

Altérations environnementales du développement du testicule fœtal : zoom sur les phtalates

Environmental effects on development of the foetal testis: phthalates under the microscope

R. Habert · V. Muczynski · A. Lehraiki · D. Moison · R. Lambrot · C. Levacher · C. Lécureuil · R. Frydman · V. Rouiller-Fabre

Reçu le 19 octobre 2010 ; accepté le 18 janvier 2011
© SALF et Springer-Verlag France 2011

Résumé L'augmentation de plusieurs anomalies de la fonction de reproduction masculine suscite de grandes inquiétudes. Au cours des quatre dernières décennies, le nombre de spermatozoïdes chez l'homme a nettement diminué, et l'incidence du cancer testiculaire a doublé. De plus, les cas de cryptorchidie et d'hypospadias sont également en augmentation. L'hypothèse la plus couramment admise est que tous ces effets néfastes sur la fonction reproductive masculine résulteraient d'anomalies survenant lors du développement du testicule pendant la vie fœtale et néonatale. En outre, de nombreuses données épidémiologiques, cliniques et expérimentales suggèrent que ces troubles pourraient être dus aux effets de xénobiotiques appelés perturbateurs endocriniens qui sont de plus en plus concentrés et présents dans notre environnement. Parmi les perturbateurs endocriniens, nous avons choisi de focaliser cette revue sur les phtalates pour diverses raisons : 1) ils sont très répandus dans l'environnement ; 2) leurs concentrations dans de nombreux fluides biologiques humains ont été mesurées y compris pendant la grossesse ; 3) les données expérimentales utilisant le

modèle rat et suggérant une reprotoxicité sont nombreuses et pertinentes ; 4) les effets délétères des phtalates sur le développement et sur les fonctions du testicule fœtal de rat ont largement été étudiés ; 5) quelques données épidémiologiques humaines suggèrent un effet reprotoxique des phtalates aux concentrations retrouvées dans l'environnement, au moins durant la vie néonatale. Cependant, les effets directs des phtalates sur le testicule fœtal humain n'avaient jamais été étudiés. Comme nous l'avons fait chez le rat dans les années 1990, nous avons récemment développé et validé un système de culture organotypique de testicule fœtal humain qui permet de maintenir in vitro le développement des différents types cellulaires. Dans ce système, l'ajout de 10^{-4} M de MEHP (mono-2-éthylhexyl phtalate), le phtalate le plus répandu, n'a aucun effet sur la production de testostérone basale ou stimulée par l'hormone lutéinisante (LH), mais il réduit le nombre de cellules germinales en augmentant leur apoptose et sans modifier leur prolifération. Nos données constituent la première donnée expérimentale montrant que les phtalates altèrent le développement du testicule fœtal humain. En outre, en utilisant le même système de culture organotypique, il est intéressant de comparer la réponse au MEHP chez l'Homme et chez les rongeurs pour analyser la pertinence des tests toxicologiques basés sur le modèle rongeur. **Pour citer cette revue : Andrologie 21 (2011).**

R. Habert (✉) · V. Muczynski · D. Moison · R. Lambrot · C. Levacher · C. Lécureuil · V. Rouiller-Fabre
Laboratoire de développement des gonades,
CEA-DSV/iRCM/SCSR/LDRG,
F-92265 Fontenay-aux-Roses, France
e-mail : rene.habert@cea.fr

R. Habert · V. Muczynski · A. Lehraiki · D. Moison · R. Lambrot · C. Levacher · C. Lécureuil · V. Rouiller-Fabre
Université Paris-Diderot–Paris VII,
F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

Inserm, unité 967,
F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

R. Frydman
Service de gynécologie-obstétrique,
Université Paris-Sud, hôpital A.-Béclère,
F-92141 Clamart, France

Mots clés Perturbateurs endocriniens · Testicule fœtal · Développement · Culture organotypique · Test de toxicologie in vitro · Phtalates

Abstract There are great concerns about the increasing incidence of abnormalities in male reproductive function. Human sperm counts have markedly dropped, and the rate of testicular cancer has clearly increased over the past four decades. Moreover, the prevalence rates of cryptorchidism and hypospadias are also probably increasing. It has been

hypothesized that all these adverse trends in male reproduction result from abnormalities in the development of the testis during foetal and neonatal life. Furthermore, many recent epidemiological, clinical and experimental data suggest that these male reproductive disorders could be due to xenobiotics termed endocrine disruptors, which are becoming more and more concentrated and prevalent in our environment. Among these endocrine disruptors, we chose to focus this review on phthalates for different reasons: 1) they are widespread in the environment; 2) their concentrations in many human biological fluids have been measured; 3) the experimental data using rodent models suggesting a reprotoxicity are numerous and are the most convincing; 4) their deleterious effects on the development and function of the rat foetal testis have been largely studied; 5) some epidemiological data in humans suggest a reprotoxic effect at environmental concentrations at least during neonatal life. However, the direct effects of phthalates on human foetal testis have never been explored. Thus, as we did for the rat in the 1990s, we recently developed and validated an organotypic culture system, which allows maintenance of the development of the different cell types of human foetal testis. In this system, the addition of 10^{-4} M MEHP (mono-2-ethylhexyl phthalate), the most produced phthalate, had no effect on basal or LH-stimulated production of testosterone, but it reduced the number of germ cells by increasing their apoptosis, without modifying their proliferation. This is the first experimental demonstration that phthalates alter the development of the foetal testis in humans. Using our organotypic culture system, it is interesting to compare these results obtained in humans with the response to MEHP in the mouse and the rat testes to analyse the relevance of toxicological tests based on rodent models. *To cite this journal: Andrologie 21 (2011).*

Keywords Endocrine disruptors · Fetal testis · Development · Organotypic culture · In vitro toxicological assay · Phthalates

Altération de la fonction reproductive masculine

Les changements environnementaux et leurs conséquences sur la fonction reproductive masculine sont une préoccupation majeure depuis ces 20 dernières années [1–4]. Les altérations de la fonction de reproduction masculine ont d'abord été observées dans la faune sauvage. De nombreuses études décrivent les effets de contaminations de l'environnement naturel par des produits chimiques estrogéniques ou anti-androgéniques. Ces changements engendrent des modifications subtiles, voire permanentes telles que la féminisation ou des variations du comportement reproducteur

[2,5]. Guillette et al. ont étudié les fonctions reproductives d'alligators mâles du lac Apopka qui avait été pollué par un important déversement accidentel de produits chimiques de type DDT en 1980. Ces animaux ont des niveaux plus faibles de testostérone, un micropénis et des structures testiculaires désorganisées [6,7]. Au contraire, aucune de ces altérations n'a été observée chez les alligators du lac Woodruff situé à proximité, mais n'ayant pas été pollué. Il est important de souligner qu'aucun produit chimique n'a pu être détecté dans les eaux du lac Apopka au moment de ces études. Par conséquent, les alligators ont simplement été exposés de par leur position au sommet de la chaîne alimentaire. D'autres perturbations ou altérations de l'activité et de la physiologie reproductive ont été corrélées avec l'exposition des poissons, des amphibiens, des reptiles, des oiseaux et des mammifères à des polluants (pour détail voir la revue de Vos et al. et Edwards et al. [5,8]). La plupart des effets décrits sur la faune sauvage ont été observés chez des organismes aquatiques, cela étant lié à la concentration de polluants au cours de la chaîne alimentaire. Chez l'homme, plusieurs données rapportent que le sex-ratio à la naissance est altéré dans les régions industrielles et par l'exposition à des produits chimiques industriels et environnementaux. Les conclusions du rapport de la communauté Aamjiwnaang First Nation au Canada sont frappantes [9], c'est-à-dire la proportion de garçons à la naissance a régulièrement diminué entre 1990 et 2003 dans cette communauté, le sex-ratio étant seulement de 0,3 actuellement. Beaucoup d'études épidémiologiques convergent pour montrer un accroissement des troubles de la fonction reproductrice chez l'homme au cours des 50 dernières années (Fig. 1). Le cancer testiculaire, qui est le cancer le plus fréquent chez l'homme jeune, a régulièrement augmenté

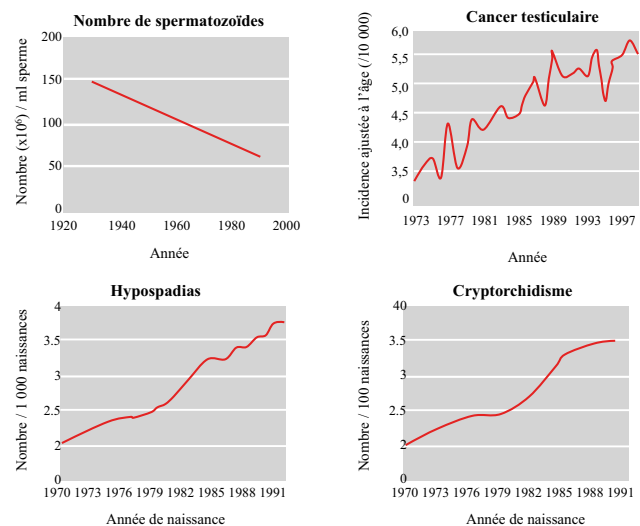


Fig. 1 Évolution du nombre de spermatozoïdes et des anomalies de l'appareil de reproduction masculin au cours des dernières décennies. Ces données sont issues de [1,10]

dans tous les pays où les études ont été réalisées, passant par exemple de 3,4 pour 10 000 en 1973 à 5,5 pour 10 000 en 1997 en Amérique du Nord [10]. Si la diminution de la production de spermatozoïdes reste contestée par certaines études locales, les études prospectives à grande échelle utilisant des méthodes normalisées ont montré un déclin de 150 à 70 millions de spermatozoïdes par millilitre entre 1940 et 1990 en Europe [1,11]. Enfin, les cas d'hypospadias et de cryptorchidie se sont aussi fortement accrus, passant de 0,2 et 2 % respectivement en 1970 à 0,38 et 3,5 % respectivement en 1991 [10].

Ces quatre anomalies (cancer testiculaire, baisse du nombre de spermatozoïdes, hypospadias et cryptorchidie) semblent être liées entre elles. Par exemple, une étude comparative faite dans divers pays européens a montré que l'incidence de chacune de ces quatre altérations est maximale au Danemark et minimale en Finlande [12]. De plus, la cryptorchidie est un facteur de risque des trois autres désordres [13], avec un facteur de 3 à 17 dans le cas du cancer testiculaire [14]. De même, l'hypospadias augmente les risques de développer un cancer testiculaire [1] ainsi que l'oligospermie [15,16]. Par conséquent, il a été suggéré que ces quatre altérations seraient les symptômes d'un même syndrome : le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) [16,17].

Ces anomalies surviennent durant le développement fœtal

Le testicule fœtal est formé par les cellules somatiques en croissance à la surface du mésonéphros et par les cellules germinales primordiales qui colonisent la gonade et qui sont appelées gonocytes [18,19]. Le testicule fœtal exerce deux fonctions cruciales : la gamétogenèse et la stéroïdogénèse (Fig. 2). Les cellules de Leydig fœtales secrètent de la testostérone et de l'*insuline like hormone 3* (InsI3) qui sont primordiales pour assurer la masculinisation de l'embryon [20,21]. Après la naissance, les gonocytes deviennent des spermatogonies souches adultes. Le développement normal de la lignée des cellules germinales pendant la vie embryonnaire/fœtale est donc essentiel pour la production de spermatozoïdes durant toute la vie adulte.

L'hypothèse la plus couramment admise est que le TDS serait dû à des perturbations survenant lors du développement des testicules chez le fœtus [16]. L'hypospadias résulte d'une altération de la production ou de l'action des androgènes durant le développement fœtal alors que la cryptorchidie résulte d'anomalies de la production et/ou de l'action de InsI3 et/ou des androgènes régulant la descente transabdominale et transinguinale des testicules [21]. Beaucoup de travaux suggèrent que le cancer testiculaire aurait une origine

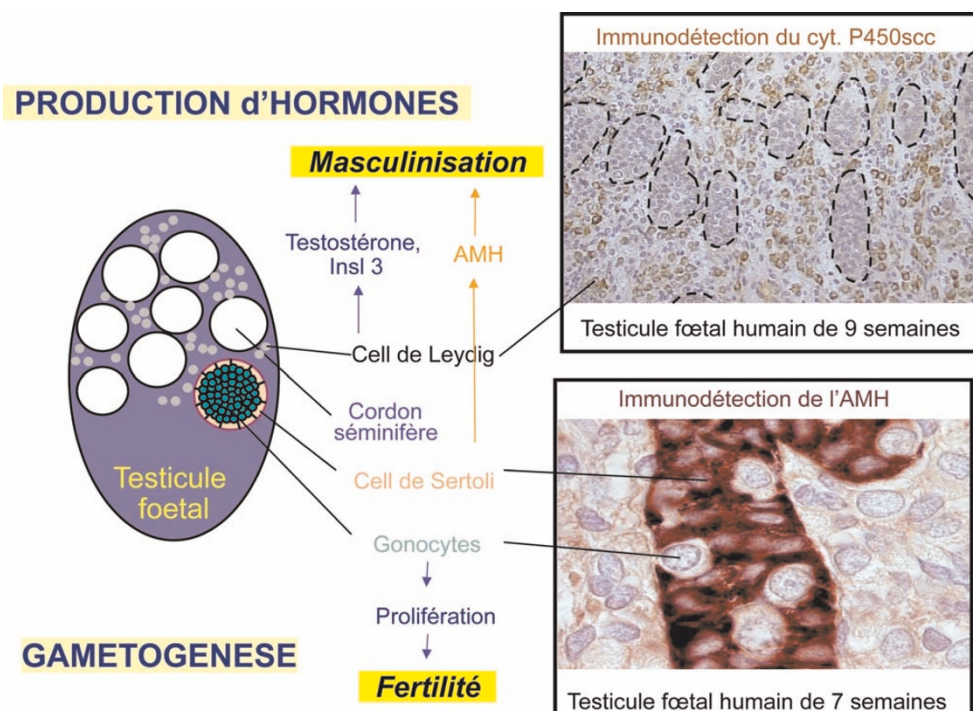


Fig. 2 Les deux fonctions du testicule fœtal : le testicule fœtal produit des hormones indispensables à la masculinisation phénotypique du fœtus et assure la mise en place de la lignée germinale indispensable à la fertilité adulte. Les microphotographies mettent en évidence les cellules de Leydig (microphotographie du haut) et de Sertoli (microphotographie du bas) par révélation immunohistologique du cytochrome P450 *side chain cleavage* (P450 scc) et de l'hormone antimüllérienne (AMH) respectivement

foetale et résulterait d'une anomalie du développement des gonocytes [17,22]. Le carcinome in situ (CIS) qui est une lésion locale maligne précédant le cancer testiculaire (séminomes et non-séminomes) montre des cellules ayant des caractéristiques voisines des gonocytes en termes de morphologie et de marqueurs immunohistologiques (c-kit, phosphatase alcaline, etc.) [23]. De multiples raisons peuvent expliquer la diminution de la production spermatique observée au cours des dernières décennies et, parmi elles, une altération du développement de la lignée germinale foetale. Le stock de gonocytes, défini durant la vie foetale, détermine le nombre de cellules germinales souches chez l'adulte. La réduction expérimentale du nombre de gonocytes durant le développement foetal entraîne une diminution de la production de spermatozoïdes chez l'adulte [24]. Des résultats similaires ont été obtenus quand le nombre de cellules de Sertoli est réduit durant la vie périnatale [25]. Par conséquent, la production de spermatozoïdes chez l'adulte dépend en partie du développement des cordons séminifères foetaux. De nombreuses données cliniques, épidémiologiques et expérimentales soutiennent l'hypothèse que le TDS est engendré par les perturbateurs endocriniens agissant durant la vie foetale ou néonatale [2,26–28]. Ainsi, il est clairement établi que la période foetale est une période particulièrement sensible à la perturbation endocrinienne [2,4]. Il convient cependant de souligner ici que cette hypothèse n'est pas exclusive. L'exposition à des perturbateurs endocriniens limitée à la vie

adulte est également susceptible d'altérer les fonctions de reproduction masculine en l'absence d'exposition préalable pendant la vie foetale. Les perturbateurs endocriniens ont augmenté quantitativement et qualitativement dans notre environnement durant ces dernières décennies. Leurs sources sont diverses, incluant les plantes (phytoestrogènes), l'agriculture (insecticides, herbicides, fongicides) et de nombreux produits chimiques (produits pharmaceutiques, plastiques, résines, détergents, PCB, retardateurs de flamme, bisphénol A, parabens antimicrobiens, dioxines, cadmium...). Dans cette revue, nous nous sommes focalisés sur les phtalates.

Exposition aux phtalates présents dans l'environnement

Les phtalates sont des esters de l'acide phtalique (Fig. 3). Ce sont des composés industriels de plus en plus utilisés depuis 1930. Leur production mondiale est passée de 1,8 à 4,3 millions de tonnes entre 1970 et 2006. Ils sont ajoutés aux polymères pour rendre le PVC plus doux et flexible. Ils entrent dans la composition d'une large gamme de produits en PVC comme les matériaux de construction tels que les câbles, les planchers, les murs et les toits. Ils entrent dans la composition d'équipements médicaux, de tuyaux, des rideaux de douche, des films plastiques, des jouets, de l'intérieur des voitures, des vêtements, des emballages

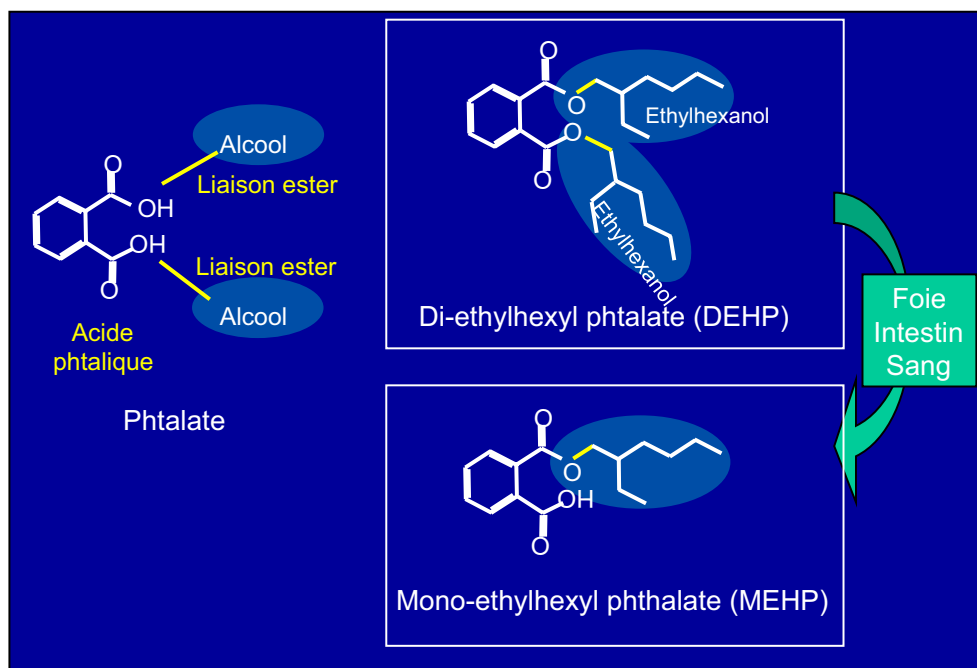


Fig. 3 Structure et métabolisme du DEHP : un phtalate est formé par l'estérification de l'acide phtalique avec un ou deux alcools. Lorsque l'alcool est l'hexanol, le phtalate est le diéthylhexyl phtalate (DEHP) ou le monoéthylhexyl phtalate (MEHP). Le DEHP est le phtalate largement utilisé pour la fabrication de très nombreux objets. Il est biologiquement très peu actif, mais il est facilement transformé en MEHP par l'organisme, qui, lui, est biologiquement actif

alimentaires, des capsules médicamenteuses... Les phtalates sont aussi utilisés comme solvants dans les huiles, les insecticides et dans d'autres produits organiques. Ils sont additionnés aux peintures et laques, aux adhésifs et mastics, aux cosmétiques, aux lubrifiants, aux parfums, aux déodorants, aux sprays... Le di(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP) est le plus largement utilisé, 1,5 million de tonnes sont produites chaque année dans le monde (40 % en Europe). Les phtalates n'étant pas liés de façon covalente aux plastiques, ils peuvent s'infiltrer dans les produits au cours du temps. À titre d'exemple, ils sont retrouvés dans les poussières domestiques [29]. L'exposition cutanée par les vêtements et les cosmétiques a aussi été observée ainsi que la contamination via les équipements médicaux. Les hommes sont constamment exposés aux phtalates par voies orale, cutanée et par inhalation [30,31]. Dans l'organisme, les phtalates sont rapidement hydrolysés par des estérases dans l'intestin et dans d'autres tissus en monoesters qui sont les molécules actives [32]. Par exemple, le DEHP est métabolisé en mono-(2-éthylhexyl)phtalate (MEHP) (Fig. 3) et le DBP en monobutyl phtalate (MBP). Alors que beaucoup des perturbateurs endocriniens persistent dans l'environnement et s'accumulent dans les graisses, la demi-vie des phtalates n'excède pas 36 heures dans l'organisme. Chez l'homme, 75 % du DEHP ingéré est métabolisé et excrété dans les urines dans les deux jours qui suivent l'absorption [33]. Cependant, comme les phtalates sont largement répandus dans l'environnement, l'être humain y est exposé de façon chronique. Selon une étude publiée en 2003, 12 % des Allemands sont exposés à une dose journalière de DEHP supérieure aux recommandations européennes qui est de 37 µg/kg de poids corporel par jour [34]. Dans une étude épidémiologique, au moins quatre phtalates différents ont été retrouvés dans les urines de 75 % des hommes [35]. Les concentrations de phtalates dans les fluides biologiques humains montrent de grandes variations individuelles [36–41]. Les valeurs de MEHP sont reportées dans le Tableau 1, celles du MBP sont similaires ou plus élevées. Les concentrations urinaires chez les femmes enceintes

peuvent atteindre 5×10^{-6} M. Les données les plus récentes rapportent des taux moyens dans les urines et dans le liquide amniotique de 4×10^{-7} M pour le MBP et 8×10^{-8} M pour le MEHP [41]. Les concentrations maximales de MEHP observées dans le liquide amniotique sont de 8×10^{-6} M.

Effets des phtalates sur le développement et les fonctions du testicule chez les rongeurs : études in vivo

Les premières observations d'une atteinte testiculaire par les phtalates ont été rapportées dès 1945 chez le rat adulte [42]. Cette étude montre qu'une incorporation de 1,5 % de DEHP dans l'alimentation du rat pendant 90 jours induit une atrophie des tubules séminifères et une dégénération testiculaire. Par la suite, une atrophie tubulaire occasionnelle chez des rats absorbant 0,5 % de DEHP dans leur nourriture pendant 3 ou 24 mois a été décrite [43]. D'autres groupes ont confirmé et exploré les effets testiculaires des phtalates chez le rat adulte [44].

De nombreuses études conduites chez le rat ont montré que l'exposition in utero au di(n-butyl)phtalate (DBP) ou DEHP entraînent des altérations du développement des différents types cellulaires testiculaires [27,45]. Les perturbations du développement et des fonctions des cellules de Leydig ont beaucoup été étudiées [46–50]. L'exposition in utero aux phtalates induit une agrégation anormale des cellules de Leydig, l'apparition de cellules de Leydig au sein de l'épithélium séminifère, une réduction de la production de testostérone fœtale et de l'expression de l'Insl3. Cela conduit à une agénésie épидidymaire, une réduction de la distance anogénitale, un hypospadias et une cryptorchidie. De plus, l'exposition in utero aux phtalates induit la prolifération subnormale des cellules de Sertoli [51] et une modification de leur fonction [52]. Enfin, une formation de gonocytes multinuclés durant la vie néonatale et une réduction de la spermatogenèse chez l'adulte ont été décrites [52,53]. En conclusion, l'exposition in utero aux phtalates résulte en un ensemble de troubles comparables au TDS

Tableau 1 Concentration de MEHP dans les fluides biologiques de la grossesse et de l'allaitement chez la femme

Liquide biologique	Concentration minimum (M)	Concentration maximum (M)	Référence
Urine de femme enceinte	5×10^{-9}	8×10^{-8}	[37]
Urine de femme enceinte	5×10^{-9}	3×10^{-8}	[38]
Urine de femme enceinte	5×10^{-8}	5×10^{-7}	[41]
Liquide amniotique	$< 3 \times 10^{-9}$	4×10^{-7}	[41]
Sang du cordon ombilical	Non détectable	8×10^{-6}	[36]
Lait	5×10^{-9}	5×10^{-6}	[39]
Lait	2×10^{-9}	2×10^{-8}	[40]
Plasma de mères allaitantes	2×10^{-9}	2×10^{-8}	[40]
Plasma de mères allaitantes	10^{-8}	2×10^{-7}	[40]

excepté pour le cancer testiculaire. Un seul papier s'intéresse à la souris *in vivo*. Il rapporte que l'exposition *in utero* des phtalates perturbe le développement de la gamétogenèse sans altérer la stéroïdogénèse des testicules fœtaux de souris [54].

Effets des phtalates sur le développement et les fonctions du testicule chez les rongeurs : études *in vitro*

L'approche *in vitro* a aussi été utilisée pour étudier les effets de phtalates sur le testicule fœtal de rat et de souris. Cette approche permet facilement d'analyser les effets de molécules en fonction du temps et de la dose. Pour que ces études *in vitro* soient pertinentes en toxicologie, il faut que l'activité et le devenir des cellules *in vitro* reproduisent la situation observée *in vivo*. Chez les mammifères, dans les systèmes de culture cellulaire, les cellules de Leydig fœtales se différencient en l'absence de stimulation gonadotrope spécifique [55–57]. Les gonocytes isolés survivent peu dans de tels systèmes [58,59]. Dès les années 1990, le système de culture organotypique qui préserve l'architecture testiculaire et les communications intercellulaires nous est apparu comme une méthode satisfaisante pour maintenir le développement du testicule fœtal et néonatal. De plus, un testicule peut être cultivé en présence des molécules à tester, alors que le testicule contralatéral peut servir de témoin remarquable, puisqu'il est exactement au même stade de développement. Dans cette perspective, une technique originale utilisant un système de filtre a été développée par notre équipe (Fig. 4) [60]. Cette technique reproduit le développement morphométrique, fonctionnel et moléculaire des cellules de Leydig, de Sertoli et des cellules germinales observé *in vivo* [56,57,61–64]. Le système de culture organotypique s'est révélé être un outil très puissant pour étudier les effets directs des perturbateurs endocriniens sur le développement et les fonctions du testicule fœtal en fonction de l'âge, du temps et de la dose [64]. Nous avons nommé cette méthode : *the rat fetal testis assay* (rFETA). Puis, nous avons étendu cette méthode au testicule fœtal de souris et d'humain [64–66] et nous avons appelé ces techniques mFETA (*mouse* FETA) et hFETA (*human* FETA) respectivement. Trois études ont été conduites pour analyser les effets des phtalates sur le développement et les fonctions du testicule fœtal de rat *in vitro*. Li et Kim, en utilisant un système de filtre comparable au nôtre, ont montré une altération du développement des cellules de Sertoli et des gonocytes [67]. L'équipe de Sharpe utilise un système de culture différent du nôtre et a observé une diminution de la production de testostérone stimulée par l'hCG, mais pas de modification de la production de testostérone basale [68]. L'équipe de Bernard Jégou, chez qui nous avons transféré notre système de culture, a observé une diminution de la production de testostérone, une altération des fonctions sertolien-

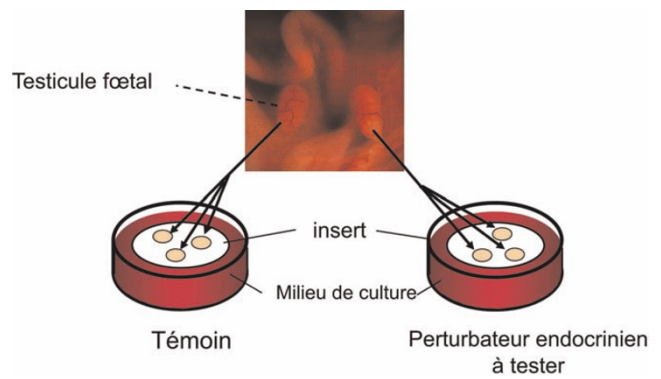


Fig. 4 Un nouveau test toxicologique. Les testicules fœtaux sont prélevés, découpés en morceaux et placés sur un filtre qui flotte à la surface du milieu. Dans ce système, appelé *fetal testis assay* (FETA) qui maintient l'architecture testiculaire et les communications intercellulaires, tous les types cellulaires se développent. En outre, un testicule peut être cultivé en présence du perturbateur endocrinien à tester, alors que le testicule contralatéral est cultivé en son absence et sert de témoin. L'équipe de René Habert a mis au point ce test à partir de testicules fœtaux de rat (rFETA) [60–64], de souris (mFETA) [64] et d'Homme (hFETA, en collaboration avec le service de René Frydman) [65,66]. Les testicules photographiés dans cette figure sont des testicules fœtaux humains

nes et un accroissement de l'apoptose germinale [69]. Chez la souris, nous avons apporté la première analyse *in vitro* de l'effet d'un phtalate sur le développement du testicule fœtal et néonatal [70]. Nous avons montré que les phtalates induisent une apoptose germinale et une réduction de l'expression de l'AMH quelque soit l'âge du testicule fœtal cultivé. De façon surprenante, nous avons montré que le MEHP induit une augmentation de la production de testostérone chez les testicules embryonnaires murins jeunes et au contraire, une diminution de cette production en fin de vie fœtale ou en début de vie néonatale. Le MEHP provoque une augmentation de l'apoptose des gonocytes à tous les stades où cette apoptose existe naturellement. Tous ces effets sont maintenus après invalidation du récepteur des androgènes démontrant ainsi l'androgéno-indépendance de l'effet délétère du MEHP. De même, alors que nous avons démontré que les estrogènes inhibent le développement des gonocytes via le récepteur bêta (ER bêta), l'effet délétère du MEHP est maintenu chez les testicules invalidés pour ER bêta, démontrant également l'estrogéno-indépendance de l'effet du MEHP sur la gamétogenèse fœtale et néonatale.

Effets des phtalates sur le développement et les fonctions du testicule fœtal humain : études épidémiologiques

Malgré le nombre important d'études concernant la toxicité des phtalates dans les modèles animaux, nous disposons en

fait de très peu d'informations sur leurs effets sur le développement de la fonction reproductive chez l'homme.

Les études épidémiologiques sont très difficiles à réaliser en raison du délai entre l'exposition fœtale et leurs conséquences à l'âge adulte. Ainsi, la diminution de la concentration des spermatozoïdes dans le sperme peut résulter d'une exposition à de très nombreux facteurs tels que les perturbateurs endocriniens, l'alcool, le tabac et le stress individuel pendant la vie adulte. En outre, parmi la multiplicité des facteurs agissant pendant la vie fœtale, l'identification d'un facteur impliqué est difficile d'autant plus que l'effet d'un même facteur peut différer en fonction du contexte environnemental. Enfin, il est important de prendre en compte la période d'exposition. Par exemple, une corrélation entre un faible nombre de spermatozoïdes chez l'homme adulte et l'exposition de leur mère au diéthylstilbestrol (DES), durant leur grossesse, a pu être mise en évidence seulement si on ne retient que les données correspondants à un traitement effectué durant le premier trimestre de grossesse [71]. Récemment, la distance anogénitale a été choisie chez l'homme comme un index de masculinisation et de l'activité androgénique du testicule. Une corrélation inverse a été trouvée entre la distance anogénitale mesurée chez les garçons âgés de 2–36 mois (en moyenne 12,6 mois) et les concentrations urinaires maternelles de MBP et de trois autres métabolites monoesters de phtalates mesurées à la fin de la grossesse [38]. De la même manière, une interaction dose-dépendante entre les phtalates dans le lait maternel et les niveaux d'hormones reproductives chez les garçons de trois mois a été observée [39]. Cependant, un article récent de Huang et al. n'indique aucune relation entre la distance anogénitale mesurée chez les garçons à la naissance et la concentration de phtalates dans le liquide amniotique ou dans l'urine maternelle durant la grossesse [41]. Prises dans leur ensemble, ces études épidémiologiques suggèrent

que quelques phtalates, aux concentrations environnementales, ont des effets antiandrogéniques durant la vie néonatale, mais leurs effets pendant la vie fœtale n'ont pas été clairement démontrés.

Effets des phtalates sur le développement et les fonctions du testicule fœtal humain : études in vitro

Récemment, notre équipe a mis en évidence expérimentalement pour la première fois les effets délétères des phtalates sur les fonctions ou le développement testiculaire humain [72]. Dans le cadre d'une collaboration avec le service de gynécologie-obstétrique dirigé par René Frydman, nous avons analysé par des méthodes morphologiques, fonctionnelles et moléculaires l'impact du MEHP sur le développement des différents types cellulaires du testicule fœtal humain dans notre système de culture organotypique [65,66] (Fig. 4). Les testicules fœtaux humains ont été prélevés durant le premier trimestre (7–12 semaines) de la grossesse. Cette période du développement est une fenêtre temporelle cruciale dans la détermination du tractus reproducteur [73]. Les testicules ont été cultivés pendant trois jours avec ou sans MEHP dans des conditions basales ou stimulées avec l'hormone lutéinisante (LH). Quelle que soit la dose, le MEHP n'a pas eu d'effet sur la production de testostérone basale ou stimulée par la LH. Le MEHP n'a pas modifié l'expression des ARNm des acteurs de la stéroïdogenèse : P450c17, P450scc ou StAR. De même, nous n'avons observé aucune modification de l'expression de l'Insl3 qui est produit par les cellules de Leydig fœtales et qui est impliqué dans la descente testiculaire. Le MEHP (10^{-4} M) ne modifie ni la prolifération ni l'apoptose des cellules de Sertoli, mais il réduit l'expression de l'ARNm

Tableau 2 Variation interspécifique de la sensibilité à un perturbateur endocrinien, le MEHP. En utilisant le même système de culture (système FETA), une même concentration de MEHP (10^{-4} M) réduit la production de testostérone chez le rat mais pas chez l'Homme. Chez la souris, son effet sur la production de testostérone dépend de l'âge fœtal. Dans les trois espèces étudiées, le MEHP réduit le développement de la lignée germinale en augmentant l'apoptose

	Nombre de cellules germinales fœtales	Mort des cellules germinales fœtales	Production de testostérone	Référence
Homme	↘	↗	→	[72]
Souris	↘	↗	↔	[70]
Rat	↘	↗	↘	[69]

de l'hormone antimüllérienne. Par contre, le MEHP (10^{-4} M) diminue le nombre de cellules germinales en augmentant leur apoptose mesurée par la détection des cellules germinales caspase-3-positives, sans modification de leur prolifération. Il s'agissait de la première mise en évidence expérimentale directe de l'effet d'un perturbateur endocrinien sur les fonctions de reproduction masculine. Rappelons qu'en utilisant le même système de culture chez les rongeurs, il a été montré récemment, que les phtalates agissent sur la gamétogenèse fœtale/néonatale, mais, contrairement à l'homme, ils modifient la production d'androgènes [69,70]. Cela met en évidence les différences de réceptivité aux perturbateurs endocriniens entre le modèle rongeur et le modèle humain (Tableau 2) et souligne combien les études de toxicologie, qui ne peuvent évidemment être réalisées à grande échelle que sur des modèles animaux, doivent impérativement être comparées au modèle humain.

Remerciements : Ce travail a été soutenu par l'université Paris Diderot–Paris-VII, le CEA, l'Inserm, l'Agence nationale pour la recherche (projet Phtalatestis 2008–2010) et le ministère de l'Écologie, du Développement durable, des Transports et du Logement (projet STORM, Ineris 2010–2012). V.M. et A.L. sont titulaires de bourses du ministère de l'Éducation nationale de la Recherche et de la Technologie. R.L. a bénéficié d'une bourse du Commissariat à l'énergie atomique. Nous remercions l'équipe du service obstétrique-gynécologique de l'hôpital Antoine-Béclère (Clamart, France). Nous remercions Aurélie Gouret pour sa précieuse aide pour le secrétariat et la gestion.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Sharpe RM, Irvine DS (2004) How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 328:447–51
- Delbès G, Levacher C, Habert R (2006) Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 132:527–38
- Leridon H, Slama R (2008) The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology. *Hum Reprod* 23:1312–9
- Scott HM, Mason JJ, Sharpe RM (2009) Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev* 30:883–925
- Vos JG, Dybing E, Greim HA, et al (2000) Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30:71–133
- Guillette LJ Jr, Guillette EA (1996) Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health? *Toxicol Ind Health* 12:537–50
- Guillette LJ Jr, Gross TS, Masson GR, et al (1994) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102:680–8
- Edwards TM, Moore BC, Guillette LJ Jr (2006) Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view. *Int J Androl* 29:109–21
- Mackenzie CA, Lockridge A, Keith M (2005) Declining sex-ratio in a first nation community. *Environ Health Perspect* 113:1295–8
- Toppari J (2002) Environmental endocrine disruptors and disorders of sexual differentiation. *Semin Reprod Med* 20:305–12
- Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P (1995) Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 332:281–5
- Virtanen HE, Rajpert-De Meyts E, Main KM, et al (2005) Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders. *Toxicol Appl Pharmacol* 207:501–5
- Kaleva M, Virtanen HE, Haavisto AM, et al (2005) Circannual rhythm in the incidence of cryptorchidism in Finland. *Int J Androl* 28:53–57
- Davenport M (1997) Risk of testicular cancer in boys with cryptorchidism. Study was based on small number of cancers. *BMJ* 315:1462–3
- Moller H, Skakkebaek NE (1999) Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *BMJ* 318:559–62
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16:972–8
- Skakkebaek NE, Jorgensen N (2005) Testicular dysgenesis and fertility. *Andrologia* 37:217–8
- Olaso R, Habert R (2000) Genetic and cellular analysis of male germ cell development. *J Androl* 21:497–511
- Rouiller-Fabre V, Lambrot R, Muczynski V, et al (2008) Development and regulations of testicular functions in the human fetus. *Gynecol Obstet Fertil* 36:898–907
- Habert R, Lejeune H, Saez JM (2001) Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 179:47–74
- Kubota Y, Temelcos C, Bathgate RA, et al (2002) The role of insulin 3, testosterone, Mullerian inhibiting substance and relaxin in rat gubernacular growth. *Mol Human Reprod* 8:900–5
- Skakkebaek NE, Bancroft J, Davidson DW, Warner P (1981) Androgen replacement with oral testosterone undecanoate in hypogonadal men: a double blind controlled study. *Clin Endocrinol* 14 49–61
- Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Brondum-Nielsen K, et al (1998) Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS* 106:198–204
- Forand A, Messiean S, Habert R, Bernardino-Sgherri J (2009) Exposure of the mouse perinatal testis to radiation leads to hypospemia at sexual maturity. *Reproduction* 137:487–95
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA (1988) Evidence from Sertoli cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122:787–94
- Sharpe RM (2006) Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:91–110
- Sharpe RM, Skakkebaek NE (2008) Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 89(2 Suppl):e33–e8
- Wohlfahrt-Weje C, Main KM, Skakkebaek NE (2009) Testicular dysgenesis syndrome: fetal origin of adult reproductive problems. *Clin Endocrinol* 71:459–65
- Becker K, Seiwert M, Angerer J, et al (2004) DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *Int J Hyg Environ Health* 207:409–17
- Koch HM, Pruss R, Angerer J (2006) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure — an update and latest results. *Int J Androl* 29:155–65

31. Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K (2006) What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal* 26:803–24
32. Latini G (2005) Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chim Acta* 361:20–9
33. Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J (2005) New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuteriumlabeled DEHP. *Arch Toxicol* 79:367–76
34. Koch HM, Drexler H, Angerer J (2003) An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Hyg Environ Health* 206:77–83
35. Blount BC, Silva MJ, Caudill SP, et al (2000) Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect* 108:979–82
36. Latini G, De Felice C, Presta G, et al (2003) In utero exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 111:1783–5
37. Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, et al (2004) Urinary levels of seven phthalate metabolites in the US population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2000. *Environ Health Perspect* 112:331–8
38. Swan SH, Main KM, Liu F, et al (2005) Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 113:1056–61
39. Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, et al (2006) Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 114:270–6
40. Högberg J, Hanberg A, Berglund M, et al (2008) Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Perspect* 116:334–9
41. Huang PC, Kuo PL, Chou YY, et al (2009) Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int* 35:14–20
42. Shaffer CB, Carpenter CP, Smyth HR Jr (1945) Acute and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate with note upon its metabolism. *J Ind Hyg Toxicol* 27:130–5
43. Harris RS, Hodge HC, Maynard ER, et al (1956) Chronic oral toxicity of 2-ethylhexyl phthalate in rats and dogs. *Arch Ind Hyg* 13:259–64
44. Gangolli SD (1982) Testicular effects of phthalate esters. *Environ Health Perspect* 45:77–84
45. Foster PM (2006) Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl* 29:140–7
46. Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PM (2000) Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl)phthalate during late gestation. *Toxicol Sci* 55:143–51
47. Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, et al (2000) The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 58:339–49
48. Mahood IK, Hallmark N, McKinnell C, et al (2005) Abnormal Leydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di(n-butyl)phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology* 146:613–23
49. McKinnell C, Sharpe RM, Mahood K, et al (2005) Expression of insulin-like factor 3 protein in the rat testis during fetal and postnatal development and in relation to cryptorchidism induced by in utero exposure to di(n-butyl)phthalate. *Endocrinology* 146:4536–44
50. Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, et al (2008) A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol Sci* 105:153–65
51. Auharek SA, de Franca LR, McKinnell C, et al (2010) Prenatal plus postnatal exposure to di(n-butyl)phthalate and/or flutamide markedly reduces final Sertoli cell number in the rat. *Endocrinology* 151:2868–75
52. Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM (2003) Human “testicular dysgenesis syndrome”: a possible model using in utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 18:1383–94
53. Ferrara D, Hallmark N, Scott H, et al (2006) Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl)phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 147:5352–62
54. Gaido KW, Hensley JB, Liu D, et al (2007) Fetal mouse phthalate exposure shows that gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 97:491–503
55. Gautier C, Levacher C, Saez JM, Habert R (1997) Transforming Growth Factor β 1 inhibits steroidogenesis in dispersed fetal testicular cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 131:21–30
56. Rouiller-Fabre V, Carmona S, Abou-Merhi R, et al (1998) Effect of antimüllerian hormone (AMH) on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats. *Endocrinology* 139:1213–20
57. Rouiller-Fabre V, Lecerf L, Gautier C, et al (1998) Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 139:2926–34
58. Van Dissel-Emiliani FM, de Boer-Brouwer M, Spek ER, et al (1993) Survival and proliferation of rat gonocytes in vitro. *Cell Tissue Res* 273:141–7
59. Boulogne B, Habert R, Levacher C (2003) Regulation of the proliferation of cocultured gonocytes and Sertoli cells by retinoids, triiodothyronine, and intracellular signaling factors: differences between fetal and neonatal cells. *Mol Reprod Dev* 65:194–203
60. Habert R, Devif I, Gangnerau MN, Lecerf L (1991) Ontogenesis of the in vitro response of rat testis to gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Endocrinol* 82:199–206
61. Lecerf L, Rouiller-Fabre V, Levacher C, et al (1993) Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on basal and luteinizing hormone-stimulated testosterone secretion by fetal rat testis in vitro. *Endocrinology* 133:2313–8
62. Olaso R, Pairault C, Boulogne B, et al (1998) Transforming Growth Factor β 1 and β 2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. *Endocrinology* 139:733–40
63. Livera G, Rouiller-Fabre V, Durand P, Habert R (2000) Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biol Reprod* 62:1303–14
64. Livera G, Delbès G, Pairault C, et al (2006) Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 324:507–21
65. Lambrot R, Coffigny H, Pairault C, et al (2006) Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. *J Clin Endoc Metab* 91:2696–703
66. Lambrot R, Livera G, Coffigny H, et al (2006) A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie* 88:1831–5
67. Li H, Kim KH (2003) Effects of mono-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal and neonatal rat testis organ cultures. *Biol Reprod* 69:1964–72
68. Hallmark N, Walker M, McKinnell C, et al (2007) Effects of monobutyl and di(n-butyl)phthalate in vitro on steroidogenesis and Leydig cell aggregation in fetal testis explants from the rat:

- comparison with effects in vivo in the fetal rat and neonatal marmoset and in vitro in the human. *Environ Health Perspect* 115:390–6
69. Chauvigné F, Menuet A, Lesné L, et al (2009) Time- and dose-related effects of di(2-ethylhexyl)phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect* 117:515–21
 70. Lehterä A, Racine C, Krust A, et al (2009) Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 111:372–82
 71. Storgaard L, Bonde JP, Olsen J (2006) Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies. *Reprod Toxicol* 21:4–15
 72. Lambrot R, Muczynski V, Lécureuil C, et al (2009) Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 117:32–7
 73. Welsh M, Saunders PT, Fisk M, et al (2008) Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 118:1479–90



springer.com

Sign up for SpringerAlerts

The best way to keep you up-to-date with new developments in your field!

You can customize your SpringerAlerts to deliver exactly the information you need!

We offer

- ▶ Table of Contents Alerts for Journals
- ▶ Table of Contents Alerts for Book Series
- ▶ New Book Alert

As an alerts subscriber, you will receive

- ▶ Reliable news about journals and upcoming books
- ▶ Special offers – be the first to know about free online access to journals and discounts on books

springer.com/alerts – fast, free and flexible



011759a