S., et al., *Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years*. Bmj, 1996. 312(7029): p. 467-71.
17. Nelson, C.M. and R.G. Bunge, *Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential*. Fertil Steril, 1974. 25(6): p. 503-7.
18. Adami, H.O., et al., *Testicular cancer in nine northern European countries*. Int J Cancer, 1994. 59(1): p. 33-8.
19. Backlin, B.M., L. Eriksson, and M. Olovsson, *Histology of uterine leiomyoma and occurrence in relation to reproductive activity in the Baltic gray seal (Halichoerus grypus)*. Vet Pathol, 2003. 40(2): p. 175-80.

20. Bredhult, C., et al., *Study of the relation between the incidence of uterine leiomyomas and the concentrations of PCB and DDT in Baltic gray seals*. *Reprod Toxicol*, 2008. 25(2): p. 247-55.
21. Guillette, L.J., Jr., et al., *Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida*. *Environ Health Perspect*, 1994. 102(8): p. 680-8.
22. Guillette, L.J., Jr., et al., *Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment*. *Gen Comp Endocrinol*, 1996. 101(1): p. 32-42.
23. Gunderson, M.P., et al., *Variation in sex steroids and phallus size in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) collected from 3 sites within the Kissimmee-Everglades drainage in Florida (USA)*. *Chemosphere*, 2004. 56(4): p. 335-45.
24. Harrison, P.T., P. Holmes, and C.D. Humfrey, *Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?* *Sci Total Environ*, 1997. 205(2-3): p. 97-106.
25. Reijnders, P.J., *Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters*. *Nature*, 1986. 324(6096): p. 456-7.
26. WHO, *Global assessment of the state-of-science of endocrine disruptors*. IPCS (International Programme on Chemical Safety), 2002.
27. Hiller-Sturmhofel, S. and A. Bartke, *The endocrine system: an overview*. *Alcohol Health Res World*, 1998. 22(3): p. 153-64.
28. Chey, W.Y. and T.M. Chang, *Secretin, 100 years later*. *J Gastroenterol*, 2003. 38(11): p. 1025-35.
29. MedicineNet, *The Endocrine System*, in http://images.medicinenet.com/images/illustrations/endocrine_system.jpg, endocrine_system.jpg, Editor. 2007.
30. Nussey, S. and S. Whitehead, *Endocrinology: An Integrated Approach*. Taylor & Francis Group ed, ed. A. Boshier. 2001, London.
31. Cassone, V.M., et al., *Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms*. *J Biol Rhythms*, 1993. 8 Suppl: p. S73-81.
32. Schuster, C., *[Sites and mechanisms of action of melatonin in mammals: the MT1 and MT2 receptors]*. *J Soc Biol*, 2007. 201(1): p. 85-96.
33. Reiter, R.J., et al., *Melatonin and reproduction revisited*. *Biol Reprod*, 2009. 81(3): p. 445-56.
34. Reiter, R.J., D.X. Tan, and L. Fuentes-Broto, *Melatonin: a multitasking molecule*. *Prog Brain Res*, 2010. 181: p. 127-51.
35. Barrenetxe, J., P. Delagrange, and J.A. Martinez, *Physiological and metabolic functions of melatonin*. *J Physiol Biochem*, 2004. 60(1): p. 61-72.
36. Ravindra, T., N.K. Lakshmi, and Y.R. Ahuja, *Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer*. *Indian J Med Sci*, 2006. 60(12): p. 523-35.
37. Mediavilla, M.D., et al., *Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin*. *Curr Med Chem*, 2010. 17(36): p. 4462-81.
38. Guillemin, R., *Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors*. *J Endocrinol*, 2005. 184(1): p. 11-28.
39. Wells, S. and D. Murphy, *Transgenic studies on the regulation of the anterior pituitary gland function by the hypothalamus*. *Front Neuroendocrinol*, 2003. 24(1): p. 11-26.
40. Counis, R., et al., *Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function*. *Reprod Nutr Dev*, 2005. 45(3): p. 243-54.

41. Harrison, G.S., et al., *Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2004. 11(4): p. 725-48.
42. Lohmeier, T.E., *Neurohypophysial hormones*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 285(4): p. R715-7.
43. Valiquette, G., *The neurohypophysis*. *Neurol Clin*, 1987. 5(2): p. 291-331, vi-vii.
44. *Physiologie Humaine*. Flammarion Médecine - Sciences ed. Vol. 2e édition. 1983, Paris. 335-469.
45. Marieb, E., *Anatomie et Physiologie humaines*. Vol. 2e édition. 1993, Saint-Laurent (Canada): De Boeck Université. 547-551.
46. Don, J. and G. Stelzer, *The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis*. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. 187(1-2): p. 115-24.
47. O'Shea, P.J. and G.R. Williams, *Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice*. *J Endocrinol*, 2002. 175(3): p. 553-70.
48. Roman, R.M., *The physiology of the thyroid gland*. *Ear Nose Throat J*, 1985. 64(7): p. 334-6.
49. Wagner, M.S., S.M. Wajner, and A.L. Maia, *Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis?* *Microsc Res Tech*, 2009. 72(11): p. 796-808.
50. Maran, R.R., *Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis*. *Arch Androl*, 2003. 49(5): p. 375-88.
51. Inzerillo, A.M., M. Zaidi, and C.L. Huang, *Calcitonin: the other thyroid hormone*. *Thyroid*, 2002. 12(9): p. 791-8.
52. de Paula, F.J. and C.J. Rosen, *Back to the future: revisiting parathyroid hormone and calcitonin control of bone remodeling*. *Horm Metab Res*, 2010. 42(5): p. 299-306.
53. Talmage, R.V. and H.T. Mobley, *Calcium homeostasis: reassessment of the actions of parathyroid hormone*. *Gen Comp Endocrinol*, 2008. 156(1): p. 1-8.
54. Rosol, T.J., et al., *Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity*. *Toxicol Pathol*, 2001. 29(1): p. 41-8.
55. Kemppainen, R.J. and E.N. Behrend, *Adrenal physiology*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1997. 27(2): p. 173-86.
56. Connell, J.M. and E. Davies, *The new biology of aldosterone*. *J Endocrinol*, 2005. 186(1): p. 1-20.
57. Buckingham, J.C., *Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking*. *Br J Pharmacol*, 2006. 147 Suppl 1: p. S258-68.
58. Kvetnansky, R., E.L. Sabban, and M. Palkovits, *Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches*. *Physiol Rev*, 2009. 89(2): p. 535-606.
59. Young, J., Landsberg, L., *Catecholamines and the adrenal medulla*. In: Williams Textbook of Endocrinology. 1998, Philadelphia: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. p. 665-728.
60. Engelking, L.R., *Physiology of the endocrine pancreas*. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 1997. 12(4): p. 224-9.
61. Andrali, S.S., et al., *Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells*. *Biochem J*, 2008. 415(1): p. 1-10.
62. Quesada, I., et al., *Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes*. *J Endocrinol*, 2008. 199(1): p. 5-19.
63. Richards, J.S. and S.A. Pangas, *The ovary: basic biology and clinical implications*. *J Clin Invest*, 2010. 120(4): p. 963-72.

64. Abiven, G., Raffin Sanson, M.-L., and Bertherat, J., *Biochimie des hormones et leurs mécanismes d'action. Généralités et synthèse des hormones polypeptidiques*. *Endocrinologie*, 2004. 1(Issue 2): p. Pages 81-92.
65. Assié, G., Rosenberg, D., Clauser, E., and Bertherat, J., *Biochimie des hormones et leurs mécanismes d'action: récepteurs membranaires*. *Endocrinologie*, 2004. 1: p. 169-199.
66. Heindel, J.J. and K.A. Treinen, *Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation*. *Toxicol Pathol*, 1989. 17(2): p. 411-45.
67. Bertherat, J., *Biochimie des hormones et leurs mécanismes d'action. D-Récepteurs nucléaires*. *Endocrinologie*, 2004. 1: p. 133-137.
68. Meeker, J.D., *Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health*. *Maturitas*, 2010. 66(3): p. 236-41.
69. Uzumcu, M. and R. Zachow, *Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function*. *Reprod Toxicol*, 2007. 23(3): p. 337-52.
70. Wuttke, W., H. Jarry, and D. Seidlova-Wuttke, *Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals*. *Hormones (Athens)*, 2010. 9(1): p. 9-15.
71. Hotchkiss, A.K., et al., *Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: where we are today and where we need to go*. *Toxicol Sci*, 2008. 105(2): p. 235-59.
72. ECETOC, *Guidance on Identifying Endocrine Disrupting Effects. Technical Report No. 106*. 2009, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, 4 avenue E. Van Nieuwenhuysse (Bte 6), B-1160 Brussels, Belgium.
73. Kavlock, R.J., 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: p. 715-40.
74. Phillips, B. and P. Harrision, *Overview of the Endocrine Disruptors Issue*, in *Endocrine Disrupting Chemicals*, R.E. Hester and R.M. Harrison, Editors. 1999, Environmental Science and Technology.
75. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement*. *Endocr Rev*, 2009. 30(4): p. 293-342.
76. Adams, N.R., *Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens*. *Aust Vet J*, 1990. 67(6): p. 197-201.
77. Thain, R.I., *Bovine infertility possibly caused by subterranean clover. Further report and herd histories*. *Aust Vet J*, 1966. 42(6): p. 199-203.
78. Lorand, T., E. Vigh, and J. Garai, *Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens*. *Curr Med Chem*, 2010. 17(30): p. 3542-74.
79. Boue, S.M., et al., *Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens*. *J Agric Food Chem*, 2003. 51(8): p. 2193-9.
80. Kuiper, G.G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. *Endocrinology*, 1998. 139(10): p. 4252-63.
81. COT, *Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment report Phytoestrogens and Health*. 2003.
82. Cederroth, C.R., et al., *Soy, phyto-oestrogens and male reproductive function: a review*. *Int J Androl*, 2010. 33(2): p. 304-16.
83. Tuohy, P.G., *Soy infant formula and phytoestrogens*. *J Paediatr Child Health*, 2003. 39(6): p. 401-5.

84. Song, W.O., et al., *Soy isoflavones as safe functional ingredients*. J Med Food, 2007. 10(4): p. 571-80.
85. Bar-El, D.S. and R. Reifen, *Soy as an endocrine disruptor: cause for caution?* J Pediatr Endocrinol Metab, 2010. 23(9): p. 855-61.
86. Wuttke, W., H. Jarry, and D. Seidlova-Wuttke, *Isoflavones--safe food additives or dangerous drugs?* Ageing Res Rev, 2007. 6(2): p. 150-88.
87. Moutsatsou, P., *The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding*. Hormones (Athens), 2007. 6(3): p. 173-93.
88. Massart, F. and G. Saggese, *Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development*. Int J Androl, 2010. 33(2): p. 369-76.
89. AFSSA, *Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale - Rapport final*. 2009, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
90. Kim, I.H., et al., *Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats*. Toxicol Lett, 2003. 138(3): p. 185-92.
91. Yang, J.Y., et al., *Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice*. Reprod Toxicol, 2007. 24(3-4): p. 381-7.
92. Barouki, R., *[A fatal kiss between estrogen receptor and dioxin]*. Med Sci (Paris), 2003. 19(11): p. 1068-9.
93. Martin, M.B., et al., *Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells*. Endocrinology, 2003. 144(6): p. 2425-36.
94. Dewailly, E., et al., *Concentration of organochlorines in human brain, liver, and adipose tissue autopsy samples from Greenland*. Environ Health Perspect, 1999. 107(10): p. 823-8.
95. Dewailly, E., et al., *High levels of PCBs in breast milk of Inuit women from arctic Quebec*. Bull Environ Contam Toxicol, 1989. 43(5): p. 641-6.
96. Waring, R.H. and R.M. Harris, *Endocrine disrupters: a human risk?* Mol Cell Endocrinol, 2005. 244(1-2): p. 2-9.
97. Joffe, M., *Are problems with male reproductive health caused by endocrine disruption?* Occup Environ Med, 2001. 58(4): p. 281-7; quiz 287-8, 260.
98. Tabb, M.M. and B. Blumberg, *New modes of action for endocrine-disrupting chemicals*. Mol Endocrinol, 2006. 20(3): p. 475-82.
99. Miossec, P., F. Archambeaud-Mouveroux, and M.P. Teissier, *[Inhibition of steroidogenesis by ketoconazole. Therapeutic uses]*. Ann Endocrinol (Paris), 1997. 58(6): p. 494-502.
100. Moore, R.W., C.R. Jefcoate, and R.E. Peterson, *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits steroidogenesis in the rat testis by inhibiting the mobilization of cholesterol to cytochrome P450sc*. Toxicol Appl Pharmacol, 1991. 109(1): p. 85-97.
101. Wilson, V.S. and G.A. LeBlanc, *The contribution of hepatic inactivation of testosterone to the lowering of serum testosterone levels by ketoconazole*. Toxicol Sci, 2000. 54(1): p. 128-37.
102. Danzo, B.J., *Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins*. Environ Health Perspect, 1997. 105(3): p. 294-301.
103. Zama, A.M. and M. Uzumcu, *Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes*. Endocrinology, 2009. 150(10): p. 4681-91.
104. Masuyama, H. and Y. Hiramatsu, *Involvement of suppressor for Gal 1 in the ubiquitin/proteasome-mediated degradation of estrogen receptors*. J Biol Chem, 2004. 279(13): p. 12020-6.

105. Folsvik, N., et al., *Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelks (Nucella lapillus) from Norway*. Chemosphere, 1999. 38(3): p. 681-91.
106. Oberdorster, E. and P. McClellan-Green, *Mechanisms of imposex induction in the mud snail, Ilyanassa obsoleta: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor*. Mar Environ Res, 2002. 54(3-5): p. 715-8.
107. Gooding, M.P., et al., *The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (Ilyanassa obsoleta)*. Environ Health Perspect, 2003. 111(4): p. 426-30.
108. Horiguchi, T., *Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex*. Environ Sci, 2006. 13(2): p. 77-87.
109. Meteyer, C.U., et al., *Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (Rana pipiens) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies*. Teratology, 2000. 62(3): p. 151-71.
110. Schoff, P.K., et al., *Prevalence of skeletal and eye malformations in frogs from north-central United States: estimations based on collections from randomly selected sites*. J Wildl Dis, 2003. 39(3): p. 510-21.
111. McDaniel, T.V., et al., *Potential endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (Rana pipiens) and green frogs (Rana clamitans) from areas of intensive row crop agriculture*. Aquat Toxicol, 2008. 88(4): p. 230-42.
112. Liney, K.E., et al., *Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works*. Environ Health Perspect, 2006. 114 Suppl 1: p. 81-9.
113. Hemming, J.M., et al., *Assessment of the estrogenicity and toxicity of a domestic wastewater effluent flowing through a constructed wetland system using biomarkers in male fathead minnows (Pimephales promelas rafinesque, 1820)*. Environ Toxicol Chem, 2001. 20(10): p. 2268-75.
114. Martin, O., et al., *Testicular dysgenesis syndrome and the estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis*. Cien Saude Colet, 2008. 13(5): p. 1601-18.
115. Storgaard, L., J.P. Bonde, and J. Olsen, *Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies*. Reprod Toxicol, 2006. 21(1): p. 4-15.
116. Mastroiacovo, P., et al., *Birth defects in the Seveso area after TCDD contamination*. Jama, 1988. 259(11): p. 1668-72.
117. Den Hond, E., et al., *Sexual maturation in relation to polychlorinated aromatic hydrocarbons: Sharpe and Skakkebaek's hypothesis revisited*. Environ Health Perspect, 2002. 110(8): p. 771-6.
118. Kristensen, P., et al., *Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991*. Epidemiology, 1997. 8(5): p. 537-44.
119. Garcia-Rodriguez, J., et al., *Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association*. Environ Health Perspect, 1996. 104(10): p. 1090-5.
120. Hammond, B., et al., *Estrogenic activity of the insecticide chlordecone (Kepone) and interaction with uterine estrogen receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(12): p. 6641-5.
121. Paracelsus, *Liber paragaphorum*. in *Sämtliche Werke*, Editions K. Sudhoff, t. IV, p. 1-4.
122. EPA, *Reference Dose (RfD): Description and Use in Health Risk Assessments*. 2010.
123. Escande, A., et al., *Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta*. Biochem Pharmacol, 2006. 71(10): p. 1459-69.

124. Kim, T.S., et al., *In vitro study of Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) endocrine disruptor screening and testing methods-establishment of a recombinant rat androgen receptor (rrAR) binding assay*. J Toxicol Sci, 2010. 35(2): p. 239-43.
125. Sonneveld, E., et al., *Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities*. Toxicol Sci, 2006. 89(1): p. 173-87.
126. Eertmans, F., et al., *Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment*. Toxicol In Vitro, 2003. 17(5-6): p. 515-24.
127. OECD. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4: Effets sur la santé*. [cited; Available from: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/lignes-directrices-de-l-ocde-pour-les-essais-de-produits-chimiques-section-4-effets-sur-la-sante_20745842;jsessionid=5hjch2eipm23p.delta.
128. Scippo, M.L., et al., *DR-CALUX((R)) screening of food samples: evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like PCBs*. Talanta, 2004. 63(5): p. 1193-202.
129. Willemsen, P., et al., *Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity*. Anal Bioanal Chem, 2004. 378(3): p. 655-63.
130. Willemsen, P., et al., *Enhancement of steroid receptor-mediated transcription for the development of highly responsive bioassays*. Anal Bioanal Chem, 2005. 382(4): p. 894-905.
131. Gazdar, A.F., et al., *Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis*. Cancer Res, 1990. 50(17): p. 5488-96.
132. Hecker, M., et al., *The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study*. Environ Sci Pollut Res Int, 2010.
133. Hecker, M., et al., *Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: hormone production*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. 217(1): p. 114-24.
134. Gracia, T., et al., *Modulation of steroidogenic gene expression and hormone production of H295R cells by pharmaceuticals and other environmentally active compounds*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. 225(2): p. 142-53.
135. Hilscherova, K., et al., *Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR*. Toxicol Sci, 2004. 81(1): p. 78-89.
136. Vinggaard, A.M., et al., *Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro*. Toxicol In Vitro, 2000. 14(3): p. 227-34.
137. Zhou, D.J., D. Pompon, and S.A. Chen, *Stable expression of human aromatase complementary DNA in mammalian cells: a useful system for aromatase inhibitor screening*. Cancer Res, 1990. 50(21): p. 6949-54.
138. Cepa, M., et al., *New steroidal aromatase inhibitors: suppression of estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and induction of cell death*. BMC Cell Biol, 2008. 9: p. 41.
139. Ohno, K., et al., *A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA*. Toxicol Sci, 2004. 82(2): p. 443-50.
140. Kim, H.S., et al., *Validation study of OECD rodent uterotrophic assay for the assessment of estrogenic activity in Sprague-Dawley immature female rats*. J Toxicol Environ Health A, 2005. 68(23-24): p. 2249-62.

141. Kennel, P., et al., *Tamoxifen: 28-day oral toxicity study in the rat based on the Enhanced OECD Test Guideline 407 to detect endocrine effects*. Arch Toxicol, 2003. 77(9): p. 487-99.
142. Kennel, P.F., C.T. Pallen, and R.G. Bars, *Evaluation of the rodent Hershberger assay using three reference endocrine disruptors (androgen and antiandrogens)*. Reprod Toxicol, 2004. 18(1): p. 63-73.
143. Owens, W., et al., *The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol*. Environ Health Perspect, 2006. 114(8): p. 1259-65.
144. Kim, H.S., et al., *Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide*. Toxicol Sci, 2002. 67(1): p. 52-62.
145. Kanno, J., et al., *The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase 1*. Environ Health Perspect, 2001. 109(8): p. 785-94.
146. Kanno, J., et al., *The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies*. Environ Health Perspect, 2003. 111(12): p. 1550-8.
147. Kanno, J., et al., *The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies*. Environ Health Perspect, 2003. 111(12): p. 1530-49.
148. Owens, W., et al., *The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies*. Environ Health Perspect, 2007. 115(5): p. 671-8.
149. Moon, H.J., et al., *OECD validation of phase-3 Hershberger assay using the stimulated weanling male rat in Korea*. J Appl Toxicol, 2010. 30(4): p. 361-8.
150. Andrews, P., et al., *Feasibility and potential gains of enhancing the subacute rat study protocol (OECD test guideline no. 407) by additional parameters selected to determine endocrine modulation. A pre-validation study to determine endocrine-mediated effects of the antiandrogenic drug flutamide*. Arch Toxicol, 2001. 75(2): p. 65-73.
151. Kunimatsu, T., et al., *Evaluation for reliability and feasibility of the draft protocol for the enhanced rat 28-day subacute study (OECD Guideline 407) using androgen antagonist flutamide*. Toxicology, 2004. 200(1): p. 77-89.
152. O'Connor, J.C., S.R. Frame, and G.S. Ladics, *Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens*. Toxicol Sci, 2002. 69(1): p. 92-108.
153. McPherson, J.D., et al., *A physical map of the human genome*. Nature, 2001. 409(6822): p. 934-41.
154. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. 291(5507): p. 1304-51.
155. Gregory, S.G., et al., *A physical map of the mouse genome*. Nature, 2002. 418(6899): p. 743-50.
156. Gibbs, R.A., et al., *Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution*. Nature, 2004. 428(6982): p. 493-521.
157. Zhou, T., et al., *Toxicogenomics: transcription profiling for toxicology assessment*. Exs, 2009. 99: p. 325-66.
158. Cunningham, M.L. and L. Lehman-McKeeman, *Applying toxicogenomics in mechanistic and predictive toxicology*. Toxicol Sci, 2005. 83(2): p. 205-6.
159. Gatzidou, E.T., A.N. Zira, and S.E. Theocharis, *Toxicogenomics: a pivotal piece in the puzzle of toxicological research*. J Appl Toxicol, 2007. 27(4): p. 302-9.

160. Shultz, V.D., et al., *Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate*. *Toxicol Sci*, 2001. 64(2): p. 233-42.
161. Yamada, T., et al., *Functional genomics may allow accurate categorization of the benzimidazole fungicide benomyl: lack of ability to act via steroid-receptor-mediated mechanisms*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005. 205(1): p. 11-30.
162. Daston, G.P. and J.M. Naciff, *Predicting developmental toxicity through toxicogenomics*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010. 90(2): p. 110-7.
163. Creasy, D., Foster, PMD, *Male Reproductive System*. In: *Handbook of Toxicologic Pathology*. 2002, San Diego: Haschek W. 829-887.
164. Haschek, W., Rousseaux, CG, *Male Reproductive System*. In: *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. 1998, San Diego: Haschek WM, Rousseaux CG. 443-483.
165. Dadoune, J.P., and Démolin, A., *Structure et fonction du testicule*. In: *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. 2001, Paris: Ellipses. 256-315.
166. Holstein, A.F., W. Schulze, and M. Davidoff, *Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. 1: p. 107.
167. Maekawa, M., K. Kamimura, and T. Nagano, *Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function*. *Arch Histol Cytol*, 1996. 59(1): p. 1-13.
168. de Kretser, D.M., et al., *Spermatogenesis*. *Hum Reprod*, 1998. 13 Suppl 1: p. 1-8.
169. Hermo, L., et al., *Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes*. *Microsc Res Tech*, 2010. 73(4): p. 241-78.
170. de Rooij, D.G., *Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells*. *Reproduction*, 2001. 121(3): p. 347-54.
171. Ehmcke, J., J. Wistuba, and S. Schlatt, *Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives*. *Hum Reprod Update*, 2006. 12(3): p. 275-82.
172. Cohen, P.E. and J.W. Pollard, *Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals*. *Bioessays*, 2001. 23(11): p. 996-1009.
173. Kleckner, N., *Meiosis: how could it work?* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(16): p. 8167-74.
174. Lee, B. and A. Amon, *Meiosis: how to create a specialized cell cycle*. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. 13(6): p. 770-7.
175. Abou-Haila, A. and D.R. Tulsiani, *Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. 379(2): p. 173-82.
176. Yoshinaga, K. and K. Toshimori, *Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation*. *Microsc Res Tech*, 2003. 61(1): p. 39-45.
177. Hermo, L., et al., *Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa*. *Microsc Res Tech*, 2010. 73(4): p. 279-319.
178. Clermont, Y., *Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal*. *Physiol Rev*, 1972. 52(1): p. 198-236.
179. Schulze, W. and U. Rehder, *Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium*. *Cell Tissue Res*, 1984. 237(3): p. 395-407.
180. Hess, R.A. and L. Renato de Franca, *Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium*. *Adv Exp Med Biol*, 2008. 636: p. 1-15.
181. Amann, R.P., *The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?* *J Androl*, 2008. 29(5): p. 469-87.
182. Angelopoulou, R. and J.P. Dadoune, *[Apoptosis in normal and pathological spermatogenesis]*. *Contracept Fertil Sex*, 1999. 27(2): p. 99-106.

183. Shaha, C., R. Tripathi, and D.P. Mishra, *Male germ cell apoptosis: regulation and biology*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. 365(1546): p. 1501-15.
184. Russell, L.D., Griswold, M. D., *Form, dimension, and cytology of mammalian Sertoli cells*. In: The Sertoli cell. 1993, Clearwater: Cache River Press. 2-37.
185. Mruk, D.D. and C.Y. Cheng, *Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis*. Endocr Rev, 2004. 25(5): p. 747-806.
186. Morales, C., Clermont, Y., *Structural changes of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium*. In: The Sertoli cell. 1993, Clearwater: Cache River Press. 305–329.
187. Wong, C.H. and C.Y. Cheng, *The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis*. Curr Top Dev Biol, 2005. 71: p. 263-96.
188. Pelletier, R.M. and S.W. Byers, *The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations*. Microsc Res Tech, 1992. 20(1): p. 3-33.
189. Dym, M. and D.W. Fawcett, *The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium*. Biol Reprod, 1970. 3(3): p. 308-26.
190. Petersen, C. and O. Soder, *The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size*. Horm Res, 2006. 66(4): p. 153-61.
191. Mital, P., B.T. Hinton, and J.M. Dufour, *The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More Than Just Their Tight Junctions*. Biol Reprod, 2011.
192. Nakanishi, Y. and A. Shiratsuchi, *Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences*. Biol Pharm Bull, 2004. 27(1): p. 13-6.
193. Kerr, J.B. and D.M. de Kretser, *Proceedings: The role of the Sertoli cell in phagocytosis of the residual bodies of spermatids*. J Reprod Fertil, 1974. 36(2): p. 439-40.
194. Clermont, Y., C. Morales, and L. Hermo, *Endocytic activities of Sertoli cells in the rat*. Ann N Y Acad Sci, 1987. 513: p. 1-15.
195. Lui, W.Y., et al., *Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis*. Biol Reprod, 2003. 68(4): p. 1087-97.
196. Boussouar, F. and M. Benahmed, *Lactate and energy metabolism in male germ cells*. Trends Endocrinol Metab, 2004. 15(7): p. 345-50.
197. Jegou, B., *The Sertoli-germ cell communication network in mammals*. Int Rev Cytol, 1993. 147: p. 25-96.
198. Hagenas, L., et al., *Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP)*. Mol Cell Endocrinol, 1975. 2(5): p. 339-50.
199. Forti, G., et al., *Sertoli cell proteins in the human seminiferous tubule*. J Steroid Biochem, 1989. 32(1B): p. 135-44.
200. Griswold, M.D., *Protein secretions of Sertoli cells*. Int Rev Cytol, 1988. 110: p. 133-56.
201. Chung, S.S., et al., *Evidence for cross-talk between Sertoli and germ cells using selected cathepsins as markers*. J Androl, 1998. 19(6): p. 686-703.
202. Davis, C.M., et al., *Differential expression of extracellular matrix components in rat Sertoli cells*. Biol Reprod, 1990. 43(5): p. 860-9.
203. de Kretser, D.M., et al., *The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology*. Mol Cell Endocrinol, 2004. 225(1-2): p. 57-64.
204. de Kretser, D.M., et al., *Inhibins, activins and follistatin: actions on the testis*. Mol Cell Endocrinol, 2001. 180(1-2): p. 87-92.

205. Welt, C., et al., *Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium*. Exp Biol Med (Maywood), 2002. 227(9): p. 724-52.
206. Holdcraft, R.W. and R.E. Braun, *Hormonal regulation of spermatogenesis*. Int J Androl, 2004. 27(6): p. 335-42.
207. Walker, W.H., P.B. Daniel, and J.F. Habener, *Inducible cAMP early repressor ICER down-regulation of CREB gene expression in Sertoli cells*. Mol Cell Endocrinol, 1998. 143(1-2): p. 167-78.
208. Walker, W.H., L. Fucci, and J.F. Habener, *Expression of the gene encoding transcription factor cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein (CREB): regulation by follicle-stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat Sertoli cells*. Endocrinology, 1995. 136(8): p. 3534-45.
209. Abel, M.H., et al., *Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse*. J Mol Endocrinol, 2009. 42(4): p. 291-303.
210. Lindstedt, G., et al., *Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSHbeta gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high luteinizing hormone and normal serum testosterone concentrations*. Clin Chem Lab Med, 1998. 36(8): p. 663-5.
211. Phillip, M., et al., *Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the beta-subunit of follicle-stimulating hormone*. N Engl J Med, 1998. 338(24): p. 1729-32.
212. Tapanainen, J.S., et al., *Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility*. Nat Genet, 1997. 15(2): p. 205-6.
213. Dierich, A., et al., *Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(23): p. 13612-7.
214. Sairam, M.R. and H. Krishnamurthy, *The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models*. Arch Med Res, 2001. 32(6): p. 601-8.
215. Kumar, T.R., et al., *Transgenic models to study gonadotropin function: the role of follicle-stimulating hormone in gonadal growth and tumorigenesis*. Mol Endocrinol, 1999. 13(6): p. 851-65.
216. O'Shaughnessy, P.J., et al., *Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice*. Mol Cell Endocrinol, 2009. 306(1-2): p. 2-8.
217. O'Shaughnessy, P.J., et al., *Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors*. Reproduction, 2010. 139(1): p. 177-84.
218. Beckers, A., *[Hypogonadism due to LH deficiency]*. Bull Mem Acad R Med Belg, 2007. 162(5-6): p. 291-7; discussion 298.
219. Valdes-Socin, H., et al., *Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene*. N Engl J Med, 2004. 351(25): p. 2619-25.
220. Kremer, H., et al., *Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene*. Nat Genet, 1995. 9(2): p. 160-4.
221. Ma, X., et al., *Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(49): p. 17294-9.
222. Pakarainen, T., et al., *Testosterone replacement therapy induces spermatogenesis and partially restores fertility in luteinizing hormone receptor knockout mice*. Endocrinology, 2005. 146(2): p. 596-606.

223. Zhang, F.P., et al., *Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice*. *Mol Endocrinol*, 2001. 15(1): p. 172-83.
224. Lei, Z.M., et al., *Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy*. *Biol Reprod*, 2004. 71(5): p. 1605-13.
225. Walker, W.H., *Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010. 365(1546): p. 1557-69.
226. Yeh, S., et al., *Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(21): p. 13498-503.
227. De Gendt, K., et al., *A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(5): p. 1327-32.
228. Tsai, M.Y., et al., *Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(50): p. 18975-80.
229. Wang, R.S., et al., *Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice*. *Endocr Rev*, 2009. 30(2): p. 119-32.
230. Meng, J., et al., *Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(46): p. 16696-700.
231. Wang, R.S., et al., *Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes*. *Endocrinology*, 2006. 147(12): p. 5624-33.
232. Sharpe, R.M., et al., *Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats*. *J Reprod Fertil*, 1994. 101(1): p. 193-8.
233. O'Donnell, L., et al., *Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium*. *Biol Reprod*, 1996. 55(4): p. 895-901.
234. Zirkin, B.R., *Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH*. *Semin Cell Dev Biol*, 1998. 9(4): p. 417-21.
235. Bilinska, B., et al., *Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches*. *Reprod Biol*, 2006. 6 Suppl 1: p. 43-58.
236. Carreau, S., et al., *Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. 1: p. 35.
237. Akingbemi, B.T., *Estrogen regulation of testicular function*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005. 3: p. 51.
238. Carreau, S., C. de Vienne, and I. Galeraud-Denis, *Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances*. *Adv Med Sci*, 2008. 53(2): p. 139-44.
239. Carreau, S. and R.A. Hess, *Oestrogens and spermatogenesis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010. 365(1546): p. 1517-35.
240. Eddy, E.M., et al., *Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility*. *Endocrinology*, 1996. 137(11): p. 4796-805.
241. Robertson, K.M., et al., *Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(14): p. 7986-91.
242. Robertson, K.M., et al., *Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice*. *J Androl*, 2001. 22(5): p. 825-30.

243. Carani, C., et al., *Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency*. N Engl J Med, 1997. 337(2): p. 91-5.
244. Herrmann, B.L., et al., *Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(12): p. 5476-84.
245. Smith, E.P., et al., *Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man*. N Engl J Med, 1994. 331(16): p. 1056-61.
246. Stillman, R.J., *In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring*. Am J Obstet Gynecol, 1982. 142(7): p. 905-21.
247. Micic, S., et al., *Hyperprolactinemia: histological and meiotic analyses in azoospermic men*. Arch Androl, 1982. 8(3): p. 217-20.
248. Krause, W., *[Prolactin level in the serum of patients with disorders of spermatogenesis]*. Hautarzt, 1978. 29(2): p. 77-81.
249. Guillaumot, P. and M. Benahmed, *Prolactin receptors are expressed and hormonally regulated in rat Sertoli cells*. Mol Cell Endocrinol, 1999. 149(1-2): p. 163-8.
250. Scarabelli, L., et al., *Prolactin effect on pre-pubertal Sertoli cell proliferation and metabolism*. J Endocrinol Invest, 2003. 26(8): p. 718-22.
251. Danzo, B.J. and B.C. Eller, *The ontogeny of biologically active androgen-binding protein in rat plasma, testis, and epididymis*. Endocrinology, 1985. 117(4): p. 1380-8.
252. Joseph, D.R., et al., *Overexpression of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in male transgenic mice: tissue distribution and phenotypic disorders*. Biol Reprod, 1997. 56(1): p. 21-32.
253. Larriba, S., et al., *Androgen binding protein is tissue-specifically expressed and biologically active in transgenic mice*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. 53(1-6): p. 573-8.
254. Loveland, K.L. and S. Schlatt, *Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts*. J Endocrinol, 1997. 153(3): p. 337-44.
255. Yoshinaga, K., et al., *Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function*. Development, 1991. 113(2): p. 689-99.
256. Tajima, Y., et al., *Switching of mouse spermatogonial proliferation from the c-kit receptor-independent type to the receptor-dependent type during differentiation*. J Reprod Fertil, 1994. 102(1): p. 117-22.
257. Dym, M., et al., *Expression of c-kit receptor and its autophosphorylation in immature rat type A spermatogonia*. Biol Reprod, 1995. 52(1): p. 8-19.
258. Ashman, L.K., *The biology of stem cell factor and its receptor C-kit*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. 31(10): p. 1037-51.
259. Allard, E.K., K.T. Blanchard, and K. Boekelheide, *Exogenous stem cell factor (SCF) compensates for altered endogenous SCF expression in 2,5-hexanedione-induced testicular atrophy in rats*. Biol Reprod, 1996. 55(1): p. 185-93.
260. Sofikitis, N., et al., *Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. 109(3-5): p. 323-30.
261. Marziali, G., D. Lazzaro, and V. Sorrentino, *Binding of germ cells to mutant Sld Sertoli cells is defective and is rescued by expression of the transmembrane form of the c-kit ligand*. Dev Biol, 1993. 157(1): p. 182-90.
262. Li, M.W., et al., *Tumor necrosis factor {alpha} reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes*. J Endocrinol, 2006. 190(2): p. 313-29.

263. Benahmed, M., [*Role of tumor necrosis factor in the male gonad*]. *Contracept Fertil Sex*, 1997. 25(7-8): p. 569-71.
264. Parvinen, M., et al., *Local regulation of seminiferous epithelium: the role of cytokines*. *Bull Assoc Anat (Nancy)*, 1991. 75(228): p. 163-5.
265. Pollanen, P., O. Soder, and M. Parvinen, *Interleukin-1 alpha stimulation of spermatogonial proliferation in vivo*. *Reprod Fertil Dev*, 1989. 1(1): p. 85-7.
266. Soder, O., et al., *Production and secretion of an interleukin-1-like factor is stage-dependent and correlates with spermatogonial DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium*. *Int J Androl*, 1991. 14(3): p. 223-31.
267. Nehar, D., et al., *Interleukin 1alpha stimulates lactate dehydrogenase A expression and lactate production in cultured porcine sertoli cells*. *Biol Reprod*, 1998. 59(6): p. 1425-32.
268. Zhao, G.Q., et al., *The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse*. *Genes Dev*, 1996. 10(13): p. 1657-69.
269. Leeson, C.R., *Observations on the fine structure of rat interstitial tissue*. *Acta Anat (Basel)*, 1963. 52: p. 34-48.
270. Haider, S.G., *Cell biology of Leydig cells in the testis*. *Int Rev Cytol*, 2004. 233: p. 181-241.
271. Hales, D.B., *Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis*. *J Reprod Immunol*, 2002. 57(1-2): p. 3-18.
272. Christensen, A.K. and D.W. Fawcett, *The fine structure of testicular interstitial cells in mice*. *Am J Anat*, 1966. 118(2): p. 551-71.
273. Neaves, W.B., *Leydig cells*. *Contraception*, 1975. 11(5): p. 571-606.
274. Kerr, J.B., *Functional cytology of the human testis*. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1992. 6(2): p. 235-50.
275. Habert, R., H. Lejeune, and J.M. Saez, *Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 179(1-2): p. 47-74.
276. Ewing, L.L. and B. Zirkin, *Leydig cell structure and steroidogenic function*. *Recent Prog Horm Res*, 1983. 39: p. 599-635.
277. Benahmed, M., J. Reventos, and J.M. Saez, [*Role of plasma lipoproteins in the function of steroidogenic tissues*]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 1983. 44(1): p. 43-50.
278. Gwynne, J.T. and J.F. Strauss, 3rd, *The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands*. *Endocr Rev*, 1982. 3(3): p. 299-329.
279. Andersen, J.M. and J.M. Dietschy, *Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary, and testis of the rat*. *J Biol Chem*, 1978. 253(24): p. 9024-32.
280. Ishii, T., et al., *The roles of circulating high-density lipoproteins and trophic hormones in the phenotype of knockout mice lacking the steroidogenic acute regulatory protein*. *Mol Endocrinol*, 2002. 16(10): p. 2297-309.
281. Hou, J.W., D.C. Collins, and R.L. Schleicher, *Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in murine Leydig cells*. *Endocrinology*, 1990. 127(5): p. 2047-55.
282. Benahmed, M., J. Reventos, and J.M. Saez, *Steroidogenesis of cultured purified pig Leydig cells: effects of lipoproteins and human chorionic gonadotropin*. *Endocrinology*, 1983. 112(6): p. 1952-7.
283. Catt, K.J., M.L. Dufau, and T. Tsuruhara, *Radioligand-receptor assay of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1972. 34(1): p. 123-32.
284. Dufau, M.L., K. Watanabe, and K.J. Catt, *Stimulation of cyclic AMP production by the rat testis during incubation with hCG in vitro*. *Endocrinology*, 1973. 92(1): p. 6-11.

285. Rommerts, F.F. and A.O. Brinkman, *Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells*. Mol Cell Endocrinol, 1981. 21(1): p. 15-28.
286. Oonk, R.B., et al., *Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450_{scc}) gene. Structure and regulation by cAMP in vitro*. J Biol Chem, 1990. 265(36): p. 22392-401.
287. Simpson, E.R., *Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450, and the control of steroidogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 1979. 13(3): p. 213-27.
288. Clark, B.J., et al., *The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)*. J Biol Chem, 1994. 269(45): p. 28314-22.
289. Miller, W.L., *StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import*. Mol Endocrinol, 2007. 21(3): p. 589-601.
290. Payne, A.H. and D.B. Hales, *Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones*. Endocr Rev, 2004. 25(6): p. 947-70.
291. Brock, B.J. and M.R. Waterman, *Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species*. Biochemistry, 1999. 38(5): p. 1598-606.
292. Bell, J.B., et al., *Pathways for androgen biosynthesis from [7 alpha-3H] pregnenolone and [4-14C]progesterone by rat testis interstitium in vitro*. Biochim Biophys Acta, 1968. 164(2): p. 412-20.
293. Fevold, H.R., et al., *Rat P450(17 alpha) from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4- and delta 5-steroid-17,20-lyase reactions*. Mol Endocrinol, 1989. 3(6): p. 968-75.
294. Bogovich, K. and A.H. Payne, *Purification of rat testicular microsomal 17-ketosteroid reductase. Evidence that 17-ketosteroid reductase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase are distinct enzymes*. J Biol Chem, 1980. 255(12): p. 5552-9.
295. Slaunwhite, W.R., Jr. and L.T. Samuels, *Progesterone as a precursor of testicular androgens*. J Biol Chem, 1956. 220(1): p. 341-52.
296. Hammar, M. and F. Petersson, *Testosterone production in vitro in human testicular tissue*. Andrologia, 1986. 18(2): p. 196-200.
297. Carreau, S., et al., *Estrogens and male reproduction: a new concept*. Braz J Med Biol Res, 2007. 40(6): p. 761-8.
298. Conley, A. and M. Hinshelwood, *Mammalian aromatases*. Reproduction, 2001. 121(5): p. 685-95.
299. Simpson, E., et al., *The role of local estrogen biosynthesis in males and females*. Trends Endocrinol Metab, 2000. 11(5): p. 184-8.
300. Andersson, S. and D.W. Russell, *Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(10): p. 3640-4.
301. Jin, Y. and T.M. Penning, *Steroid 5alpha-reductases and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2001. 15(1): p. 79-94.
302. Langlois, V.S., et al., *Evolution of steroid-5alpha-reductases and comparison of their function with 5beta-reductase*. Gen Comp Endocrinol, 2010. 166(3): p. 489-97.
303. Thigpen, A.E., et al., *Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression*. J Clin Invest, 1993. 92(2): p. 903-10.

304. Dunn, J.F., B.C. Nisula, and D. Rodbard, *Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma*. J Clin Endocrinol Metab, 1981. 53(1): p. 58-68.
305. Sodergard, R., et al., *Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 beta to human plasma proteins at body temperature*. J Steroid Biochem, 1982. 16(6): p. 801-10.
306. Pardridge, W.M., *Serum bioavailability of sex steroid hormones*. Clin Endocrinol Metab, 1986. 15(2): p. 259-78.
307. Verhoeven, G., et al., *Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. 365(1546): p. 1537-56.
308. Bain, J., *The many faces of testosterone*. Clin Interv Aging, 2007. 2(4): p. 567-76.
309. Chang, C., et al., *Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(18): p. 6876-81.
310. Holdcraft, R.W. and R.E. Braun, *Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids*. Development, 2004. 131(2): p. 459-67.
311. Wilson, E.M. and F.S. French, *Binding properties of androgen receptors. Evidence for identical receptors in rat testis, epididymis, and prostate*. J Biol Chem, 1976. 251(18): p. 5620-9.
312. Zhou, Z.X., et al., *Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability*. Mol Endocrinol, 1995. 9(2): p. 208-18.
313. Deslypere, J.P., et al., *Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene*. Mol Cell Endocrinol, 1992. 88(1-3): p. 15-22.
314. Andersson, S., et al., *Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism*. Nature, 1991. 354(6349): p. 159-61.
315. Thigpen, A.E., et al., *Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency*. J Clin Invest, 1992. 90(3): p. 799-809.
316. Imperato-McGinley, J. and Y.S. Zhu, *Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency*. Mol Cell Endocrinol, 2002. 198(1-2): p. 51-9.
317. Sharpe, R.M., *The roles of oestrogen in the male*. Trends Endocrinol Metab, 1998. 9(9): p. 371-7.
318. Korach, K.S., et al., *Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes*. Recent Prog Horm Res, 1996. 51: p. 159-86; discussion 186-8.
319. Lubahn, D.B., et al., *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(23): p. 11162-6.
320. Hess, R.A., et al., *A role for oestrogens in the male reproductive system*. Nature, 1997. 390(6659): p. 509-12.
321. Kregge, J.H., et al., *Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(26): p. 15677-82.
322. Chambon, P., *The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades*. Mol Endocrinol, 2005. 19(6): p. 1418-28.
323. Gronemeyer, H., J.A. Gustafsson, and V. Laudet, *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. Nat Rev Drug Discov, 2004. 3(11): p. 950-64.
324. Germain, P., et al., *Overview of nomenclature of nuclear receptors*. Pharmacol Rev, 2006. 58(4): p. 685-704.

325. Chang, C. and J. Kokontis, *Identification of a new member of the steroid receptor super-family by cloning and sequence analysis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. 155(2): p. 971-7.
326. Chang, C.S., J. Kokontis, and S.T. Liao, *Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors*. *Science*, 1988. 240(4850): p. 324-6.
327. Lubahn, D.B., et al., *Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome*. *Science*, 1988. 240(4850): p. 327-30.
328. Pelletier, G., *Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues*. *Histol Histopathol*, 2000. 15(4): p. 1261-70.
329. Sar, M., et al., *Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues*. *Endocrinology*, 1990. 127(6): p. 3180-6.
330. Lubahn, D.B., et al., *Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(23): p. 9534-8.
331. Brinkmann, A.O., et al., *The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression*. *J Steroid Biochem*, 1989. 34(1-6): p. 307-10.
332. Gobinet, J., N. Poujol, and C. Sultan, *Molecular action of androgens*. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. 198(1-2): p. 15-24.
333. Chang, C.S., J. Kokontis, and S.T. Liao, *Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(19): p. 7211-5.
334. MacLean, H.E., G.L. Warne, and J.D. Zajac, *Localization of functional domains in the androgen receptor*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997. 62(4): p. 233-42.
335. Jenster, G., et al., *Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor*. *J Biol Chem*, 1995. 270(13): p. 7341-6.
336. Lavery, D.N. and I.J. McEwan, *The human androgen receptor AF1 transactivation domain: interactions with transcription factor IIF and molten-globule-like structural characteristics*. *Biochem Soc Trans*, 2006. 34(Pt 6): p. 1054-7.
337. Callewaert, L., N. Van Tilborgh, and F. Claessens, *Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor*. *Cancer Res*, 2006. 66(1): p. 543-53.
338. Zitzmann, M., J. Gromoll, and E. Nieschlag, *The androgen receptor CAG repeat polymorphism*. *Andrologia*, 2005. 37(6): p. 216.
339. Sartor, O., Q. Zheng, and J.A. Eastham, *Androgen receptor gene CAG repeat length varies in a race-specific fashion in men without prostate cancer*. *Urology*, 1999. 53(2): p. 378-80.
340. Zitzmann, M., *The role of the CAG repeat androgen receptor polymorphism in andrology*. *Front Horm Res*, 2009. 37: p. 52-61.
341. Zhou, Z.X., J.A. Kempainen, and E.M. Wilson, *Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor*. *Mol Endocrinol*, 1995. 9(5): p. 605-15.
342. Wong, C.I., et al., *Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH2-terminal and steroid-binding domains*. *J Biol Chem*, 1993. 268(25): p. 19004-12.
343. Gao, W., C.E. Bohl, and J.T. Dalton, *Chemistry and structural biology of androgen receptor*. *Chem Rev*, 2005. 105(9): p. 3352-70.
344. Warnmark, A., et al., *Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation*. *Mol Endocrinol*, 2003. 17(10): p. 1901-9.

345. Danielsen, M., L. Hinck, and G.M. Ringold, *Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor*. Cell, 1989. 57(7): p. 1131-8.
346. Freedman, L.P., *Anatomy of the steroid receptor zinc finger region*. Endocr Rev, 1992. 13(2): p. 129-45.
347. Umesono, K. and R.M. Evans, *Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors*. Cell, 1989. 57(7): p. 1139-46.
348. Green, S., et al., *The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity*. Embo J, 1988. 7(10): p. 3037-44.
349. Schoenmakers, E., et al., *Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains*. Biochem J, 1999. 341 (Pt 3): p. 515-21.
350. Dahlman-Wright, K., et al., *Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids*. J Biol Chem, 1991. 266(5): p. 3107-12.
351. Hsieh, J.C., et al., *The T-box near the zinc fingers of the human vitamin D receptor is required for heterodimeric DNA binding and transactivation*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. 215(1): p. 1-7.
352. Jenster, G., et al., *Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization*. Mol Endocrinol, 1991. 5(10): p. 1396-404.
353. Simental, J.A., et al., *Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor*. J Biol Chem, 1991. 266(1): p. 510-8.
354. Haelens, A., et al., *The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor*. Cancer Res, 2007. 67(9): p. 4514-23.
355. Smith, D.F. and D.O. Toft, *Steroid receptors and their associated proteins*. Mol Endocrinol, 1993. 7(1): p. 4-11.
356. Vanaja, D.K., et al., *Effect of geldanamycin on androgen receptor function and stability*. Cell Stress Chaperones, 2002. 7(1): p. 55-64.
357. Tahiri, B., et al., *Participation of critical residues from the extreme C-terminal end of the human androgen receptor in the ligand binding function*. Biochemistry, 2001. 40(29): p. 8431-7.
358. Heery, D.M., et al., *A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors*. Nature, 1997. 387(6634): p. 733-6.
359. He, B., J.A. Kemppainen, and E.M. Wilson, *FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor*. J Biol Chem, 2000. 275(30): p. 22986-94.
360. Farla, P., et al., *The androgen receptor ligand-binding domain stabilizes DNA binding in living cells*. J Struct Biol, 2004. 147(1): p. 50-61.
361. Jenster, G., J. Trapman, and A.O. Brinkmann, *Nuclear import of the human androgen receptor*. Biochem J, 1993. 293 (Pt 3): p. 761-8.
362. Lutz, L.B., et al., *Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands*. Mol Endocrinol, 2003. 17(6): p. 1106-16.
363. Patrao, M.T., E.J. Silva, and M.C. Avellar, *Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2009. 53(8): p. 934-45.
364. Heemers, H.V. and D.J. Tindall, *Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex*. Endocr Rev, 2007. 28(7): p. 778-808.

365. Kuil, C.W. and E. Mulder, *Effects of androgens and antiandrogens on the conformation of the androgen receptor*. Ann N Y Acad Sci, 1995. 761: p. 351-4.
366. Veldscholte, J., et al., *Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors*. Biochemistry, 1992. 31(32): p. 7422-30.
367. Goueli, S.A., J.L. Holtzman, and K. Ahmed, *Phosphorylation of the androgen receptor by a nuclear cAMP-independent protein kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. 123(2): p. 778-84.
368. Kuiper, G.G. and A.O. Brinkmann, *Phosphotryptic peptide analysis of the human androgen receptor: detection of a hormone-induced phosphopeptide*. Biochemistry, 1995. 34(6): p. 1851-7.
369. Moudgil, V.K., *Phosphorylation of steroid hormone receptors*. Biochim Biophys Acta, 1990. 1055(3): p. 243-58.
370. Tyagi, R.K., et al., *Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells*. Mol Endocrinol, 2000. 14(8): p. 1162-74.
371. Cutress, M.L., et al., *Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor*. J Cell Sci, 2008. 121(Pt 7): p. 957-68.
372. Heinlein, C.A. and C. Chang, *Androgen receptor (AR) coregulators: an overview*. Endocr Rev, 2002. 23(2): p. 175-200.
373. Culig, Z., et al., *Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor*. Cancer Res, 1994. 54(20): p. 5474-8.
374. Cancela, L., I. Nemere, and A.W. Norman, *1 alpha,25(OH)₂ vitamin D₃: a steroid hormone capable of producing pleiotropic receptor-mediated biological responses by both genomic and nongenomic mechanisms*. J Steroid Biochem, 1988. 30(1-6): p. 33-9.
375. Freeman, M.R., B. Cinar, and M.L. Lu, *Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer*. Trends Endocrinol Metab, 2005. 16(6): p. 273-9.
376. Heinlein, C.A. and C. Chang, *The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions*. Mol Endocrinol, 2002. 16(10): p. 2181-7.
377. Kousteni, S., et al., *Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity*. Cell, 2001. 104(5): p. 719-30.
378. Foradori, C.D., M.J. Weiser, and R.J. Handa, *Non-genomic actions of androgens*. Front Neuroendocrinol, 2008. 29(2): p. 169-81.
379. Baron, S., et al., *Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells*. J Biol Chem, 2004. 279(15): p. 14579-86.
380. Lyng, F.M., G.R. Jones, and F.F. Rommerts, *Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations*. Biol Reprod, 2000. 63(3): p. 736-47.
381. Loss, E.S., et al., *Testosterone modulates K(+)ATP channels in Sertoli cell membrane via the PLC-PIP2 pathway*. Horm Metab Res, 2004. 36(8): p. 519-25.
382. Cheng, J., S.C. Watkins, and W.H. Walker, *Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells*. Endocrinology, 2007. 148(5): p. 2066-74.

383. Xing, J., D.D. Ginty, and M.E. Greenberg, *Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase*. Science, 1996. 273(5277): p. 959-63.
384. Scobey, M., et al., *Delivery of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (creb) mutant to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis*. Endocrinology, 2001. 142(2): p. 948-54.
385. Sandberg, A.A. and W.R. Slaunwhite, Jr., *Metabolism of 4-C14-testosterone in human subjects. I. Distribution in bile, blood, feces and urine*. J Clin Invest, 1956. 35(12): p. 1331-9.
386. Themmen, A.P.N. and I.T. Huhtaniemi, *Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function*. Endocr Rev, 2000. 21(5): p. 551-83.
387. De Kretser, D.M., K.J. Catt, and C.A. Paulsen, *Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats*. Endocrinology, 1971. 88(2): p. 332-7.
388. Latronico, A.C., et al., *Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene*. N Engl J Med, 1996. 334(8): p. 507-12.
389. Weiss, J., et al., *Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone*. N Engl J Med, 1992. 326(3): p. 179-83.
390. Shenker, A., et al., *A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty*. Nature, 1993. 365(6447): p. 652-4.
391. Lei, Z.M., et al., *Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene*. Mol Endocrinol, 2001. 15(1): p. 184-200.
392. Zhang, F.P., et al., *Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice*. Endocrinology, 2004. 145(3): p. 1453-63.
393. Christensen, A.K. and K.C. Peacock, *Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin*. Biol Reprod, 1980. 22(2): p. 383-91.
394. Sharpe, R.M., et al., *Sertoli-Leydig cell communication via an LHRH-like factor*. Nature, 1981. 290(5809): p. 785-7.
395. Huhtaniemi, I. and J. Toppari, *Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis*. Adv Exp Med Biol, 1995. 377: p. 33-54.
396. Chatelain, P.G., P. Sanchez, and J.M. Saez, *Growth hormone and insulin-like growth factor I treatment increase testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth hormone deficient dwarf mice*. Endocrinology, 1991. 128(4): p. 1857-62.
397. Sholiton, L.J., L. Srivastava, and B.B. Taylor, *The in-vitro and in-vitro effects of diethylstilbestrol on testicular synthesis of testosterone*. Steroids, 1975. 26(6): p. 797-806.
398. Tcholakian, R.K., M. Chowdhury, and E. Steinberger, *Time of action of oestradiol-17beta on luteinizing hormone and testosterone*. J Endocrinol, 1974. 63(2): p. 411-2.
399. Bartke, A., K.I. Williams, and S. Dalterio, *Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro*. Biol Reprod, 1977. 17(5): p. 645-9.
400. Sairam, M.R. and M.I. Berman, *Direct inhibitory effects of estrogens on rat Leydig cells in vitro*. Steroids, 1979. 33(2): p. 233-41.
401. Saez, J.M., et al., *Oestrogen induced Leydig cell refractoriness to gonadotrophin stimulation*. Acta Endocrinol (Copenh), 1978. 89(2): p. 379-92.

402. Abney, T.O., *The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review*. Steroids, 1999. 64(9): p. 610-7.
403. Aragona, C., H.G. Bohnet, and H.G. Friesen, *Localization of prolactin binding in prostate and testis: The role of serum prolactin concentration on the testicular LH receptor*. Acta Endocrinol (Copenh), 1977. 84(2): p. 402-9.
404. Charreau, E.H., et al., *Prolactin binding in rat testis: specific receptors in interstitial cells*. Mol Cell Endocrinol, 1977. 6(4-5): p. 303-7.
405. Catt, K.J., et al., *Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis*. Recent Prog Horm Res, 1980. 36: p. 557-662.
406. Welsh, T.H., Jr., B.G. Kasson, and A.J. Hsueh, *Direct biphasic modulation of gonadotropin-stimulated testicular androgen biosynthesis by prolactin*. Biol Reprod, 1986. 34(5): p. 796-804.
407. Hafiez, A.A., C.W. Lloyd, and A. Bartke, *The role of prolactin in the regulation of testis function: the effects of prolactin and luteinizing hormone on the plasma levels of testosterone and androstenedione in hypophysectomized rats*. J Endocrinol, 1972. 52(2): p. 327-32.
408. Pakarinen, P., et al., *Transcriptional and translational regulation of LH, prolactin and their testicular receptors by hCG and bromocriptine treatments in adult and neonatal rats*. Mol Cell Endocrinol, 1994. 101(1-2): p. 37-47.
409. Hsueh, A.J., et al., *Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(14): p. 5082-6.
410. Lin, T., et al., *Regulation of Leydig cell function in primary culture by inhibin and activin*. Endocrinology, 1989. 125(4): p. 2134-40.
411. Cannon, J.G., et al., *Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever*. J Infect Dis, 1990. 161(1): p. 79-84.
412. Damas, P., et al., *Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans*. Crit Care Med, 1989. 17(10): p. 975-8.
413. Mantovani, G., et al., *Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites*. J Mol Med, 2000. 78(10): p. 554-61.
414. Mealy, K., et al., *The testicular effects of tumor necrosis factor*. Ann Surg, 1990. 211(4): p. 470-5.
415. Ogilvie, K.M., et al., *The inhibitory effect of intracerebroventricularly injected interleukin 1beta on testosterone secretion in the rat: role of steroidogenic acute regulatory protein*. Biol Reprod, 1999. 60(2): p. 527-33.
416. Turnbull, A.V. and C. Rivier, *Inhibition of gonadotropin-induced testosterone secretion by the intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta in the male rat*. Endocrinology, 1997. 138(3): p. 1008-13.
417. Morales, V., et al., *Intratesticular delivery of tumor necrosis factor-alpha and ceramide directly abrogates steroidogenic acute regulatory protein expression and Leydig cell steroidogenesis in adult rats*. Endocrinology, 2003. 144(11): p. 4763-72.
418. Mauduit, C., et al., *Tumor necrosis factor-alpha inhibits leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression*. Endocrinology, 1998. 139(6): p. 2863-8.
419. Hong, C.Y., et al., *Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha*. Mol Cell Biol, 2004. 24(7): p. 2593-604.
420. Li, X., et al., *Tumor necrosis factor-alpha inhibition of 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase gene (Cyp17) expression*. Endocrinology, 1995. 136(8): p. 3519-26.

421. Bourguiba, S., et al., *Regulation of aromatase gene expression in purified germ cells of adult male rats: effects of transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha, and cyclic adenosine 3',5'-monosphosphate*. Biol Reprod, 2003. 69(2): p. 592-601.
422. Bourguiba, S., et al., *Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. 86(3-5): p. 335-43.
423. Sordoillet, C., et al., *Sites of interaction between epidermal growth factor and transforming growth factor-beta 1 in the control of steroidogenesis in cultured porcine Leydig cells*. Endocrinology, 1992. 130(3): p. 1352-8.
424. Chuzel, F., et al., *Transcriptional regulation of the lutropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells*. Eur J Biochem, 1996. 239(1): p. 8-16.
425. Naville, D., et al., *Control of production of insulin-like growth factor I by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. Cell-cell interactions*. Mol Cell Endocrinol, 1990. 70(3): p. 217-24.
426. Cailleau, J., S. Vermeire, and G. Verhoeven, *Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells*. Mol Cell Endocrinol, 1990. 69(1): p. 79-89.
427. Zhang, F.P., T. El-Hefnawy, and I. Huhtaniemi, *Regulation of luteinizing hormone receptor gene expression by insulin-like growth factor-I in an immortalized murine Leydig tumor cell line (BLT-1)*. Biol Reprod, 1998. 59(5): p. 1116-23.
428. Lin, T., et al., *Induction of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity by insulin-like growth factor-I in primary culture of purified Leydig cells*. Adv Exp Med Biol, 1987. 219: p. 603-7.
429. Amory, J.K. and W.J. Bremner, *Regulation of testicular function in men: implications for male hormonal contraceptive development*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. 85(2-5): p. 357-61.
430. Vadakkadath Meethal, S. and C.S. Atwood, *The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain*. Cell Mol Life Sci, 2005. 62(3): p. 257-70.
431. Tilbrook, A.J. and I.J. Clarke, *Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males*. Biol Reprod, 2001. 64(3): p. 735-42.
432. Matsumoto, A.M. and W.J. Bremner, *Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man*. J Clin Endocrinol Metab, 1984. 58(4): p. 609-14.
433. Hayes, F.J., et al., *Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. 85(9): p. 3027-35.
434. Nett, T.M., et al., *Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone*. Domest Anim Endocrinol, 2002. 23(1-2): p. 33-42.
435. Sheckter, C.B., A.M. Matsumoto, and W.J. Bremner, *Testosterone administration inhibits gonadotropin secretion by an effect directly on the human pituitary*. J Clin Endocrinol Metab, 1989. 68(2): p. 397-401.
436. Van Waeleghem, K., et al., *Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men*. Hum Reprod, 1996. 11(2): p. 325-9.
437. Main, K.M., et al., *Genital anomalies in boys and the environment*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010. 24(2): p. 279-89.
438. Toppari, J., et al., *Male reproductive health and environmental xenoestrogens*. Environ Health Perspect, 1996. 104 Suppl 4: p. 741-803.

439. Sharpe, R.M. and D.S. Irvine, *How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?* Bmj, 2004. 328(7437): p. 447-51.
440. Delbes, G., et al., *[Is fetal testis in danger?]*. Med Sci (Paris), 2005. 21(12): p. 1083-8.
441. Wohlfahrt-Veje, C., K.M. Main, and N.E. Skakkebaek, *Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. 71(4): p. 459-65.
442. Sharpe, R.M. and N.E. Skakkebaek, *Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?* Lancet, 1993. 341(8857): p. 1392-5.
443. Vos, J.G., et al., *Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation*. Crit Rev Toxicol, 2000. 30(1): p. 71-133.
444. Ivell, R. and S. Hartung, *The molecular basis of cryptorchidism*. Mol Hum Reprod, 2003. 9(4): p. 175-81.
445. Scorer, C.G., *The Descent Of The Testis*. Arch Dis Child, 1964. 39: p. 605-9.
446. Foresta, C., et al., *Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism*. Endocr Rev, 2008. 29(5): p. 560-80.
447. Hughes, I.A. and C.L. Acerini, *Factors controlling testis descent*. Eur J Endocrinol, 2008. 159 Suppl 1: p. S75-82.
448. Nef, S. and L.F. Parada, *Cryptorchidism in mice mutant for Insl3*. Nat Genet, 1999. 22(3): p. 295-9.
449. Hosie, S., et al., *Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes?* Eur J Pediatr Surg, 2000. 10(5): p. 304-9.
450. Gray, L.E., Jr., et al., *Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals*. Int J Androl, 2006. 29(1): p. 96-104; discussion 105-8.
451. Fisher, J.S., et al., *Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate*. Hum Reprod, 2003. 18(7): p. 1383-94.
452. Mylchreest, E., et al., *Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate*. Reprod Toxicol, 2002. 16(1): p. 19-28.
453. Song, R., et al., *Effects of fifteen PBDE metabolites, DE71, DE79 and TBBPA on steroidogenesis in the H295R cell line*. Chemosphere, 2008. 71(10): p. 1888-94.
454. Baskin, L.S., K. Himes, and T. Colborn, *Hypospadias and endocrine disruption: is there a connection?* Environ Health Perspect, 2001. 109(11): p. 1175-83.
455. Matlai, P. and V. Beral, *Trends in congenital malformations of external genitalia*. Lancet, 1985. 1(8420): p. 108.
456. Czeizel, A., *Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia*. Lancet, 1985. 1(8426): p. 462-3.
457. Kallen, B. and J. Winberg, *An epidemiological study of hypospadias in Sweden*. Acta Paediatr Scand Suppl, 1982. 293: p. 1-21.
458. Paulozzi, L.J., J.D. Erickson, and R.J. Jackson, *Hypospadias trends in two US surveillance systems*. Pediatrics, 1997. 100(5): p. 831-4.
459. Allen, T.D. and J.E. Griffin, *Endocrine studies in patients with advanced hypospadias*. J Urol, 1984. 131(2): p. 310-4.
460. Glatzl, J., *Endocrinological problems in malformation of the male genitalia*. Prog Pediatr Surg, 1984. 17: p. 1-10.
461. Leung, A.K. and W.L. Robson, *Hypospadias: an update*. Asian J Androl, 2007. 9(1): p. 16-22.
462. Gray, L.E., Jr., et al., *Toxicant-induced hypospadias in the male rat*. Adv Exp Med Biol, 2004. 545: p. 217-41.

463. Gori, S., et al., *Germ cell tumours of the testis*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. 53(2): p. 141-64.
464. Pike, M.C., C.E. Chilvers, and L.G. Bobrow, *Classification of testicular cancer in incidence and mortality statistics*. Br J Cancer, 1987. 56(1): p. 83-5.
465. Stone, J.M., et al., *Trebling of the incidence of testicular cancer in victoria, Australia (1950-1985)*. Cancer, 1991. 68(1): p. 211-9.
466. Toppari, J., A.M. Haavisto, and M. Alanen, *Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries*. Cad Saude Publica, 2002. 18(2): p. 413-20.
467. Giwercman, A., et al., *Testicular cancer risk in boys with maldescended testis: a cohort study*. J Urol, 1987. 138(5): p. 1214-6.
468. Moss, A.R., et al., *Hormonal risk factors in testicular cancer. A case-control study*. Am J Epidemiol, 1986. 124(1): p. 39-52.
469. Kanto, S., et al., *Risk factors in past histories and familial episodes related to development of testicular germ cell tumor*. Int J Urol, 2004. 11(8): p. 640-6.
470. Weir, H.K., et al., *Pre-natal and peri-natal exposures and risk of testicular germ-cell cancer*. Int J Cancer, 2000. 87(3): p. 438-43.
471. Newbold, R.R., B.C. Bullock, and J.A. McLachlan, *Testicular tumors in mice exposed in utero to diethylstilbestrol*. J Urol, 1987. 138(6): p. 1446-50.
472. Strohsnitter, W.C., et al., *Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol*. J Natl Cancer Inst, 2001. 93(7): p. 545-51.
473. Rajpert-De Meyts, E., et al., *Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia*. Apmis, 1998. 106(1): p. 198-204; discussion 204-6.
474. Leung, A.C. and S.J. Kogan, *Focal lobular spermatogenesis and pubertal acceleration associated with ipsilateral Leydig cell hyperplasia*. Urology, 2000. 56(3): p. 508-9.
475. Piolat, C., et al., *[Testicular Leydig cell hyperplasia in children]*. Prog Urol, 2003. 13(1): p. 110-4.
476. Nistral, M., P. Gonzalez-Peramato, and R. Paniagua, *Congenital Leydig cell hyperplasia*. Histopathology, 1988. 12: p. 307-317.
477. Murray, T.J., et al., *Human fetal testis: second trimester proliferative and steroidogenic capacities*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. 85(12): p. 4812-7.
478. Kim, I., R.H. Young, and R.E. Scully, *Leydig cell tumors of the testis. A clinicopathological analysis of 40 cases and review of the literature*. Am J Surg Pathol, 1985. 9(3): p. 177-92.
479. Kalfon, A., et al., *[Leydig cell testicular tumors. A series of 10 observations]*. Prog Urol, 1999. 9(2): p. 299-304.
480. Clegg, E.D., et al., *Leydig cell hyperplasia and adenoma formation: mechanisms and relevance to humans*. Reprod Toxicol, 1997. 11(1): p. 107-21.
481. Prentice, D.E. and A.W. Meikle, *A review of drug-induced Leydig cell hyperplasia and neoplasia in the rat and some comparisons with man*. Hum Exp Toxicol, 1995. 14(7): p. 562-72.
482. Whitehead, E.D. and E. Leiter, *Genital abnormalities and abnormal semen analyses in male patients exposed to diethylstilbestrol in utero*. J Urol, 1981. 125(1): p. 47-50.
483. Wilcox, A.J., et al., *Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol*. N Engl J Med, 1995. 332(21): p. 1411-6.
484. Cedderoth, C.R., et al., *Estrogen receptor alpha is a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism*. Endocrinology, 2007. 148(11): p. 5507-19.
485. Toppari, J., *Environmental endocrine disruptors*. Sex Dev, 2008. 2(4-5): p. 260-7.

486. Goyal, H.O., et al., *Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood*. Biol Reprod, 2003. 68(6): p. 2081-91.
487. Mathews, E., et al., *Mal-development of the penis and loss of fertility in male rats treated neonatally with female contraceptive 17alpha-ethinyl estradiol: a dose-response study and a comparative study with a known estrogenic teratogen diethylstilbestrol*. Toxicol Sci, 2009. 112(2): p. 331-43.
488. Volle, D.H., et al., *The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice*. J Clin Invest, 2009. 119(12): p. 3752-64.
489. Warita, K., et al., *Direct effects of diethylstilbestrol on the gene expression of the cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc) in testicular Leydig cells*. Life Sci, 2010. 87(9-10): p. 281-5.
490. Henley, D.V. and K.S. Korach, *Physiological effects and mechanisms of action of endocrine disrupting chemicals that alter estrogen signaling*. Hormones (Athens), 2010. 9(3): p. 191-205.
491. Kelce, W.R., et al., *Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites*. Toxicol Appl Pharmacol, 1994. 126(2): p. 276-85.
492. Wong, C., et al., *Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide*. J Biol Chem, 1995. 270(34): p. 19998-20003.
493. Gray, L.E., Jr., et al., *Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat*. Toxicol Ind Health, 1999. 15(1-2): p. 94-118.
494. Monosson, E., et al., *Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat*. Toxicol Ind Health, 1999. 15(1-2): p. 65-79.
495. Wolf, C.J., G.A. LeBlanc, and L.E. Gray, Jr., *Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD rat*. Toxicol Sci, 2004. 78(1): p. 135-43.
496. Wolf, C.J., et al., *Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin*. Toxicol Sci, 2000. 55(1): p. 152-61.
497. Anway, M.D., et al., *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility*. Science, 2005. 308(5727): p. 1466-9.
498. Anway, M.D., S.S. Rekow, and M.K. Skinner, *Comparative anti-androgenic actions of vinclozolin and flutamide on transgenerational adult onset disease and spermatogenesis*. Reprod Toxicol, 2008. 26(2): p. 100-6.
499. Cowin, P.A., et al., *Vinclozolin exposure in utero induces postpubertal prostatitis and reduces sperm production via a reversible hormone-regulated mechanism*. Endocrinology, 2010. 151(2): p. 783-92.
500. Eustache, F., et al., *Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility*. Environ Health Perspect, 2009. 117(8): p. 1272-9.
501. Kelce, W.R., et al., *Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism*. Toxicol Appl Pharmacol, 1997. 142(1): p. 192-200.

502. Kubota, K., et al., *Effects of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat*. J Reprod Dev, 2003. 49(5): p. 403-12.
503. Habert, R., et al., *Adverse effects of endocrine disruptors on the foetal testis development: focus on the phthalates*. Folia Histochem Cytobiol, 2009. 47(5): p. S67-74.
504. Marsee, K., et al., *Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance*. Environ Health Perspect, 2006. 114(6): p. 805-9.
505. Hauser, R., et al., *Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites*. Epidemiology, 2006. 17(6): p. 682-91.
506. Wirth, J.J., et al., *A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality*. Syst Biol Reprod Med, 2008. 54(3): p. 143-54.
507. Foster, P.M., *Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters*. Int J Androl, 2006. 29(1): p. 140-7; discussion 181-5.
508. Mylchreest, E., et al., *Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. 156(2): p. 81-95.
509. Parks, L.G., et al., *The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat*. Toxicol Sci, 2000. 58(2): p. 339-49.
510. Gray, T.J. and K.R. Butterworth, *Testicular atrophy produced by phthalate esters*. Arch Toxicol Suppl, 1980. 4: p. 452-5.
511. Balk, S.P., *Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer*. Urology, 2002. 60(3 Suppl 1): p. 132-8; discussion 138-9.
512. Goldspiel, B.R. and D.R. Kohler, *Flutamide: an antiandrogen for advanced prostate cancer*. Dicip, 1990. 24(6): p. 616-23.
513. Simard, J., et al., *Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues*. Mol Cell Endocrinol, 1986. 44(3): p. 261-70.
514. Katchen, B. and S. Buxbaum, *Disposition of a new, nonsteroid, antiandrogen, alpha, alpha, alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide (Flutamide), in men following a single oral 200 mg dose*. J Clin Endocrinol Metab, 1975. 41(2): p. 373-9.
515. Peets, E.A., M.F. Henson, and R. Neri, *On the mechanism of the anti-androgenic action of flutamide (alpha-alpha-alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide) in the rat*. Endocrinology, 1974. 94(2): p. 532-40.
516. Kemppainen, J.A., et al., *Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones*. J Biol Chem, 1992. 267(2): p. 968-74.
517. Viguier-Martinez, M.C., et al., *Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidences on fertility*. Acta Endocrinol (Copenh), 1983. 104(2): p. 246-52.
518. van der Schoot, P., *Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide*. J Reprod Fertil, 1992. 96(2): p. 483-96.
519. Kassim, N.M., et al., *The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat*. J Anat, 1997. 190 (Pt 4): p. 577-88.

520. McIntyre, B.S., N.J. Barlow, and P.M. Foster, *Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues*. *Toxicol Sci*, 2001. 62(2): p. 236-49.
521. Miyata, K., et al., *Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormones and androgen-dependent organs in F1 male rats*. *J Toxicol Sci*, 2002. 27(1): p. 19-33.
522. Husmann, D.A. and M.J. McPhaul, *Time-specific androgen blockade with flutamide inhibits testicular descent in the rat*. *Endocrinology*, 1991. 129(3): p. 1409-16.
523. Imperato-McGinley, J., et al., *Comparison of the effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies*. *Endocrinology*, 1992. 131(3): p. 1149-56.
524. Omezzine, A., et al., *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(2): p. 648-61.
525. Bozec, A., et al., *The mitochondrial-dependent pathway is chronically affected in testicular germ cell death in adult rats exposed in utero to anti-androgens*. *J Endocrinol*, 2004. 183(1): p. 79-90.
526. Maire, M., et al., *Alteration of transforming growth factor-beta signaling system expression in adult rat germ cells with a chronic apoptotic cell death process after fetal androgen disruption*. *Endocrinology*, 2005. 146(12): p. 5135-43.
527. Benbrahim-Tallaa, L., et al., *Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption*. *J Endocrinol*, 2008. 196(1): p. 21-31.
528. Mikkila, T.F., J. Toppari, and J. Paranko, *Effects of neonatal exposure to 4-tert-octylphenol, diethylstilbestrol, and flutamide on steroidogenesis in infantile rat testis*. *Toxicol Sci*, 2006. 91(2): p. 456-66.
529. Anahara, R., Y. Toyama, and C. Mori, *Flutamide induces ultrastructural changes in spermatids and the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in mouse testes*. *Reprod Toxicol*, 2004. 18(4): p. 589-96.
530. Anahara, R., Y. Toyama, and C. Mori, *Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis*. *Reprod Toxicol*, 2008. 25(2): p. 139-43.
531. Toyoda, K., et al., *Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals*. *Arch Toxicol*, 2000. 74(3): p. 127-32.
532. Marchetti, B. and F. Labrie, *Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in the rat*. *J Steroid Biochem*, 1988. 29(6): p. 691-8.
533. Okahara, A., et al., *Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 5). Effects of repeated doses of flutamide for 2 and 4 weeks*. *J Toxicol Sci*, 2000. 25 Spec No: p. 63-70.
534. Ohsako, S., et al., *Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide*. *J Reprod Dev*, 2003. 49(4): p. 275-90.
535. Zhou, Q., et al., *Androgen-regulated transcripts in the neonatal mouse testis as determined through microarray analysis*. *Biol Reprod*, 2005. 72(4): p. 1010-9.
536. Vo, T.T., et al., *Di-(2 ethylhexyl) phthalate and flutamide alter gene expression in the testis of immature male rats*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. 7: p. 104.
537. Rouquie, D., et al., *Standard and molecular NOAELs for rat testicular toxicity induced by flutamide*. *Toxicol Sci*, 2009. 109(1): p. 59-65.
538. O'Connor, J.C., et al., *An ongoing validation of a Tier I screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs)*. *Toxicol Sci*, 1998. 46(1): p. 45-60.

539. Chapin, R.E., K.T. Morgan, and J.S. Bus, *The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2,5-hexanedione*. Exp Mol Pathol, 1983. 38(2): p. 149-69.
540. Creasy, D.M., G.R. Ford, and T.J. Gray, *The morphogenesis of cyclohexylamine-induced testicular atrophy in the rat: in vivo and in vitro studies*. Exp Mol Pathol, 1990. 52(2): p. 155-69.
541. Blackburn, D.M., et al., *A comparison of the effects of the three isomers of dinitrobenzene on the testis in the rat*. Toxicol Appl Pharmacol, 1988. 92(1): p. 54-64.
542. Somkuti, S.G., et al., *Light and electron microscopic evidence of tri-o-cresyl phosphate (TOCP)-mediated testicular toxicity in Fischer 344 rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 1991. 107(1): p. 35-46.
543. Strandgaard, C. and M.G. Miller, *Germ cell apoptosis in rat testis after administration of 1,3-dinitrobenzene*. Reprod Toxicol, 1998. 12(2): p. 97-103.
544. Linder, R.E., L.F. Strader, and G.L. Rehnberg, *Effect of acute exposure to boric acid on the male reproductive system of the rat*. J Toxicol Environ Health, 1990. 31(2): p. 133-46.
545. Chapin, R.E. and W.W. Ku, *The reproductive toxicity of boric acid*. Environ Health Perspect, 1994. 102 Suppl 7: p. 87-91.
546. Linder, R.E., et al., *Acute spermatogenic effects of bromoacetic acids*. Fundam Appl Toxicol, 1994. 22(3): p. 422-30.
547. Dunnick, J.K., et al., *Reproductive toxicity of dimethyl methyl phosphonate (DMMP) in the male Fischer 344 rat*. Toxicol Appl Pharmacol, 1984. 72(3): p. 379-87.
548. Russell, L.D., J.P. Malone, and S.L. Karpas, *Morphological pattern elicited by agents affecting spermatogenesis by stimulation*. Tissue Cell, 1981. 13(2): p. 369-80.
549. Boekelheide, K., *2,5-Hexanedione alters microtubule assembly. I. Testicular atrophy, not nervous system toxicity, correlates with enhanced tubulin polymerization*. Toxicol Appl Pharmacol, 1987. 88(3): p. 370-82.
550. Russell, L.D., J.P. Malone, and D.S. MacCurdy, *Effect of the microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine, on seminiferous tubule structure in the rat*. Tissue Cell, 1981. 13(2): p. 349-67.
551. Creasy, D.M., *Pathogenesis of male reproductive toxicity*. Toxicol Pathol, 2001. 29(1): p. 64-76.
552. Creasy, D.M., et al., *A quantitative study of stage-specific spermatocyte damage following administration of ethylene glycol monomethyl ether in the rat*. Exp Mol Pathol, 1985. 43(3): p. 321-36.
553. Meistrich, M.L., *Critical components of testicular function and sensitivity to disruption*. Biol Reprod, 1986. 34(1): p. 17-28.
554. Meistrich, M.L., *Stage-specific sensitivity of spermatogonia to different chemotherapeutic drugs*. Biomed Pharmacother, 1984. 38(3): p. 137-42.
555. Setchell, B.P., *Local control of testicular fluids*. Reprod Fertil Dev, 1990. 2(3): p. 291-309.
556. Maddocks, S. and R.M. Sharpe, *Interstitial fluid volume in the rat testis: androgen-dependent regulation by the seminiferous tubules?* J Endocrinol, 1989. 120(2): p. 215-22.
557. Sharpe, R.M., J.M. Bartlett, and G. Allenby, *Evidence for the control of testicular interstitial fluid volume in the rat by specific germ cell types*. J Endocrinol, 1991. 128(3): p. 359-67.
558. Widmark, A., J.E. Damber, and A. Bergh, *Effects of oestradiol-17 beta on testicular microcirculation in rats*. J Endocrinol, 1987. 115(3): p. 489-95.

559. Adams, M.L., et al., *Alcohol affects rat testicular interstitial fluid volume and testicular secretion of testosterone and beta-endorphin*. J Pharmacol Exp Ther, 1991. 258(3): p. 1008-14.
560. Setchell, B.P. and R.M. Sharpe, *Effect of injected human chorionic gonadotrophin on capillary permeability, extracellular fluid volume and the flow of lymph and blood in the testes of rats*. J Endocrinol, 1981. 91(2): p. 245-54.
561. Valenca, M.M. and A. Negro-Vilar, *Proopiomelanocortin-derived peptides in testicular interstitial fluid: characterization and changes in secretion after human chorionic gonadotropin or luteinizing hormone-releasing hormone analog treatment*. Endocrinology, 1986. 118(1): p. 32-7.
562. Tripiciano, A., et al., *Direct visualization of rat peritubular myoid cell contraction in response to endothelin*. Biol Reprod, 1996. 55(1): p. 25-31.
563. Sharpe, R.M., *Possible role of elongated spermatids in control of stage-dependent changes in the diameter of the lumen of the rat seminiferous tubule*. J Androl, 1989. 10(4): p. 304-10.
564. Nakai, M., et al., *Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive system in the rat*. J Androl, 1992. 13(6): p. 507-18.
565. Aoki, A. and A.P. Hoffer, *Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium*. Biol Reprod, 1978. 18(4): p. 579-91.
566. Nolte, T., J.H. Harleman, and W. Jahn, *Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats*. Exp Toxicol Pathol, 1995. 47(4): p. 267-86.
567. Jackson, A.E., et al., *The effects of ethylene dimethane sulphonate (EDS) on rat Leydig cells: evidence to support a connective tissue origin of Leydig cells*. Biol Reprod, 1986. 35(2): p. 425-37.
568. O'Donnell, L., et al., *Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle*. Endocrinology, 1994. 135(6): p. 2608-14.
569. Krasavage, W.J., et al., *The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites*. Toxicol Appl Pharmacol, 1980. 52(3): p. 433-41.
570. Spencer, P.S. and H.H. Schaumburg, *Experimental neuropathy produced by 2,5-hexanedione--a major metabolite of the neurotoxic industrial solvent methyl n-butyl ketone*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1975. 38(8): p. 771-5.
571. Kihaille, P.E., et al., *Are sperm parameters the best indicator of 2,5-hexanedione reproductive toxicity in male rats?* Reprod Toxicol, 2005. 20(4): p. 515-9.
572. Allard, E.K. and K. Boekelheide, *Fate of germ cells in 2,5-hexanedione-induced testicular injury. II. Atrophy persists due to a reduced stem cell mass and ongoing apoptosis*. Toxicol Appl Pharmacol, 1996. 137(2): p. 149-56.
573. Markelewicz, R.J., Jr., S.J. Hall, and K. Boekelheide, *2,5-hexanedione and carbendazim coexposure synergistically disrupts rat spermatogenesis despite opposing molecular effects on microtubules*. Toxicol Sci, 2004. 80(1): p. 92-100.
574. Boekelheide, K. and J. Eveleth, *The rate of 2,5-hexanedione intoxication, not total dose, determines the extent of testicular injury and altered microtubule assembly in the rat*. Toxicol Appl Pharmacol, 1988. 94(1): p. 76-83.
575. Boekelheide, K., *Rat testis during 2,5-hexanedione intoxication and recovery. I. Dose response and the reversibility of germ cell loss*. Toxicol Appl Pharmacol, 1988. 92(1): p. 18-27.
576. Hall, E.S., J. Eveleth, and K. Boekelheide, *2,5-Hexanedione exposure alters the rat Sertoli cell cytoskeleton. II. Intermediate filaments and actin*. Toxicol Appl Pharmacol, 1991. 111(3): p. 443-53.

577. Johnson, K.J., E.S. Hall, and K. Boekelheide, *2,5-Hexanedione exposure alters the rat Sertoli cell cytoskeleton. I. Microtubules and seminiferous tubule fluid secretion*. Toxicol Appl Pharmacol, 1991. 111(3): p. 432-42.
578. Boekelheide, K., et al., *2,5-hexanedione-induced testicular injury*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. 43: p. 125-47.
579. Richburg, J.H., D.M. Redenbach, and K. Boekelheide, *Seminiferous tubule fluid secretion is a Sertoli cell microtubule-dependent process inhibited by 2,5-hexanedione exposure*. Toxicol Appl Pharmacol, 1994. 128(2): p. 302-9.
580. Boekelheide, K. and S.J. Hall, *2,5-hexanedione exposure in the rat results in long-term testicular atrophy despite the presence of residual spermatogonia*. J Androl, 1991. 12(1): p. 18-26.
581. Lee, J., et al., *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(2): p. 852-8.
582. Horimoto, M., et al., *Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether, sulfasalazine, and 2,5-hexanedione*. Reprod Toxicol, 2000. 14(1): p. 55-63.
583. Bryant, B.H., et al., *Spermatid head retention as a marker of 2,5-hexanedione-induced testicular toxicity in the rat*. Toxicol Pathol, 2008. 36(4): p. 552-9.
584. Jackson, H. and A.W. Craig, *Effects of alkylating chemicals on reproductive cells*. Ann N Y Acad Sci, 1969. 160(1): p. 215-27.
585. Kerr, J.B., et al., *Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone*. Anat Rec, 1993. 235(4): p. 547-59.
586. Cooper, E.R. and H. Jackson, *Comparative effects of methylene, ethylene and propylene dimethanesulphonates on the male rat reproductive system*. J Reprod Fertil, 1970. 23(1): p. 103-8.
587. Kerr, J.B., J.M. Bartlett, and K. Donachie, *Acute response of testicular interstitial tissue in rats to the cytotoxic drug ethane dimethanesulphonate. An ultrastructural and hormonal assay study*. Cell Tissue Res, 1986. 243(2): p. 405-14.
588. Morris, I.D., D.M. Phillips, and C.W. Bardin, *Ethylene dimethanesulfonate destroys Leydig cells in the rat testis*. Endocrinology, 1986. 118(2): p. 709-19.
589. Teerds, K.J., et al., *Stimulation of the proliferation and differentiation of Leydig cell precursors after the destruction of existing Leydig cells with ethane dimethyl sulphonate (EDS) can take place in the absence of LH*. J Androl, 1989. 10(6): p. 472-7.
590. Morris, I.D., *Leydig cell resistance to the cytotoxic effect of ethylene dimethanesulphonate in the adult rat testis*. J Endocrinol, 1985. 105(3): p. 311-6.
591. Vreeburg, J.T., et al., *Functional properties of developing rat Leydig cells after treatment with ethylene dimethanesulphonate (EDS)*. J Reprod Fertil, 1988. 84(1): p. 63-9.
592. Teerds, K.J., et al., *Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration*. Biol Reprod, 1999. 60(6): p. 1437-45.
593. O'Leary, P.C., et al., *Effects of ethane dimethane sulphonate (EDS) on seminiferous tubule function in rats*. Int J Androl, 1987. 10(4): p. 625-34.
594. Bakalska, M., et al., *Induction of male germ cell apoptosis by testosterone withdrawal after ethane dimethanesulfonate treatment in adult rats*. Endocr Regul, 2004. 38(3): p. 103-10.

595. Yang, Z.W., et al., *Histological changes of the testis and epididymis in adult rats as a result of Leydig cell destruction after ethane dimethane sulfonate treatment: a morphometric study*. Asian J Androl, 2006. 8(3): p. 289-99.
596. Bagchi, G. and D.J. Waxman, *Toxicity of ethylene glycol monomethyl ether: impact on testicular gene expression*. Int J Androl, 2008. 31(2): p. 269-74.
597. Boatman, R.J., *International industry initiatives to improve the glycol ether health effects knowledge base*. Toxicol Lett, 2005. 156(1): p. 39-50.
598. Johanson, G., *Toxicity review of ethylene glycol monomethyl ether and its acetate ester*. Crit Rev Toxicol, 2000. 30(3): p. 307-45.
599. Cohen, R., *Reversible subacute ethylene glycol monomethyl ether toxicity associated with microfilm production: a case report*. Am J Ind Med, 1984. 6(6): p. 441-6.
600. Cook, R.R., et al., *A cross-sectional study of ethylene glycol monomethyl ether process employees*. Arch Environ Health, 1982. 37(6): p. 346-51.
601. El-Zein, R.A., et al., *Exposure to ethylene glycol monomethyl ether: clinical and cytogenetic findings*. Arch Environ Health, 2002. 57(4): p. 371-6.
602. Larese, F., A. Fiorito, and R. De Zotti, *The possible haematological effects of glycol monomethyl ether in a frame factory*. Br J Ind Med, 1992. 49(2): p. 131-3.
603. Welch, L.S. and M.R. Cullen, *Effect of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: III. Hematologic effects*. Am J Ind Med, 1988. 14(5): p. 527-36.
604. Welch, L.S., et al., *Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: II. Male reproduction*. Am J Ind Med, 1988. 14(5): p. 509-26.
605. Chapin, R.E. and J.C.t. Lamb, *Effects of ethylene glycol monomethyl ether on various parameters of testicular function in the F344 rat*. Environ Health Perspect, 1984. 57: p. 219-24.
606. Anderson, D., et al., *Effect of ethylene glycol monomethyl ether on spermatogenesis, dominant lethality, and F1 abnormalities in the rat and the mouse after treatment of F0 males*. Teratog Carcinog Mutagen, 1987. 7(2): p. 141-58.
607. Foster, P.M., et al., *Testicular toxicity produced by ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat*. Environ Health Perspect, 1984. 57: p. 207-17.
608. Chapin, R.E., et al., *The effects of ethylene glycol monomethyl ether on testicular histology in F344 rats*. J Androl, 1984. 5(5): p. 369-80.
609. Lee, K.P. and L.A. Kinney, *The ultrastructure and reversibility of testicular atrophy induced by ethylene glycol monomethyl ether (EGME) in the rat*. Toxicol Pathol, 1989. 17(4 Pt 2): p. 759-73.
610. Ku, W.W., et al., *Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis*. Toxicol Appl Pharmacol, 1995. 134(1): p. 100-10.
611. Ghanayem, B.I. and R.E. Chapin, *Calcium channel blockers protect against ethylene glycol monomethyl ether (2-methoxyethanol)-induced testicular toxicity*. Exp Mol Pathol, 1990. 52(3): p. 279-90.
612. Wang, W., R.N. Wine, and R.E. Chapin, *Rat testicular Src: normal distribution and involvement in ethylene glycol monomethyl ether-induced apoptosis*. Toxicol Appl Pharmacol, 2000. 163(2): p. 125-34.
613. Gray, T.J., et al., *Studies on the toxicity of some glycol ethers and alkoxyacetic acids in primary testicular cell cultures*. Toxicol Appl Pharmacol, 1985. 79(3): p. 490-501.
614. Aasmoe, L. and J. Aarbakke, *Gender difference in the elimination of 2-methoxyethanol, methoxyacetic acid and ethoxyacetic acid in rat*. Xenobiotica, 1997. 27(12): p. 1237-44.

615. Hess, R.A., et al., *Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat. II. Quantitative and qualitative histopathology of the testis.* J Androl, 1988. 9(5): p. 327-42.
616. Linder, R.E., R.A. Hess, and L.F. Strader, *Testicular toxicity and infertility in male rats treated with 1,3-dinitrobenzene.* J Toxicol Environ Health, 1986. 19(4): p. 477-89.
617. Ishihara, N., A. Kanaya, and M. Ikeda, *m-Dinitrobenzene intoxication due to skin absorption.* Int Arch Occup Environ Health, 1976. 36(3): p. 161-8.
618. Cody, T.E., et al., *1,3-dinitrobenzene: toxic effects in vivo and in vitro.* J Toxicol Environ Health, 1981. 7(5): p. 829-47.
619. Linder, R.E., et al., *Reproductive toxicity of a single dose of 1,3-dinitrobenzene in two ages of young adult male rats.* Fundam Appl Toxicol, 1990. 14(2): p. 284-98.
620. Reader, S.C., C. Shingles, and M.D. Stonard, *Acute testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene and ethylene glycol monomethyl ether in the rat: evaluation of biochemical effect markers and hormonal responses.* Fundam Appl Toxicol, 1991. 16(1): p. 61-70.
621. McEuen, S.F., et al., *Metabolism and testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene in the rat: effect of route of administration.* Fundam Appl Toxicol, 1995. 28(1): p. 94-9.
622. Rehnberg, G.L., et al., *Changes in testicular and serum hormone concentrations in the male rat following treatment with m-dinitrobenzene.* Toxicol Appl Pharmacol, 1988. 95(2): p. 255-64.
623. Foster, P.M., *M-dinitrobenzene: studies on its toxicity to the testicular Sertoli cell.* Arch Toxicol Suppl, 1989. 13: p. 3-17.
624. Linder, R.E., et al., *Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat. I. Sperm quality, quantity, and fertilizing ability.* J Androl, 1988. 9(5): p. 317-26.
625. Suter, L., et al., *New and traditional approaches for the assessment of testicular toxicity.* Reprod Toxicol, 1998. 12(1): p. 39-47.
626. Shinoda, K., et al., *[Application of BrdU-immunohistochemistry and lanthanum-tracer methods to the pathological evaluation of 1,3-dinitrobenzene testicular toxicity].* Eisei Shikenjo Hokoku, 1989(107): p. 63-7.
627. Williams, J. and P.M. Foster, *The production of lactate and pyruvate as sensitive indices of altered rat Sertoli cell function in vitro following the addition of various testicular toxicants.* Toxicol Appl Pharmacol, 1988. 94(1): p. 160-70.
628. Foster, P.M., S.C. Lloyd, and M.S. Prout, *Toxicity and metabolism of 1,3-dinitrobenzene in rat testicular cell cultures.* Toxicol In Vitro, 1987. 1(1): p. 31-7.
629. McEuen, S.F. and M.G. Miller, *Metabolism and pharmacokinetics of 1,3-dinitrobenzene in the rat and the hamster.* Drug Metab Dispos, 1991. 19(3): p. 661-6.
630. Nystrom, D.D. and D.E. Rickert, *Metabolism and excretion of dinitrobenzenes by male Fischer-344 rats.* Drug Metab Dispos, 1987. 15(6): p. 821-5.
631. Brown, C.D. and M.G. Miller, *Effect of culture age on 1,3-dinitrobenzene metabolism and indicators of cellular toxicity in rat testicular cells.* Toxicol In Vitro, 1991. 5(4): p. 269-75.
632. Jacobson, C.F. and M.G. Miller, *1,3-Dinitrobenzene metabolism and toxicity in seminiferous tubules isolated from rats of different ages.* Toxicology, 1997. 123(1-2): p. 15-26.
633. Reeve, I.T., J.C. Voss, and M.G. Miller, *1,3-Dinitrobenzene metabolism and GSH depletion.* Chem Res Toxicol, 2002. 15(3): p. 361-6.

634. Cave, D.A. and P.M. Foster, *Modulation of m-dinitrobenzene and m-nitrosonitrobenzene toxicity in rat Sertoli-germ cell cocultures*. *Fundam Appl Toxicol*, 1990. 14(1): p. 199-207.
635. Jacobson, C.F. and M.G. Miller, *Species difference in 1,3-dinitrobenzene testicular toxicity: in vitro correlation with glutathione status*. *Reprod Toxicol*, 1998. 12(1): p. 49-56.
636. Obasaju, M.F., D.F. Katz, and M.G. Miller, *Species differences in susceptibility to 1,3-dinitrobenzene-induced testicular toxicity and methemoglobinemia*. *Fundam Appl Toxicol*, 1991. 16(2): p. 257-66.
637. Lee, Y.S., et al., *1,3-Dinitrobenzene induces apoptosis in TM4 mouse Sertoli cells: Involvement of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) MAPK pathway*. *Toxicol Lett*, 2009. 189(2): p. 145-51.
638. Muguruma, M., et al., *Molecular mechanism on the testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene in Sprague-Dawley rats: preliminary study*. *Arch Toxicol*, 2005. 79(12): p. 729-36.
639. Tengowski, M.W., et al., *Differential expression of genes encoding constitutive and inducible 20S proteasomal core subunits in the testis and epididymis of theophylline- or 1,3-dinitrobenzene-exposed rats*. *Biol Reprod*, 2007. 76(1): p. 149-63.
640. Friry-Santini, C., et al., *Correlation between protein accumulation profiles and conventional toxicological findings using a model antiandrogenic compound, flutamide*. *Toxicol Sci*, 2007. 97(1): p. 81-93.
641. Ludwig, S., et al., *A molecular and phenotypic integrative approach to identify a no-effect dose level for antiandrogen-induced testicular toxicity*. *Toxicol Sci*, 2011. 122(1): p. 52-63.
642. Andersen, M.E., et al., *Genomic signatures and dose-dependent transitions in nasal epithelial responses to inhaled formaldehyde in the rat*. *Toxicol Sci*, 2008. 105(2): p. 368-83.
643. Naciff, J.M., et al., *Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17 α -ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A*. *Toxicol Sci*, 2005. 86(2): p. 396-416.
644. Stierum, R., et al., *Transcriptome analysis provides new insights into liver changes induced in the rat upon dietary administration of the food additives butylated hydroxytoluene, curcumin, propyl gallate and thiabendazole*. *Food Chem Toxicol*, 2008. 46(8): p. 2616-28.
645. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 843-54.
646. Molnar, A., et al., *miRNAs control gene expression in the single-cell alga Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, 2007. 447(7148): p. 1126-9.
647. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(2): p. 126-39.
648. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* *Nat Rev Genet*, 2008. 9(2): p. 102-14.
649. Migliore, C. and S. Giordano, *MiRNAs as new master players*. *Cell Cycle*, 2009. 8(14): p. 2185-6.
650. Kloosterman, W.P. and R.H. Plasterk, *The diverse functions of microRNAs in animal development and disease*. *Dev Cell*, 2006. 11(4): p. 441-50.
651. Winter, J., et al., *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(3): p. 228-34.

652. Cowland, J.B., C. Hother, and K. Gronbaek, *MicroRNAs and cancer*. *Apmis*, 2007. 115(10): p. 1090-106.
653. Croce, C.M., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. *Nat Rev Genet*, 2009. 10(10): p. 704-14.
654. Pandey, A.K., et al., *MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease*. *Cell Physiol Biochem*, 2009. 23(4-6): p. 221-32.
655. Cai, B., Z. Pan, and Y. Lu, *The roles of microRNAs in heart diseases: a novel important regulator*. *Curr Med Chem*, 2010. 17(5): p. 407-11.
656. Christensen, M. and G.M. Schratt, *microRNA involvement in developmental and functional aspects of the nervous system and in neurological diseases*. *Neurosci Lett*, 2009. 466(2): p. 55-62.
657. Barbato, C., F. Ruberti, and C. Cogoni, *Searching for MIND: microRNAs in neurodegenerative diseases*. *J Biomed Biotechnol*, 2009. 2009: p. 871313.
658. Yu, F., et al., *Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells*. *Oncogene*, 2010. 29(29): p. 4194-204.
659. Gao, W., et al., *MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011. 137(4): p. 557-66.
660. Ziu, M., et al., *Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury*. *PLoS One*, 2011. 6(2): p. e14724.
661. Mellios, N., et al., *Gender-Specific Reduction of Estrogen-Sensitive Small RNA, miR-30b, in Subjects With Schizophrenia*. *Schizophr Bull*, 2010.
662. Hermeking, H., *The miR-34 family in cancer and apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2010. 17(2): p. 193-9.
663. Ilnytskyy, Y., et al., *Altered microRNA expression patterns in irradiated hematopoietic tissues suggest a sex-specific protective mechanism*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 377(1): p. 41-5.
664. Ishii, H. and T. Saito, *Radiation-induced response of micro RNA expression in murine embryonic stem cells*. *Med Chem*, 2006. 2(6): p. 555-63.
665. Jaklevic, B., et al., *Modulation of ionizing radiation-induced apoptosis by bantam microRNA in Drosophila*. *Dev Biol*, 2008. 320(1): p. 122-30.
666. Lund, A.H., *miR-10 in development and cancer*. *Cell Death Differ*, 2010. 17(2): p. 209-14.
667. Orom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. *Mol Cell*, 2008. 30(4): p. 460-71.
668. Li, L., X.P. Chen, and Y.J. Li, *MicroRNA-146a and human disease*. *Scand J Immunol*, 2010. 71(4): p. 227-31.
669. Bray, I., et al., *MicroRNA-542-5p as a novel tumor suppressor in neuroblastoma*. *Cancer Lett*, 2011. 303(1): p. 56-64.
670. Schulte, J.H., et al., *Accurate prediction of neuroblastoma outcome based on miRNA expression profiles*. *Int J Cancer*, 2010. 127(10): p. 2374-85.
671. Castilla, M.A., et al., *Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma*. *J Pathol*, 2010.
672. Castilla, M.A., et al., *Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma*. *J Pathol*, 2011. 223(1): p. 72-80.
673. Toloubeydokhti, T., et al., *The expression and ovarian steroid regulation of endometrial micro-RNAs*. *Reprod Sci*, 2008. 15(10): p. 993-1001.
674. Ivan, M., et al., *Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds*. *J Cell Mol Med*, 2008. 12(5A): p. 1426-31.

675. Crosby, M.E., et al., *MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress*. *Cancer Res*, 2009. 69(3): p. 1221-9.
676. Huang, X., et al., *Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation*. *Mol Cell*, 2009. 35(6): p. 856-67.
677. Crosby, M.E., et al., *Emerging roles of microRNAs in the molecular responses to hypoxia*. *Curr Pharm Des*, 2009. 15(33): p. 3861-6.
678. Fasanaro, P., et al., *An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210*. *J Biol Chem*, 2009. 284(50): p. 35134-43.
679. Jurewicz, J., et al., *Environmental factors and semen quality*. *Int J Occup Med Environ Health*, 2009. 22(4): p. 305-29.
680. Pasqualotto, F.F., et al., *Clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation in a university hospital*. *Urol Int*, 2006. 76(2): p. 122-5.
681. Poongothai, J., T.S. Gopenath, and S. Manonayaki, *Genetics of human male infertility*. *Singapore Med J*, 2009. 50(4): p. 336-47.
682. Irimura, K., et al., *Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 26). Detection of 1,3-dinitrobenzene-induced histopathological changes in testes and epididymides of rats with 2-week daily repeated dosing*. *J Toxicol Sci*, 2000. 25 Spec No: p. 251-8.
683. Davis, R.O., et al., *Automated analysis of toxicant-induced changes in rat sperm head morphometry*. *Reprod Toxicol*, 1994. 8(6): p. 521-9.
684. Matsui, H. and M. Takahashi, *A novel quantitative morphometry of germ cells for the histopathological evaluation of rat testicular toxicity*. *J Toxicol Sci*, 1999. 24(1): p. 17-25.
685. Cui, Y. and R.S. Paules, *Use of transcriptomics in understanding mechanisms of drug-induced toxicity*. *Pharmacogenomics*, 2010. 11(4): p. 573-85.
686. Daston, G.P., *Gene expression, dose-response, and phenotypic anchoring: applications for toxicogenomics in risk assessment*. *Toxicol Sci*, 2008. 105(2): p. 233-4.
687. Yang, Y., E.A. Blomme, and J.F. Waring, *Toxicogenomics in drug discovery: from preclinical studies to clinical trials*. *Chem Biol Interact*, 2004. 150(1): p. 71-85.
688. Suter, L., L.E. Babiss, and E.B. Wheeldon, *Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development*. *Chem Biol*, 2004. 11(2): p. 161-71.
689. Blomme, E.A., Y. Yang, and J.F. Waring, *Use of toxicogenomics to understand mechanisms of drug-induced hepatotoxicity during drug discovery and development*. *Toxicol Lett*, 2009. 186(1): p. 22-31.
690. Heinloth, A.N., et al., *Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects*. *Toxicol Sci*, 2004. 80(1): p. 193-202.
691. Amin, R.P., et al., *Identification of putative gene based markers of renal toxicity*. *Environ Health Perspect*, 2004. 112(4): p. 465-79.
692. Ellinger-Ziegelbauer, H., et al., *Characteristic expression profiles induced by genotoxic carcinogens in rat liver*. *Toxicol Sci*, 2004. 77(1): p. 19-34.
693. Gracia, T., et al., *The H295R system for evaluation of endocrine-disrupting effects*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2006. 65(3): p. 293-305.
694. Hecker, M., et al., *The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2011. 18(3): p. 503-15.
695. Moore, N.P., et al., *Urinary creatine profiles after administration of cell-specific testicular toxicants to the rat*. *Arch Toxicol*, 1992. 66(6): p. 435-42.
696. Glover, D.M., I.M. Hagan, and A.A. Tavares, *Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis*. *Genes Dev*, 1998. 12(24): p. 3777-87.

697. Barr, F.A., H.H. Sillje, and E.A. Nigg, *Polo-like kinases and the orchestration of cell division*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(6): p. 429-40.
698. Nigg, E.A., *Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish*. Curr Opin Cell Biol, 1998. 10(6): p. 776-83.
699. van Vugt, M.A. and R.H. Medema, *Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1*. Oncogene, 2005. 24(17): p. 2844-59.
700. Lowery, D.M., D. Lim, and M.B. Yaffe, *Structure and function of Polo-like kinases*. Oncogene, 2005. 24(2): p. 248-59.
701. Omura, T. and K. Morohashi, *Gene regulation of steroidogenesis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. 53(1-6): p. 19-25.
702. Stocco, D.M., *StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis*. Annu Rev Physiol, 2001. 63: p. 193-213.
703. Zhang, X., et al., *Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line*. Environ Sci Technol, 2005. 39(8): p. 2777-85.
704. Burgos-Trinidad, M., et al., *Repression of cAMP-induced expression of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase gene (Cyp17) by androgens*. Mol Endocrinol, 1997. 11(1): p. 87-96.
705. Stalvey, J.R. and S.M. Clavey, *Evidence that testosterone regulates Leydig cell 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity by a trans-acting factor distal to the androgen receptor*. J Androl, 1992. 13(1): p. 93-9.
706. O'Shaughnessy, P.J. and A.H. Payne, *Differential effects of single and repeated administration of gonadotropins on testosterone production and steroidogenic enzymes in Leydig cell populations*. J Biol Chem, 1982. 257(19): p. 11503-9.
707. Hashimoto, T., et al., *Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype*. J Biol Chem, 1999. 274(27): p. 19228-36.
708. Reddy, J.K. and T. Hashimoto, *Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system*. Annu Rev Nutr, 2001. 21: p. 193-230.
709. Steiber, A., J. Kerner, and C.L. Hoppel, *Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective*. Mol Aspects Med, 2004. 25(5-6): p. 455-73.
710. Kim, J.J. and R. Miura, *Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences*. Eur J Biochem, 2004. 271(3): p. 483-93.
711. Eaton, S., *Control of mitochondrial beta-oxidation flux*. Prog Lipid Res, 2002. 41(3): p. 197-239.
712. Fukasawa, M., et al., *Immunohistochemical Localization of Mitochondrial Fatty Acid {beta}-Oxidation Enzymes in Rat Testis*. J Histochem Cytochem, 2009.
713. Richburg, J.H. and A. Nanez, *Fas- or FasL-deficient mice display an increased sensitivity to nitrobenzene-induced testicular germ cell apoptosis*. Toxicol Lett, 2003. 139(1): p. 1-10.
714. Ma, S., J. Charron, and R.L. Erikson, *Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation*. Mol Cell Biol, 2003. 23(19): p. 6936-43.
715. Shimizu-Yoshida, Y., et al., *Radiation-inducible hSNK gene is transcriptionally regulated by p53 binding homology element in human thyroid cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 289(2): p. 491-8.

716. Burns, T.F., et al., *Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells*. Mol Cell Biol, 2003. 23(16): p. 5556-71.
717. Archambault, V. and D.M. Glover, *Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. 10(4): p. 265-75.
718. Fode, C., et al., *Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the Drosophila polo kinase and involved in cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(14): p. 6388-92.
719. Kumagai, A. and W.G. Dunphy, *Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts*. Science, 1996. 273(5280): p. 1377-80.
720. Alexandru, G., et al., *Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast*. Cell, 2001. 105(4): p. 459-72.
721. Ohkura, H., I.M. Hagan, and D.M. Glover, *The conserved Schizosaccharomyces pombe kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells*. Genes Dev, 1995. 9(9): p. 1059-73.
722. Myers, J.P., R.T. Zoeller, and F.S. vom Saal, *A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health*. Environ Health Perspect, 2009. 117(11): p. 1652-5.
723. vom Saal, F.S., et al., *Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(5): p. 2056-61.
724. vom Saal, F.S., et al., *A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior*. Toxicol Ind Health, 1998. 14(1-2): p. 239-60.
725. Ashby, J., H. Tinwell, and J. Haseman, *Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero*. Regul Toxicol Pharmacol, 1999. 30(2 Pt 1): p. 156-66.
726. Cagen, S.Z., et al., *Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A*. Toxicol Sci, 1999. 50(1): p. 36-44.
727. Hewitt, P. and T. Herget, *Value of new biomarkers for safety testing in drug development*. Expert Rev Mol Diagn, 2009. 9(6): p. 531-6.
728. Foster, W.R., et al., *A retrospective analysis of toxicogenomics in the safety assessment of drug candidates*. Toxicol Pathol, 2007. 35(5): p. 621-35.
729. Lejeune, H., et al., *The paracrine role of Sertoli cells on Leydig cell function*. Cell Biol Toxicol, 1992. 8(3): p. 73-83.
730. Sriraman, V., M. Anbalagan, and A.J. Rao, *Hormonal regulation of Leydig cell proliferation and differentiation in rodent testis: a dynamic interplay between gonadotrophins and testicular factors*. Reprod Biomed Online, 2005. 11(4): p. 507-18.
731. Sriraman, V. and A. Jagannadha Rao, *Evaluation of the role of FSH in regulation of Leydig cell function during different stages of its differentiation*. Mol Cell Endocrinol, 2004. 224(1-2): p. 73-82.
732. Krishnamurthy, H., et al., *Intercellular communication between Sertoli cells and Leydig cells in the absence of follicle-stimulating hormone-receptor signaling*. Biol Reprod, 2001. 65(4): p. 1201-7.
733. Ford, S.L., et al., *Pregnenolone synthesis in immature rat Sertoli cells*. Mol Cell Endocrinol, 1999. 157(1-2): p. 87-94.
734. Gregory, C.W. and R.M. DePhilip, *Detection of steroidogenic acute regulatory protein (stAR) in mitochondria of cultured rat Sertoli cells incubated with follicle-stimulating hormone*. Biol Reprod, 1998. 58(2): p. 470-4.

735. Ishikawa, T., et al., *Sertoli cell expression of steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer 1 and 5 domain-containing proteins and sterol regulatory element binding protein-1 are interleukin-1beta regulated by activation of c-Jun N-terminal kinase and cyclooxygenase-2 and cytokine induction*. *Endocrinology*, 2005. 146(12): p. 5100-11.
736. CCE. *Commission des Communautés Européennes - Règlement du parlement européen et du conseil concernant la mise sur le marché et l'utilisation des produits biocides*. 2009 [cited; Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2009:0267:FIN:FR:PDF>].
737. Tinwell, H., et al., *A novel method for measuring aromatase activity in tissue samples by determining estradiol concentrations*. *J Appl Toxicol*, 2011.
738. Aardema, M.J. and J.T. MacGregor, *Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies*. *Mutat Res*, 2002. 499(1): p. 13-25.