

Université du Québec
Institut Nationale de la Recherche Scientifique
INRS – Institut Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**Criblage de la toxicité et du potentiel perturbateur endocrinien de
plastifiants et d'ignifugeants émergents en culture organotypique de
testicules fœtaux de rat**

Par
Sarah Tardif

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
examinatrice interne

Isabelle Plante
INRS – Institut Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Jacques Tremblay
Centre de recherche du CHU de
Québec – Université de Laval –
Département d'obstétrique, de
gynécologie et de reproduction

Directrice de recherche

Géraldine Delbès
INRS – Institut Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Géraldine Delbès, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis de réaliser un stage d'été et ma maîtrise. Je lui suis énormément reconnaissante pour sa confiance, son soutien et ses précieux conseils.

Merci également aux membres de mon jury d'évaluation, les Professeurs Isabelle Plante et Jacques Tremblay, pour avoir accepté de réviser ce mémoire. À Bernard Robaire et à toute son équipe, merci pour leur collaboration et leur contribution à ce projet de recherche.

Merci à tous les membres de mon laboratoire, Arlette Rwigemera, Rhizlane El Omri, Laetitia Lecante et Victoria Dumaine, pour leurs conseils techniques et leur soutien moral. Je voudrais remercier particulièrement ma collègue Arlette Rwigemera pour m'avoir appris pratiquement toutes les techniques nécessaires pour mener ce projet de recherche à terme. Merci à nos stagiaires, Léa Baudre, Eugénie Mukula et Antoine Gillet pour avoir donné de la vie au laboratoire lors de leur bref passage.

Merci aux Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), au Centre de recherche interdisciplinaire sur le bien-être, la santé, la société et l'environnement (Cinbiose), au Réseau Québécois en Reproduction (RQR) et au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), les organismes subventionnaires sans qui je n'aurais pu accomplir ce projet de recherche.

Pour leur support à tous les niveaux, j'aimerais remercier la future marraine de ma fille à naître, Aracelia Carosielli-Gonzalez, ainsi que mes parents et mon amie Isabelle Morneau.

Pour finir, merci à mon mari, Charles Lapointe, sur qui je pourrai toujours compter.

RÉSUMÉ

Désignés comme perturbateurs endocriniens (PE) dans les dernières années, le bis (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP), un plastifiant, et le 2,2',4,4'-tétrabromodiphényléther (BDE-47), un ignifugeant, sont actuellement réglementés et remplacés par des substituts dont la toxicité est inconnue. Trois substituts du DEHP, le phtalate de diisononyl (DiNP), l'adipate de diisodécyle (DIDA) et le diisobutyrate de 2,2,4-triméthyl-1,3-pentanediol (TXIB), et deux substituts du BDE-47, le phosphate de tributoxyéthyle (TBEP) et le phosphate de triphényle isopropylé (IPPP), ont été évalués et comparés aux produits qu'ils remplacent en utilisant un modèle de culture organotypique de testicules fœtaux de rat. Les sécrétions journalières de testostérone basales et stimulées par la LH ont été mesurées par dosage immuno-enzymatique (ELISA). Après trois jours de culture, la densité et le taux de prolifération des principaux types de cellules testiculaires ont été analysés par immunofluorescence. À 10^{-5} M, seul le MEHP a induit une diminution significative des sécrétions de testostérone, de la densité des cellules germinales et de la prolifération des cellules de Sertoli. Les résultats n'indiquent aucune preuve d'un potentiel PE et d'une toxicité marquée des substituts, mais devront être appuyés par davantage de réplicats afin de déterminer si d'autres études toxicologiques sont nécessaires.

Mots-clés : Testicule fœtal, plastifiants, retardateurs de flamme, culture organotypique, testostérone, cellules de Leydig, cellules de Sertoli, cellules germinales.

Sarah Tardif
Étudiante

Pre Géraldine Delbès
Directrice de recherche

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	5
1. PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.....	5
1.1. <i>Définition</i>	5
1.2. <i>Les sources de PE</i>	5
1.3. <i>Caractéristiques importantes des PE</i>	6
2. METHODES UTILISEES POUR TESTER LE POTENTIEL PERTURBATEUR ENDOCRINIEN.....	8
3. LE TESTICULE FŒTAL.....	10
3.1. <i>Structure anatomique du testicule</i>	10
3.2. <i>Mise en place du testicule fœtal</i>	11
3.3. <i>Les cellules germinales fœtales</i>	11
3.4. <i>Les cellules de Sertoli fœtales</i>	13
3.5. <i>Les cellules de Leydig fœtales</i>	15
3.6. <i>Les cellules péritubulaires fœtales</i>	18
3.7. <i>Les autres cellules du testicule fœtal</i>	19
3.8. <i>La fenêtre de masculinisation programmée</i>	20
4. CULTURE ORGANOTYPIQUE DE TESTICULES FŒTAUX.....	21
5. LES PLASTIFIANTS.....	22
5.1. <i>Le DEHP</i>	22
5.2. <i>Substituts du DEHP à l'étude</i>	29
6. LES RETARDATEURS DE FLAMME.....	34
6.1. <i>Le BDE-47</i>	34
6.2. <i>Substituts du BDE-47 à l'étude</i>	37

7.	PROBLEMATIQUE, OBJECTIFS ET HYPOTHESES	40
7.1.	<i>Problématique</i>	40
7.2.	<i>Objectifs et hypothèses</i>	41
CHAPITRE 2: SCREENING FOR TOXICITY AND ENDOCRINE DISRUPTOR POTENTIAL OF EMERGING PLASTICIZERS AND FLAME-RETARDANTS USING RAT FETAL TESTIS ORGAN CULTURE		43
CONTRIBUTION DES AUTEURS		43
RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS		43
ARTICLE À ÊTRE SOUMIS		45
	ABSTRACT	46
	INTRODUCTION	47
	MATERIAL AND METHODS	49
	<i>Chemicals</i>	49
	<i>Animals</i>	50
	<i>Organ culture</i>	50
	<i>Testosterone secretion measurements</i>	51
	<i>Histology</i>	51
	<i>Immunofluorescence</i>	51
	<i>Stereology and cell counting</i>	52
	<i>Cell and testis surface measurements</i>	52
	<i>Cell density and surface</i>	52
	<i>Proliferation index</i>	53
	<i>Statistics</i>	53
	RESULTS	53
	<i>Impact on basal and LH-stimulated testosterone secretion</i>	53
	<i>Impact on the global testicular tissue organisation</i>	54
	<i>Impact on cell density and surface</i>	54
	<i>Impact on cell proliferation and apoptosis</i>	55
	DISCUSSION	55
	CONCLUSION	61
	DECLARATION OF INTEREST	62
	FUNDING	62
	ACKNOWLEDGMENTS	62

FIGURES.....	63
SUPPLEMENTALS.....	68
CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	75
LES RÉSULTATS ET LES AVANCÉES DES CONNAISSANCES.....	75
LE MODÈLE D'ÉTUDE.....	77
PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	83
CONCLUSION	85
BIBLIOGRAPHIE.....	87

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

FIGURE 1.1. STRUCTURE DU TESTICULE FŒTAL	10
FIGURE 1.2. MIGRATION DES CELLULES GERMINALES PRIMORDIALES DANS LES GONADES BIPOTENTIELLES.	12
FIGURE 1.3. VOIES COMMUNES DE LA SYNTHÈSE DES STÉROÏDES DANS LES CELLULES DE LEYDIG	17
FIGURE 1.4. CULTURE ORGANOTYPIQUE DE TESTICULES FŒTAUX	22
FIGURE 1.5. MÉTABOLITES DU DEHP (PHTALATE DE BIS (2-ÉTHYLHEXYLE)).....	24

CHAPITRE 2 : SCREENING FOR TOXICITY AND ENDOCRINE DISRUPTOR POTENTIAL OF EMERGING PLASTICIZERS AND FLAME-RETARDANTS USING RAT FETAL TESTIS ORGAN CULTURE

FIGURE 2.1. EFFECT OF THE CHEMICALS ON BASAL AND LH-STIMULATED TESTOSTERONE SECRETION FROM 15.5 DAYS OLD RAT FETAL TESTES CULTURED FOR 3 DAYS.....	63
FIGURE 2.2. EFFECT OF THE CHEMICALS ON THE GLOBAL TESTICULAR ORGANISATION OF 15.5 DAYS OLD RAT FETAL TESTES CULTURED FOR 3 DAYS.....	64
FIGURE 2.3. EFFECT OF THE CHEMICALS ON THE DENSITY AND SURFACE OF THE MAIN TESTICULAR CELL TYPES..	65
FIGURE 2.4. EFFECT OF THE CHEMICALS ON THE PROLIFERATION OF SERTOLI AND LEYDIG CELLS OF 15.5 DAYS OLD RAT FETAL TESTES CULTURED FOR 3 DAYS.	66
FIGURE 2.5. APOPTOTIC BODY IN A 15.5 DAYS OLD RAT FETAL TESTIS CULTURED FOR 3 DAYS	67
FIGURE S1. GFP/MIS/3B-HSD TRIPLE STAINING	68
FIGURE S2. GFP/MIS/3B-HSD TRIPLE STAINING SHOWN FOR EACH TREATMENT	69
FIGURE S3. NEGATIVE CONTROL OF THE GFP/MIS/3B-HSD TRIPLE STAINING.....	70
FIGURE S4. PRESENCE OF AUTOFLUORESCENT CELLS	71
FIGURE S5. PERCENTAGE OF INTACT TESTIS CORDS.....	72
FIGURE S6. BRDU/SMA/3B-HSD TRIPLE STAINING	73
FIGURE S7. NEGATIVE CONTROL OF THE BRDU/SMA/3B-HSD TRIPLE STAINING.....	74

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

TABLEAU 1.1. CARACTERISTIQUES DU DEHP	22
TABLEAU 1.2. EFFETS DU MEHP SUR LE TESTICULE FŒTAL ET ADULTE EN CULTURE ORGANOTYPIQUE.....	28
TABLEAU 1.3. CARACTERISTIQUES DU DINP	29
TABLEAU 1.4. CARACTERISTIQUES DU DIDA	31
TABLEAU 1.5. CARACTERISTIQUES DU TXIB	32
TABLEAU 1.6. CARACTERISTIQUES DU BDE-47	34
TABLEAU 1.7. CARACTERISTIQUES DU TBEP.....	37
TABLEAU 1.8. CARACTERISTIQUES DE L'IPPP.....	39

CHAPITRE 2 : SCREENING FOR TOXICITY AND ENDOCRINE DISRUPTOR POTENTIAL OF EMERGING PLASTICIZERS AND FLAME-RETARDANTS USING RAT FETAL TESTIS ORGAN CULTURE

TABLE 2.1. LIST OF PLASTICIZERS AND FLAME RETARDANTS.	49
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -SMA	<i>Alpha-smooth muscle actin</i>
3 β -HSD	<i>3β-Hydroxysteroid dehydrogenase</i>
4PL curve	<i>Four Parameter Logistic curve</i>
AFSB	Armand-Frappier Santé Bitechologie
AMH	<i>Anti-Müllerian hormone</i>
BDE-47	2,2',4,4'-Tétrabromodiphényléther
BPA	Bisphénol A
BrdU	Bromodésoxouridine
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCPA	Comité canadien de protection des animaux
CF	<i>Conceptual Framework</i>
CIPA	Comité institutionnel de protection des animaux
CNBE	Centre national de biologie expérimentale
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
DEHP	Phtalate de bis (2-éthylhexyle)
DES	Diéthylstilbestrol
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>
DIDA	Adipate de diisodécyle
DiNP	Phtalate de diisononyle
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECHA	<i>European Chemicals Agency</i>
EDSP	<i>Endocrine Disruptor Screening Program</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EE2	17 α -Éthynilestradiol
ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

ER β	<i>Estrogen receptor β</i>
Jpc	Jour post-conception
Jpp	Jour post-partum
FGF9	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GCS-EGFP	<i>Germ cell specific enhanced Green fluorescent protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GSTA4	Glutathion S-transférase alpha de type 4
GPX1	Glutathion peroxydase 1
HBSS	<i>Hank's balance salt solution</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HMG-CoA	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase</i>
IC-50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IL-10	<i>Interleukin 10</i>
INSL3	<i>Insulin-like 3</i>
INRS	Institut national de la recherche scientifique
IPCS	<i>WHO International Programme on Chemical Safety</i>
IPPP	Phosphate de triphényle isopropylé
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MEHP	Phtalate de monoéthylhexyle
MIS	<i>Müllerian Inhibitor substance</i>
NR5A1	<i>Nuclear Receptor, Subfamily 5, Group A, Member 1</i>

OECD	Organisation de coopération et de développement économiques
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBDE	Polybromodiphényléther
PBR	<i>Peripheral benzodiazepine receptor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PE	Perturbateur endocrinien
PGC	Cellule germinale primordiale
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptors</i>
PTCH	<i>Protein Patched Homolog 1</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity relationships</i>
ROS	<i>Reactive-Oxygen Species</i>
SHGB	<i>Sex Hormone-Binding Globulin</i>
SOX9	<i>SRY-type HMG box 9</i>
SR-B1	<i>Scavenger Receptor class B type 1</i>
SRY	<i>Sex-determining region of Y chromosome</i>
STAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory protein</i>
TBEP	Phosphate de tributoxyéthyle
TDS	<i>Testicular dysgenesis syndrome</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TXIB	Diisobutyrate de 2,2,4-Triméthyl-1,3-pentanediol
WT1	<i>Wilms' Tumor protein 1</i>

INTRODUCTION

Les effets des perturbateurs endocriniens (PE) sur la reproduction masculine soulèvent actuellement de plus en plus d'inquiétudes. Dans les dernières années, il a en effet été démontré que plusieurs produits chimiques de source synthétique étaient des PE en raison de leurs propriétés anti-androgéniques et de leurs effets sur l'appareil reproducteur masculin (Akingbemi *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 2005). C'est le cas du phtalate de bis (2-éthylhexyle) (DEHP), un phtalate, et du 2,2',4,4'-tétrabromodiphényléther (BDE-47), un retardateur de flamme bromé, qui appartiennent respectivement aux familles des plastifiants et des retardateurs de flamme (aussi appelés ignifugeants). Le DEHP est le phtalate le plus couramment utilisé comme additif procurant de la flexibilité aux polychlorures de vinyle (PVC). Son utilisation est donc omniprésente dans les jouets pour enfants, les emballages, les équipements médicaux, les lubrifiants et les produits de soins corporels (Kavlock *et al.*, 2006; Schettler, 2006). Le BDE-47 est le congénère dominant des polybromodiphényléthers (Geyer *et al.*, 2004), qui sont des ignifugeants retrouvés dans les textiles, les meubles et les produits électroniques (Stapleton *et al.*, 2008; US EPA, 2009).

En 2010, les données de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé (ECMS) ont révélé que les Canadiens sont largement exposés aux plastifiants et aux retardateurs de flamme (CHMS, 2010). En effet, ces composés ne sont pas chimiquement liés à leurs matrices et peuvent se répandre dans l'environnement (Thomas & Thomas, 1984). Plus inquiétant encore, le DEHP et le BDE-47 ont été trouvés dans des échantillons de liquide amniotique et de sang de cordon ombilical dans divers pays (Katsikantami *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2009; Latini *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2012; Wittassek *et al.*, 2009). Ces preuves d'une exposition fœtale aux PE sont particulièrement préoccupantes compte tenu du fait que le testicule fœtal est particulièrement sensible aux variations des niveaux d'androgènes (Welsh *et al.*, 2008) et qu'un déséquilibre hormonal au cours du stade fœtal peut entraîner des troubles de la fonction reproductrice masculine à l'âge adulte (Sharpe & Skakkebaek, 2008; Skakkebaek *et al.*, 2001).

Compte tenu de leur toxicité, le DEHP et le BDE-47 sont réglementés depuis le début des années 2000 dans plusieurs pays (Dodson *et al.*, 2012; JOUE, 2005; US EPA, 2004; US EPA, 2012), dont au Canada (DGSESC, 2001; ECCC, 2009). En conséquence, ils sont progressivement remplacés par des produits émergents qui sont déjà détectés dans l'environnement (Bui *et al.*, 2016; Calafat *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2017), mais dont la toxicité et le potentiel PE sont inconnus. Il est donc essentiel de mettre

au point des techniques d'évaluation rapides et sensibles qui permettent de mieux caractériser le potentiel PE de ces nouveaux produits chimiques.

À cette fin, des cultures organotypiques de testicules fœtaux de rats, un organe particulièrement sensible aux modulations des hormones stéroïdiennes, ont déjà été utilisées pour tester la toxicité du DEHP et de son métabolite actif principal, le MEHP (Phtalate de monoéthylhexyle) (Chauvigne *et al.*, 2009; Lambrot *et al.*, 2009), ainsi que des bisphénols S et F (BPS et BPF, respectivement) (Eladak *et al.*, 2015). Le BPS et le BPF sont deux substituts du Bisphénol A, un PE utilisé dans la fabrication des plastiques et des résines (Rezg *et al.*, 2014; Rochester, 2013) qui a lui aussi été réglementé dans plusieurs pays (JOUE, 2011), dont au Canada depuis 2008 (Environnement Canada, 2008). La culture organotypique a pour avantage de reproduire *in vitro* le développement *in vivo* du testicule fœtal tout en préservant l'architecture testiculaire, les différents types cellulaires et les communications intercellulaires, contrairement aux lignées cellulaires. En plus de permettre de tester l'impact d'un composé sur la fonction stéroïdogène du testicule et sa toxicité sur les différents types de cellules testiculaires, ce modèle de culture est également plus rapide et moins coûteux que les tests *in vivo* et permet de limiter l'utilisation d'animaux de laboratoire.

Dans cette étude, nous avons appliqué cette approche expérimentale pour étudier le potentiel PE et la toxicité de trois substituts du DEHP et de deux substituts du BDE-47. Leurs effets ont été comparés avec ceux des composés qu'ils remplacent. Le choix des substituts s'est basé sur une gamme de cytotoxicité détectée sur des lignées de cellules de Leydig (MA-10) et germinales (C18-4) (Laboratoire de Bernard Robaire, Université de McGill, données non publiées). Tous les composés émergents analysés dans cette étude sont actuellement détectés dans la poussière de maison et/ou les produits de consommation (Bui *et al.*, 2016; Calafat *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2014).

Pour la famille des plastifiants, nous avons testé les deux substituts qui semblent être les moins cytotoxiques, c'est-à-dire le phtalate de diisononyle (DiNP) et l'adipate de diisodécyle (DIDA), ainsi que le substitut qui semble être le plus toxique, le diisobutyrate de 2,2,4-triméthyl-1,3-pentanediol (TXIB). Pour la famille des retardateurs de flamme, nous avons testé le phosphate de tributoxyéthyle (TBEP), le substitut potentiellement le moins toxique, et le phosphate de triphényle isopropylé (IPPP), le substitut qui semble être le plus toxique. L'évaluation du potentiel PE s'est basé sur les effets des composés sur les sécrétions de testostérone. La toxicité sur le développement testiculaire a été testée à l'aide d'un triple

marquage par immunofluorescence qui a permis pour la première fois d'étudier simultanément les cellules germinales, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig.

Cette étude s'inscrit dans un projet d'équipe international et multidisciplinaire de recherche (Perturbateurs Endocriniens (PE) : Vers des substituts sécuritaires) mené par Barbara Hales (Université McGill), la chercheuse principale, et financé par les IRSC (Instituts de recherche en santé du Canada). Ce projet vise 1) à déterminer les niveaux de contamination des aliments, de l'eau et du lait maternel par des substituts des familles des phtalates, des retardateurs de flamme bromés et du bisphénol A, 2) à évaluer si ces substituts sont plus sécuritaires que les composés qu'ils remplacent et 3) à mettre en place des stratégies, des politiques et des règlements garantissant la sélection de substituts sécuritaires.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Perturbateurs endocriniens

1.1. Définition

On estime que le terme « perturbateur endocrinien » a été créé en 1991 à l'issue des travaux de Theo Colborn, qui a postulé que les produits chimiques environnementaux pouvaient perturber le développement du système endocrinien et que les effets de l'exposition à ces composés pendant le développement étaient souvent permanents (Colborn *et al.*, 1993). Depuis, les PE ont été définis de multiples façons. Pour le moment, aucune définition ne fait consensus. L'une des plus citées a été formulée en 2002 par le Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques (*International Programme on Chemical Safety (IPCS)*) :

« Un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange exogène qui modifie une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et entraîne par conséquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, de sa descendance, ou de ses sous-populations » (WHO/IPCS, 2002).

La définition donnée par l'Agence américaine de protection de l'environnement (US EPA) fait davantage mention des mécanismes par lesquels les PE agissent sur l'organisme :

« Un PE est un agent qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison ou l'élimination des hormones endogènes qui sont souvent responsables de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et/ou du comportement (Kavlock *et al.*, 1996).

1.2. Les sources de PE

Un PE peut provenir de sources naturelles (exemple : phytoestrogènes) comme de sources synthétiques, telles que les solvants, les lubrifiants, les plastifiants, les pesticides, les fongicides, ou encore les produits pharmaceutiques (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Certains PE, comme les polychlorobiphényles (PCB), les PBDE, les dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et les hexabromocyclododécane (HBCDD), sont considérés comme persistants dans l'environnement en raison de leur potentiel de bioaccumulation important et sont donc parfois détectés chez les animaux en haut de la chaîne alimentaire (humains, phoques, ours polaires, oiseaux de proie, etc.) (WHO, 2013). Plusieurs de

ces composés ont en effet une forte affinité pour les graisses et une faible affinité pour l'eau, de telle façon qu'ils sont éliminés moins rapidement qu'ils ne sont ingérés (WHO, 2013).

D'autres PE, par exemple le DEHP, l'atrazine, le BPA et la vinchlozoline, sont au contraire peu persistants et ont une demi-vie très courte dans la faune et l'environnement. Ils sont parfois qualifiés de pseudo-persistants, car malgré leur faible potentiel de bioaccumulation, le relâchement de ces composés dans l'environnement est continu, ce qui fait en sorte qu'ils sont quand-même détectés dans les tissus humains et animaux (Daughton, 2003; WHO, 2013).

1.3. Caractéristiques importantes des PE

Certaines caractéristiques importantes des PE doivent être prises en compte afin d'avoir une bonne vue d'ensemble des conséquences possibles d'une exposition à un PE potentiel. Quelques-unes ont été revues par Diamanti-Kandarakis et ses collaborateurs (2009) et Gore et ses collaborateurs (2015). En voici les principales :

L'âge d'exposition. Il est maintenant établi que la capacité des hormones à exercer des effets durant la période fœtale influencerait ou dicterait les fonctions des systèmes endocriniens et physiologiques à l'âge adulte (WHO, 2013). Chez le fœtus, l'organogenèse et la différenciation tissulaire sont étroitement régulées et coordonnées dans le temps, ce qui le rend plus vulnérable aux perturbations causées par une exposition aux PE (Gore *et al.*, 2015). On peut prendre l'exemple de femmes ayant pris du diéthylstilbestrol (DES) pendant leur grossesse afin de prévenir les risques de fausse-couche et d'autres complications. Il a été observé que leurs enfants présentaient un risque accru d'avoir des troubles multiples de la reproduction et même certains cancers (Herbst, 1976; Troisi *et al.*, 2013). Au niveau du système reproducteur masculin, Skakkebeak et ses collaborateurs (2001) ont émis l'hypothèse qu'un déséquilibre hormonal au cours du stade fœtal, plus précisément pendant la différenciation sexuelle, entraînerait chez les humains des troubles au niveau du système reproducteur masculin comme la cryptorchidie (absence de la descente transabdominale des testicules), l'hypospadias (ouverture de l'urètre ailleurs qu'à l'extrémité du pénis), ou encore, chez l'adulte, le cancer du testicule et le déclin du compte et de la qualité spermatique (Skakkebaek *et al.*, 2001). L'ensemble de ces symptômes caractérisent ce qu'ils ont appelé le « syndrome de dysgénésie testiculaire ». Des études où des animaux ont été exposés *in utero* aux phtalates (revues par Hu *et al.* 2009) ont par la suite été en mesure de reproduire plusieurs anomalies congénitales comprises dans ce syndrome (Hu *et al.*, 2009).

Les effets des PE peuvent être transmis aux générations suivantes. Un effet épigénétique se décrit par des changements dans l'expression des gènes n'étant pas attribuables à des modifications de la séquence d'ADN et qui peuvent se transmettre aux générations suivantes (Gore *et al.*, 2015; Peschansky & Wahlestedt, 2014; Skinner, 2008). Les PE peuvent causer de tels changements en altérant la méthylation de l'ADN, la modification des histones et/ou l'expression des microARN (Chen & Riggs, 2005; Holliday & Pugh, 1975; Pokholok *et al.*, 2005; Turner, 1998). Pour qu'un PE ait des effets transgénérationnels, on considère que l'exposition doit avoir lieu durant le développement et les effets doivent être observés à la génération F3, c'est-à-dire la première génération à ne pas avoir été exposée directement au PE (Skinner, 2008).

Il existe un nombre grandissant d'études démontrant que plusieurs PE peuvent avoir des effets sur l'épigénome. Par exemple, une exposition périnatale au BPA chez le rat entraînerait des modifications de la méthylation de gènes impliqués dans le cancer de la prostate (Ho *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2012). L'exposition au DEHP peut provoquer une augmentation globale de la méthylation des cytosines dans les testicules (Wu *et al.*, 2010) et perturber la méthylation de gènes exprimés dans les ovocytes F1 et F2 chez la souris (Li *et al.*, 2014b). Cependant, l'association entre les modifications épigénétiques causées par les PE et les effets délétères observés chez la descendance restent encore difficiles à prouver (Gore *et al.*, 2015). De plus, très peu d'études animales se sont penchées sur les effets des PE sur les modifications des histones et l'expression des microARN.

Dose-réponse non-monotoniques. Les courbes doses-réponses des PE peuvent être non-monotoniques, c'est-à-dire que des effets maximaux peuvent être observés 1) aux plus petites et/ou aux plus grandes doses ou 2) aux doses intermédiaires (Gore *et al.*, 2015). Par exemple, dans une étude en 2008, le BPA, a eu des effets sur la régulation de l'insuline pancréatique aux plus faibles doses testées (1nM et 10nM), mais pas aux plus fortes doses (égales ou supérieures à 1 µM) (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008). Gore et ses collaborateurs (2015) illustrent cette particularité des PE avec les trois points suivants :

- Dans une culture de cellules A et B, par exemple, une exposition à la testostérone pourrait favoriser la croissance des cellules A, mais la décroissance des cellules B. Ainsi, ce sont les concentrations intermédiaires de testostérone qui auraient un effet maximal sur la croissance des deux types de cellules combinés (Geck *et al.*, 1997; Sonnenschein *et al.*, 1989).
- D'autre part, lorsque les concentrations hormonales augmentent, leurs récepteurs respectifs sont davantage dégradés afin de préserver l'homéostasie. Cependant, l'habileté des cellules

à remplacer ces récepteurs est moins rapide. En conséquence, la diminution des récepteurs disponibles induit une diminution de la réponse hormonale (WHO, 2013).

- Finalement, à de fortes doses de PE, les effets endocriniens tendent à disparaître, car elles deviennent cytotoxiques (Welshons *et al.*, 2003).

Les mélanges de PE. En raison de la dépendance industrielle moderne à l'égard des produits chimiques synthétiques, chaque personne est exposée à des mélanges de composés pendant des périodes variables (Gore *et al.*, 2015). Ces mélanges peuvent comprendre tout un inventaire de PE potentiels ou avérés, en plus des produits de dégradations de chaque composé individuel. Actuellement, de plus en plus d'études concernant les effets de mélanges de PE sur le système endocrinien sont publiées. Bien que ce concept fasse encore débat, certaines soutiennent que les différents PE contenus dans un mélange peuvent avoir un effet synergique entre eux, c'est-à-dire qu'ils produisent des effets cumulatifs à des concentrations dans le mélange qui peuvent être inférieures à celles où ils n'auraient normalement pas d'effet individuellement (Kortenkamp *et al.*, 2007).

2. Méthodes utilisées pour tester le potentiel perturbateur endocrinien

Depuis la fin des années 90, plusieurs pays et organismes internationaux ont mis en place des programmes visant à déterminer le potentiel PE de substances chimiques et à prédire leurs effets sur la santé humaine et sur la faune (Coady *et al.*, 2017). Des tests standardisés ont depuis vu le jour et sont en constante évolution. Les organismes qui se sont investis dans l'élaboration de ces tests incluent l'EPA, qui a créé le Programme de Dépistage des Perturbateurs Endocriniens (*Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)*) à la demande du Congrès Américain en 1996, ainsi que l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE), qui a établi des lignes directrices pour les tests de détection des PE (OECD, 2010). Les tests actuels permettant d'évaluer l'activité endocrinienne d'une substance sont décrits par l'EPA dans Coady et ses collaborateurs (2017). Brièvement, la première étape (Niveau 1 de la CF (*Conceptual Framework*) de l'OCDE) consiste à collecter les données existantes par des méthodes *in silico* afin d'orienter les tests *in vitro* et *in vivo* subséquents (OECD, 2012). En particulier pour les substances pour lesquelles on dispose de peu d'informations, la collection de données peut se faire en comparant les composés à l'étude avec des produits chimiques analogues, ainsi qu'en étudiant la relation quantitative entre leur structure et leur activité (*Quantitative Structure-Activity relationships (QSARs)*) (Coady *et al.*, 2017; OECD, 2012).

La deuxième étape (Niveau 2 de la CF de l'OCDE ou de niveau 1 de l'EDSP) consiste, entre autre, à caractériser *in vitro* l'affinité des composés avec les récepteurs aux estrogènes et aux androgènes, ou encore leurs effets sur la stéroïdogénèse (OECD, 2012).

Viennent ensuite des essais *in vivo* (Niveau 3 de la CF de l'OCDE ou de niveau 1 de l'EDSP), conçus pour indiquer qualitativement si la signalisation des hormones estrogéniques, androgéniques ou thyroïdiennes est perturbée à la suite d'interactions directes avec un récepteur ou une enzyme (Coady *et al.*, 2017; OECD, 2012). Le test de 21 jours sur les poissons (OCDE TG 230) et le test de Hershberger sur les rats (OCDE TG 441) en sont des exemples (OECD, 2012). Par contre, ceux-ci n'exposent pas les organismes pendant une grande partie de leur cycle de vie et sont donc incapables de révéler tout le spectre des effets possibles.

Les tests *in vivo* à plus long terme (Niveau 4 de la CF de l'OCDE), par exemple le test du développement sexuel des poissons (OCDE TG 234), peuvent généralement caractériser plus d'un mode d'action d'un composé et potentiellement permettre l'évaluation du risque (OECD, 2012). Les études multigénérationnelles et sur le cycle de vie complet des animaux de laboratoire sont comprises dans les tests de niveau 5 de la CF de l'OCDE (OECD, 2012).

Coady et ses collaborateurs (2017) soulèvent toutefois que ces lignes directrices ne sont pas sans problème. Premièrement, les batteries de tests proposées sont très coûteuses. Par exemple, conduire l'ensemble des 11 tests de dépistage de l'EDSP de niveau 1 établi par l'EPA peut coûter jusqu'à \$800 000 US par composé, et ce dans un contexte où environ 10 000 substances doivent être évaluées aux États-Unis (Coady *et al.*, 2017). Deuxièmement, le temps nécessaire pour planifier et compléter les tests (temps pour obtenir le nombre requis d'animaux, temps d'exposition, temps d'analyse biochimiques et histopathologiques) peut être considérable. Troisièmement, les tests peuvent requérir un nombre significatif d'animaux. Par exemple, la batterie d'essais de l'EDSP de niveau 1 utilise jusqu'à 600 animaux par substance (Bishop & Willett, 2014). En somme, une approche alternative moins longue et coûteuse constituerait une solution à ces difficultés. C'est d'ailleurs une partie des travaux réalisés durant le projet de maîtrise rapporté dans ce mémoire.

3. Le testicule fœtal

3.1. Structure anatomique du testicule

Le testicule comprend 2 compartiments; les tubules séminifères et l'interstitium, dans lesquels ont lieu, respectivement, la production de gamètes et la production d'androgènes (voir la Figure 1.1).

Les tubules séminifères, appelés cordons testiculaires au stade fœtal, sont formés de plusieurs tubes enroulés dans lesquels on trouve les cellules germinales en différenciation (Plant *et al.*, 2014). Les cellules germinales sont supportées par des cellules somatiques nourricières, les cellules de Sertoli, qui servent également de support structurel pour la spermatogenèse (Barrionuevo *et al.*, 2011). Dépendamment des espèces, la périphérie des tubules est composée d'une ou plusieurs couches de cellules péritubulaires, des cellules myoïdes riches en filaments d'actine (Anthony & Skinner, 1989). Grâce à leurs propriétés contractiles (Maekawa *et al.*, 1996), elles propulsent les spermatozoïdes produits dans des tubules vers le *rete testis* puis l'épididyme (Plant *et al.*, 2014).

L'interstitium comprend des îlots de cellules de Leydig, qui produisent les androgènes, et des cellules du système immunitaire, dont des macrophages (Plant *et al.*, 2014). Les tubules séminifères, non vascularisés, sont efficacement approvisionnés en sang grâce aux artérioles et aux capillaires interstitiels tenant leur source d'une longue artère spermatique enroulée (Plant *et al.*, 2014). L'interstitium comprend également des vaisseaux lymphatiques (Itoh *et al.*, 1998; Moller, 1980).

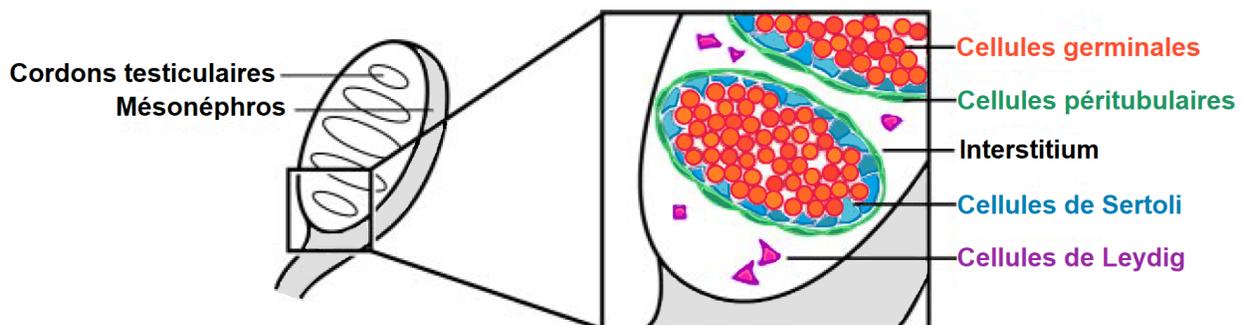


Figure 1.1. Structure du testicule fœtal. La production de gamètes a lieu dans les cordons testiculaires, où l'on trouve les cellules germinales, les cellules de Sertoli et les cellules péritubulaires. La production d'androgènes a lieu dans un deuxième compartiment, l'interstitium, où se trouvent, entre autres, les cellules de Leydig. Adaptée de Wilhelm *et al.*, 2007 avec la permission d'*American Physiological Society*.

3.2. Mise en place du testicule fœtal

À 13,5 jours post-conception (jpc) chez le rat (Hebel & Stromberg, 1986), les gonades bipotentielles prennent place dans la crête génitale, une excroissance longitudinale le long de la surface du mésonéphros, dans la cavité coelomique (Figure 1.2) (Hacker *et al.*, 1995). À ce stade de développement, les crêtes génitales XY et XX sont morphologiquement identiques et peuvent se développer en testicules comme en ovaires. Par exemple, une délétion ou un dysfonctionnement de l'expression des gènes *Sex-determining Region of Y chromosome (Sry)* et *SRY-type HMG box 9 (Sox9)* peut favoriser la formation d'ovaires dans une crête génitale XY, tandis que l'expression forcée de ces gènes peut favoriser le développement de testicules dans une crête génitale XX (Barrionuevo *et al.*, 2006; Chaboissier *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1999; Koopman *et al.*, 1991; Vidal *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 1994).

Les cellules de la crête génitale ne contribuent pas toutes seules à la formation des futures gonades. La migration d'autres cellules vers les gonades (exemple : cellules germinales) est également nécessaire pour compléter l'organogenèse testiculaire.

3.3. Les cellules germinales fœtales

Origines. Les cellules germinales, alors appelées cellules germinales primordiales, proviennent initialement de l'épiblaste proximal et vont se regrouper à la base de l'allantoïde vers 7,5 jpc et 8 jpc chez les rongeurs (Lawson & Hage, 1994; Ying *et al.*, 2000; Ying & Zhao, 2001; Zhao & Garbers, 2002). Vers 11 jpc et 13 jpc, soit au moment de la formation des gonades bipotentielles, elles vont migrer à travers le mésentère pour venir coloniser la crête génitale (Figure 1.2) (Culty, 2009). Il a d'ailleurs été spéculé que la structure longue et étroite de cette dernière est importante pour la capture des cellules germinales migratoires, largement dispersées le long de l'intestin postérieur (Harikae *et al.*, 2013).

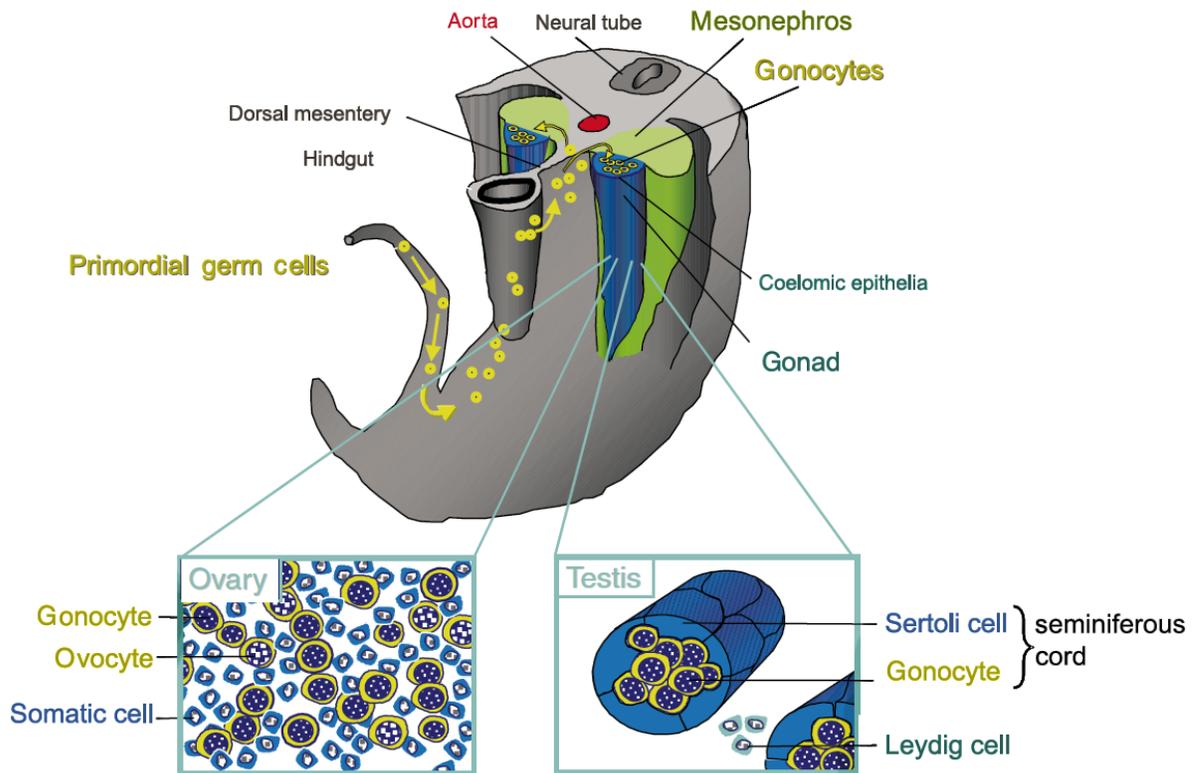


Figure 1.2. Migration des cellules germinales primordiales dans les gonades bipotentielles. Représentation d'une coupe transversale d'un fœtus. Les gonades bipotentielles prennent place dans la crête génitale, une excroissance longitudinale le long de la surface du mésonéphros, dans la cavité cœlomique. Au moment de la formation des gonades bipotentielles qui, à ce stade de développement, peuvent se développer en testicules comme en ovaires, les cellules germinales primordiales vont migrer à travers le mésentère pour venir coloniser la crête génitale. Primordiale germ cell, Cellules germinales primordiales; Hindgut, Tube digestif; Dorsal mesentery, Mésentère dorsal; Aorta, Aorte; Neural tube, Tube neural; Mesonephros, Mésonéphros; Coelomic epithelia, Épithélium cœlomique; Gonad, Gonade; Somatic cell, Cellule somatique; Sertoli cell, Cellule de Sertoli; Leydig cell, Cellule de Leydig; Seminiferous cord, Cordon testiculaire. Figure adaptée de Rouiller-Fabre *et al.* 2003.

Développement. Pendant leur migration, les cellules germinales subissent une déméthylation sur tout leur génome en vue de l'établissement de l'empreinte parentale (Reik *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2005). Une fois leur migration dans la crête génitale complétée, elles perdent leur motilité et leur morphologie polarisée (Baillie, 1964; Donovan *et al.*, 1986) et sont progressivement entourées par les cellules de Sertoli pour former les cordons testiculaires. Une fois ceux-ci formés, les cellules germinales sont appelées gonocytes (Culty, 2009).

Au cours des différentes étapes du développement testiculaire, les gonocytes se différencient en une succession de différents types cellulaires avec des rôles distincts. Précédant leur différenciation, les gonocytes entrent d'abord dans une phase de mitose, puis une phase de

quiescence entre 17,5 jpc et 3 jours post-partum (jpp) chez le rat (Culty, 2009). S'ensuit une seconde phase de mitose où les gonocytes migrent vers la membrane basale des cordons testiculaires, où ils débutent leur différenciation en spermatogonies souches ou en spermatogonies de type A (Culty, 2009). Au cours de ce processus, soit à partir de la gonade fœtale jusqu'à la spermatogenèse, le génome des gonocytes est le site d'une intense reméthylation (Rwigemera *et al.*, 2017; Trasler, 2009). Le moment de chacun de ces événements doit également être étroitement régulé afin d'assurer le développement adéquat des gonocytes. Par exemple, il a été démontré chez la souris que l'activation constitutive de la voie Notch dans les cellules de Sertoli fœtales provoque la perte des cellules germinales avant la naissance en raison d'une sortie de l'étape de la quiescence, d'une migration vers la périphérie des cordons et d'une différenciation prématurées des gonocytes (Garcia *et al.*, 2013).

Prolifération et apoptose. La différence entre les gonocytes mitotiques fœtaux et néonataux est illustrée, entre autres, par leurs différences de régulations de la prolifération et de l'apoptose. Par exemple, dans des études effectuées sur des testicules fœtaux de rat en culture, Livera et ses collaborateurs (2000) ont établi qu'une concentration élevée d'acide rétinoïque, un métabolite actif de la vitamine A (Manku & Culty, 2015), induit une augmentation de l'apoptose des cellules germinales fœtales (Livera *et al.*, 2000). À l'inverse, sur des cellules germinales postnatales (3 jpp), l'acide rétinoïque induit une légère augmentation du nombre de gonocytes, mais n'a pas d'effet sur l'apoptose (Livera *et al.*, 2000), indiquant que la régulation de la prolifération des cellules germinales est dépendante de l'âge.

D'autres facteurs peuvent avoir des effets négatifs sur les gonocytes fœtaux, mais positifs sur les gonocytes postnataux. Au stade fœtal, l'activine A et les androgènes tendent à diminuer la prolifération des gonocytes, alors que la testostérone n'a pas d'effet sur la prolifération des gonocytes postnataux de 3 jpp *in vitro* (Mendis *et al.*, 2011; Merlet *et al.*, 2007; Thuillier *et al.*, 2010). De même, des études *in vitro* sur des testicules fœtaux en culture ont démontré une diminution du nombre de gonocytes après une exposition au 17 β -estradiol ou au diéthylstilbestrol (DES) (Delbes *et al.*, 2007; Lassarguere *et al.*, 2003). Cependant, cet effet n'a pas été observé sur des explants de 3 jpp (Delbes *et al.*, 2007).

3.4. Les cellules de Sertoli fœtales

Origines. Les cellules de Sertoli tiennent leurs origines des cellules de l'épithélium cœlomique ayant migré dans la gonade bipotentielle (Karl & Capel, 1998), soit par migration

active, soit par ingression passive causée par un taux élevé de division des cellules épithéliales de surface (Karl & Capel, 1998; Rodemer-Lenz, 1989; Schmahl *et al.*, 2000). Leur présence dans le testicule fœtal est détectée à partir de 13,5 jpc chez le rat (Magre & Jost, 1991).

Développement. Dans les gonades XY, les cellules de Sertoli sont les premières cellules somatiques à se différencier. À 13,5 jpc chez le rat (Magre & Jost, 1991), les cellules de Sertoli primordiales apparaissent et commencent à exprimer le gène *Sry*, qui induit l'expression du facteur de transcription *Sox9* (Barrionuevo *et al.*, 2006).

En effet, la différenciation appropriée des testicules est assurée par l'expression spatio-temporelle du gène *Sry*, d'abord exprimé dans la région centrale de la crête génitale, puis dans les pôles de celle-ci. De plus, pour toutes ces régions, les niveaux d'expression doivent atteindre un seuil déterminé au cours d'une période très restreinte (chez la souris, entre ~11,5-11,75 jpc) afin d'activer l'expression de *Sox9* et, par conséquent, la différenciation des cellules Sertoli sur toute la longueur du testicule (Bullejos & Koopman, 2005). Par exemple, chez des souris transgéniques exprimant le gène *Sry* quelques heures plus tard que les souris de type sauvage, l'expression de *Sox9* s'est limitée à la région centrale des crêtes génitales. En conséquence, les souris transgéniques ont développé des ovotesticules avec des tissus testiculaires dans la région centrale des gonades et des tissus ovariens dans les pôles (Hiramatsu *et al.*, 2009; Kidokoro *et al.*, 2005).

Suite à l'activation de *Sox9*, les cellules de Sertoli primordiales, alors différenciées en cellules de Sertoli, commencent à s'agréger autour des îlots de cellules germinales et à former les cordons testiculaires. Les cellules de Sertoli vont ensuite sécréter l'*Anti-Müllerian Hormone* (AMH), une molécule de signalisation appartenant à la famille des *Transforming Growth Factor β* (TGF β). L'AMH se lie à son récepteur de type II (AMHR2) dans le mésenchyme des canaux de Müller, permettant la régression du mésoépithélium de ces derniers (Behringer *et al.*, 1994; Josso *et al.*, 1993; Mishina *et al.*, 1996). Plusieurs facteurs de transcription régulent l'expression de l'AMH, tels que *Sox9*, *Sox8* et la *Wilms Tumor Protein 1* (WT1) (Barrionuevo *et al.*, 2006; Chaboissier *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2006; Schepers *et al.*, 2003).

Dans le testicule fœtal et adulte, les cellules de Sertoli sont essentielles à la différenciation et à la survie des cellules germinales, non seulement parce qu'elles sont leurs cellules nourricières, mais également parce qu'elles servent de support structurel pour la spermatogenèse tout en formant la barrière hématotesticulaire (Barrionuevo *et al.*, 2011). De plus, elles influencent le développement des cellules germinales par plusieurs voies signalétiques. En voici quelques exemples donnés par Svingen et ses collaborateurs (2013) :

- Dégradation de l'acide rétinoïque par l'expression de la Cytochrome P450, famille 26, sous-famille B, gène 1 (CYP26B1) et la sécrétion du *Fibroblast Growth Factor 9* (FGF9), ce qui empêche les cellules germinales d'entrer en méiose (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006);
- L'expression de l'activine A et du TGF β , qui permettent possiblement de réguler la quiescence des cellules germinales (Mendis *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2010), qui a lieu entre 18,5 jpc et 3 jpp chez le rat (Culty, 2009);
- L'expression de *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), d'estrogène et de TGF β , impliqués dans la survie des cellules germinales au stade postnatal (Hasthorpe *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997).

Grâce, entre autres, à l'expression de *Desert Hedgehog* (DHH), les cellules de Sertoli sont également impliquées dans la différenciation des cellules de Leydig et des cellules péritubulaires, qui expriment toutes les deux *Hedgehog Receptor Patched 1* (PTCH1), le récepteur de DHH (Clark *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2002).

3.5. Les cellules de Leydig fœtales

Origines. Les origines des cellules de Leydig fœtales ont fait l'objet de nombreux débats. Il a été spéculé qu'elles proviendraient de cellules de la crête neurale (Mayerhofer *et al.*, 1996; Middendorff *et al.*, 1993), de l'épithélium coelomique (Karl & Capel, 1998), ou encore de l'épithélium du mésonephros (Mayerhofer *et al.*, 1996). L'une ou l'autre de ces origines donnerait naissance à une population de cellules progénitrices dans le compartiment interstitiel, dont certaines exprimant faiblement Nuclear Receptor, Subfamily 5, Group A, Member 1 (NR5A1) pourraient en partie servir de progéniteurs des cellules de Leydig fœtales (Inoue *et al.*, 2016). On assume que ce sont ces progéniteurs qui assureraient l'augmentation du nombre de cellules de Leydig durant la période fœtale. En effet, ces dernières sont considérées comme étant pleinement différenciées et donc mitotiquement inactives (Miyabayashi *et al.*, 2013).

Développement et fonctions. On dénombre trois populations de cellules de Leydig chez l'humain et les primates, soit une population de cellules de Leydig fœtales, infantiles et adultes (Codesal *et al.*, 1990; Fouquet *et al.*, 1984; Prince, 1990). Chez les rongeurs, on dénombre deux populations : les cellules de Leydig fœtales et adultes.

La *3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase* (3 β -HSD), un marqueur des cellules de Leydig, est détectée vers 13,3 jpc chez le rat (Gangnerau & Picon, 1987) après l'apparition des cellules

germinales et des cellules de Sertoli. À 15,5 jpc, les cellules de Leydig fœtales commencent à sécréter des androgènes (Habert & Picon, 1984), qui vont permettre la maturation des canaux de Wolff, appelés à former l'épididyme, le vas déférent et les vésicules séminales (Griswold & Behringer, 2009; Klonisch *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2009).

Les cellules de Leydig fœtales sécrètent également l'*Insulin-like 3* (INSL3), responsable de la différenciation du ligament gubernaculum qui contrôle la descente des testicules vers le scrotum (Adham *et al.*, 2000; Adham *et al.*, 2002; Bogatcheva *et al.*, 2003; Emmen *et al.*, 2000; Tomiyama *et al.*, 2003). En l'absence de ce facteur, les testicules ne descendent pas, une condition connue sous le nom de cryptorchidie (Hutson & Hasthorpe, 2005; Kumagai *et al.*, 2002; Nef & Parada, 1999; Tomiyama *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 1999).

Synthèse de testostérone. Les cellules de Leydig fœtales possèdent toutes les enzymes requises pour la synthèse de testostérone (par exemple : *Steroidogenic Acute Regulatory protein* (STAR), l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (p450cc, appelée aussi CYP11a1), 3 β -HSD, CYP17A1), sauf l'enzyme 17 β -HSD, qui convertit l'androstènedione en testostérone. Ce sont en effet les cellules de Sertoli qui produisent cette enzyme au stade fœtal (O'Shaughnessy *et al.*, 2000; Shima *et al.*, 2013). Les cellules de Leydig adultes, pour leur part, expriment la 17 β -HSD et sont donc en mesure de produire de la testostérone de façon indépendante sans le support des cellules de Sertoli (O'Shaughnessy *et al.*, 2000; Shima *et al.*, 2013). Les voies communes de la synthèse des stéroïdes dans les cellules de Leydig sont identifiées dans la Figure 1.3.

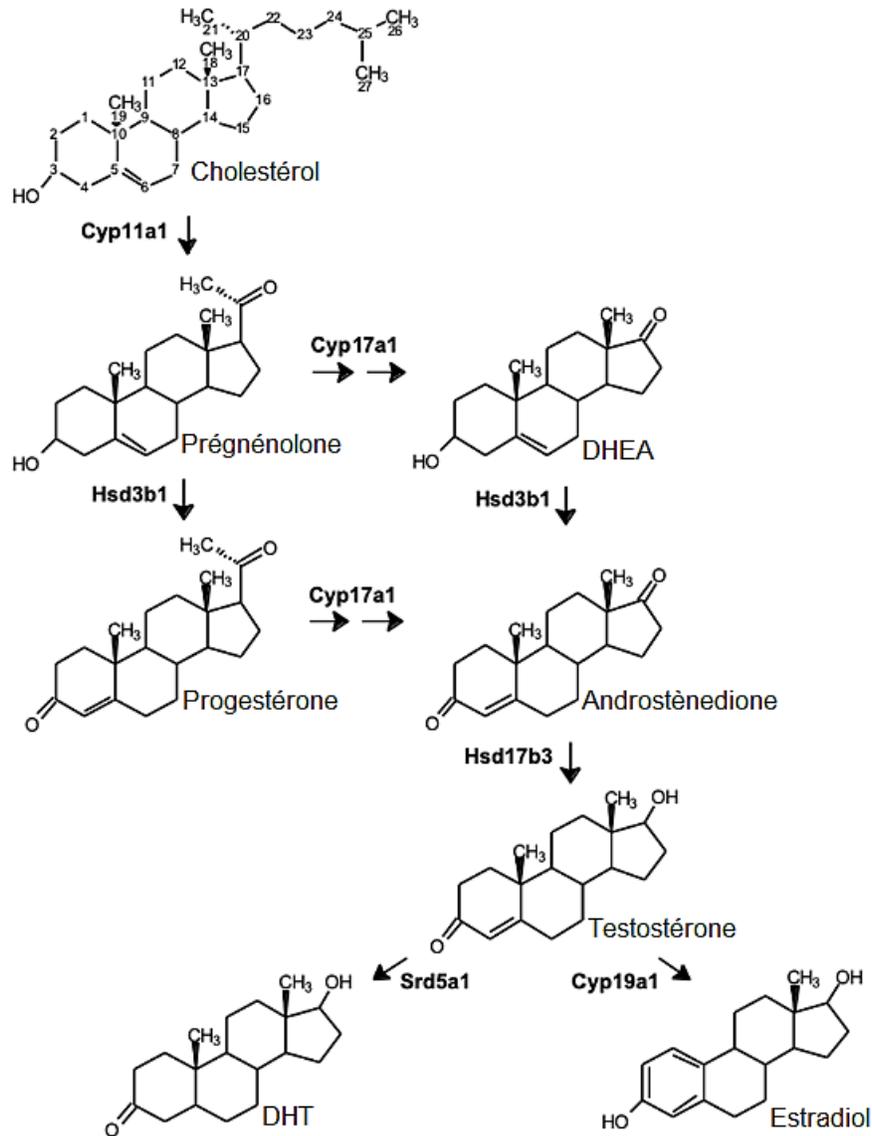


Figure 1.3. Voies communes de la synthèse des stéroïdes dans les cellules de Leydig. Abréviations : Cyp11a1, enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol; Hsd3b1, 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase 1; Cyp17a1, P450 17-hydroxylase/20-lyase; Hsd17b3, 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase 3; Srd5a1, 3-oxo-5 α -stéroïde 4-déhydrogénase 1; Cyp19a1, aromatisation; DHEA, déhydroépiandrosterone; DHT, dihydrotestostérone. Adaptée de Martin & Touaibia, 2020.

Chez l'adulte, la synthèse d'androgènes par les cellules de Leydig est régulée par les niveaux de *Luteinizing Hormone* (LH) en circulation, une hormone produite par la glande pituitaire. La synthèse de la LH est stimulée par la sécrétion pulsative de la *Gonadotropin-Releasing Hormone* (GnRH), sécrétée par l'hypothalamus (Swerdloff *et al.*, 2000). La production de GnRH elle-même est régulée par de multiples facteurs, notamment par les niveaux d'hormones

stéroïdiennes en circulation, ou encore par des hormones peptidiques telles que la leptine, la prolactine, l'activine et l'inhibine (Swerdloff *et al.*, 2000). Si les niveaux de testostérone sériques sont élevés, les sécrétions de LH diminueront. À l'inverse, si les niveaux de testostérone sont bas en raison d'un dysfonctionnement des cellules de Leydig, les sécrétions de LH augmenteront (Swerdloff *et al.*, 2000).

Le récepteur de la LH (LHR) est un récepteur couplé aux protéines G exprimé à la surface des cellules de Leydig. La liaison de la LH à son récepteur provoque l'activation de l'adénylate cyclase (AC) associée à la membrane cytoplasmique, qui va catalyser la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Themmen & Huhtaniemi, 2000). L'activation subséquente de plusieurs kinases, dont la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC), va ensuite stimuler la synthèse d'enzymes et de protéines nécessaires à la biosynthèse de la testostérone (revu dans Smith *et al.*, 2015).

Il a été démontré qu'un déficit en LH ou en récepteur de LH réduisait grandement la production de testostérone et provoquait l'arrêt du développement sexuel postnatal chez la souris, indiquant que la production d'androgènes postnataux est dépendante de la LH (Lei *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2001). Cependant, au stade fœtal, une perturbation des niveaux de LH et de son récepteur n'affecte pas la masculinisation. En effet, même si le récepteur de la LH est exprimé à 16 jpc chez la souris et que les testicules fœtaux sont capables de répondre à la LH, la production d'androgènes par les cellules de Leydig fœtales n'est pas dépendante de l'axe hypothalamo-pituitaire-gonadal (O'Shaughnessy *et al.*, 1998; Pointis & Mahoudeau, 1977). Chez des souris produisant de très faibles niveaux de GnRH, les fonctions des cellules de Leydig fœtales étaient normales même en absence de LH endogène (O'Shaughnessy *et al.*, 1998). Entre 19,5 et 20,5 jpc chez le rat, le testicule commence à devenir dépendant de la LH pour sécréter de la testostérone (Habert & Picon, 1982).

3.6. Les cellules péritubulaires fœtales

Origines. Au cours de la différenciation du testicule, les cellules péritubulaires font leur apparition peu de temps après le début de la formation des cordons testiculaires et il est possible de les distinguer chez la souris à partir de 13,5 jpc (Jeanes *et al.*, 2005). On croyait qu'elles tenaient leurs origines d'une population de cellules ayant migré du mésonéphros jusque dans les gonades (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios *et al.*, 1993). Toutefois, des études plus récentes ont démontré que la migration de ces cellules contribue plutôt à la vascularisation du testicule

(Combes *et al.*, 2009; Cool *et al.*, 2008). Actuellement, l'origine des cellules péritubulaires est donc inconnue.

Développement et fonctions. Il est possible que les cellules de Sertoli soient impliquées dans la différenciation des cellules péritubulaires. Peu après l'expression de *Sry*, les cellules de Sertoli expriment la DHH, qui agit via le récepteur *Protein Patched Homolog 1* (PTCH). Ce récepteur est exprimé par la plupart des cellules interstitielles au moment de la différenciation des cellules péritubulaires et des cellules de Leydig fœtales (Yao *et al.*, 2002). Chez des souris n'exprimant pas la DHH, des problèmes au niveau de la différenciation des cellules de Leydig et des cellules péritubulaires fœtales ont été observés (Clark *et al.*, 2000; Pierucci-Alves *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2002).

Les cellules péritubulaires, aussi appelées cellules myoïdes péritubulaires, sont des cellules de type muscles lisses (Maekawa *et al.*, 1996). Leur fonction contractile qui facilite l'expulsion du sperme et le support structurel qu'elles fournissent aux tubules séminifères sont assurés par un tissu conjonctif extracellulaire (Maekawa *et al.*, 1996). Les cellules péritubulaires et les cellules de Sertoli contribuent toutes les deux à la formation ce tissu (Tung *et al.*, 1984).

L'expression du récepteur des androgènes par une population de cellules péritubulaires pourrait être essentielle au bon fonctionnement des cellules de Sertoli. Chez des souris transgéniques dont l'expression des récepteurs des androgènes par les cellules péritubulaires était inactivée, la production de fluides dans les tubules séminifères par les cellules de Sertoli était altérée. En conséquence, le nombre de cellules germinales s'en trouvait réduit et les souris mâles étaient infertiles (Welsh *et al.*, 2009). Des études *in vitro* ont également suggéré que, en réponse à la DHH, à la TGF β et au *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2), une autre population de cellules péritubulaires n'exprimant pas les récepteurs des androgènes pourrait servir de progéniteurs aux cellules de Leydig adultes du testicule néonatal (Li *et al.*, 2016; Odeh *et al.*, 2014; Stanley *et al.*, 2012).

3.7. Les autres cellules du testicule fœtal

Les macrophages. On distingue deux populations de macrophages résidant dans le testicule : une population interstitielle et une population péritubulaire (Mossadegh-Keller *et al.*, 2017). La population interstitielle tient ses origines de la vésicule vitelline et est détectée chez la souris à 7,5 jpc (DeFalco *et al.*, 2014). Au cours de la période postnatale, les macrophages interstitiels sont associés avec les cellules de Leydig et supportent la production de testostérone,

par exemple en sécrétant la 25-hydroxyxholestérol, clivée par des enzymes impliqués dans la stéroïdogénèse pendant les étapes subséquentes de la production de testostérone (Nes *et al.*, 2000). Les macrophages interstitiels participent à la création d'un environnement immunosuppresseur en exprimant l'interleukine 10 (IL-10), contribuant ainsi fortement à protéger les spermatozoïdes immunogènes (Xue *et al.*, 1994).

La population périvitulaire est dérivée de la moelle osseuse et émerge vers la 2^e semaine postnatale (Mossadegh-Keller *et al.*, 2017). Des expériences de déplétions de macrophages périvitulaires ont démontré que cette population pourrait supporter la spermatogenèse, d'abord grâce à la sécrétion du *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) (DeFalco *et al.*, 2015; Winnall & Hedger, 2013), une cytokine qui stimule la prolifération des spermatogonies (Bhushan *et al.*, 2015), mais aussi en présentant des antigènes du Soi aux cellules germinales, protégeant le testicule de réactions auto-immunitaires (Mossadegh-Keller *et al.*, 2017; Tung *et al.*, 2017).

La vascularisation du testicule. La vascularisation sanguine est établie tôt au cours du développement testiculaire. Les premiers vaisseaux sanguins se développent par un processus non angiogénique impliquant le réarrangement de cellules endothéliales migratoires provenant du mésonéphros (Brennan *et al.*, 2002; Coveney *et al.*, 2008). En plus de participer à l'organisation vasculaire, elles vont influencer le partitionnement des cordons testiculaires pendant la vie fœtale (Bott *et al.*, 2006; Brennan *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2006).

Le développement des vaisseaux lymphatiques du testicule fœtal est encore peu étudié. Chez la souris, la lymphogenèse débute vers 17,5 jpc et tiendrait son origine d'un réseau lymphatique déjà établi le long du canal déférent et de l'épididyme (Svingen *et al.*, 2012).

3.8. La fenêtre de masculinisation programmée.

En 2008, Welsh et ses collaborateurs ont été les premiers à postuler que la masculinisation par les androgènes avait lieu avant la différenciation morphologique du système reproducteur masculin. Ils ont testé cette hypothèse en exposant des rats à un anti-androgène (flutamide) pendant différentes périodes de gestation. Selon cette étude, la fenêtre de sensibilité à une diminution de la testostérone se situerait entre 15,5 jpc et 19,5 jpc. En effet, l'exposition à la flutamide au cours de cette période a provoqué une diminution de la distance anogénitale chez les nouveau-nés ainsi qu'une augmentation des cas d'hypospadias et de cryptorchidie, des symptômes compris dans le syndrome de dysgénésie testiculaire (Skakkebaek *et al.*, 2001). Ces effets n'étaient pas observés à la suite d'une exposition pendant la différenciation morphologique

du système reproducteur masculin, entre 19,5 jpc et 21,5 jpc, identifiant ainsi la fenêtre de masculinisation programmée plus tôt durant la période fœtale, soit entre 15,5 jpc et 19,5 jpc chez le rat. On estime que cette période pourrait être comprise entre la 8^e et la 14^e semaine de gestation chez l'humain (Welsh *et al.*, 2008).

4. Culture organotypique de testicules fœtaux

L'emploi de modèles *in vitro* en toxicologie peut se révéler très pertinent dans la mesure où ils permettent de limiter l'utilisation d'animaux, d'être peu coûteux et d'être plus rapides que les modèles *in vivo*. À cet effet, des méthodes de cultures organotypiques *ex vivo* où l'architecture et les communications cellulaires sont préservées ont permis l'étude de xénobiotiques sur un organe entier, palliant parfois à certaines limitations des cultures de lignées cellulaires. C'est le cas de la culture organotypique de testicules fœtaux. En effet, la culture des principaux types cellulaires de cet organe se révèle souvent problématique. Par exemple, en l'absence de stimulation gonadotrope, les cellules de Leydig fœtales en culture ont tendance à se dédifférencier (Rouiller-Fabre *et al.*, 1998). De plus, les gonocytes isolés survivent mal dans de tels systèmes (Boulogne *et al.*, 2003; van Dissel-Emiliani *et al.*, 1993).

Développée par Halbert et ses collaborateurs (1991), la culture organotypique de testicules fœtaux consiste à déposer l'organe sur une membrane poreuse flottant dans un milieu de culture (voir la Figure 1.4). Bien que les cellules testiculaires se différencient en plus petit nombre dans ce système que dans un modèle *in vivo*, leurs fonctions et leur développement morphologiques sont préservés, autant pour les cellules somatiques que pour les cellules germinales (Livera *et al.*, 2006). Autre avantage, ce système permet l'étude de l'action directe d'un composé sur le testicule à une concentration et pour une durée contrôlées. De plus, les testicules traités et témoins peuvent provenir du même fœtus, permettant une analyse en paire qui limite la variabilité individuelle et augmente la sensibilité de la méthode. Ce modèle est évidemment moins coûteux et plus rapide qu'une étude *in vivo* et complète les études *in utero* qui ne permettent pas de déterminer si la toxicité et les perturbations hormonales observées proviennent directement du testicule fœtal, du fœtus, de la mère ou des deux (Albert & Jegou, 2014). Cependant, la culture organotypique ne permet pas d'étude à long terme puisque les testicules ne peuvent se développer *ex vivo* que pendant environ 4 ou 10 jours, dépendamment de l'espèce (Eladak *et al.*, 2015; Livera *et al.*, 2006). Un autre désavantage de cette technique au moment de tester un composé est l'absence du métabolisme par le foie.

D'abord utilisée chez le rat, cette procédure a par la suite été adaptée à la souris (Delbes *et al.*, 2005) et à l'humain (Lambrot *et al.*, 2009). Elle a déjà permis l'étude du diéthylstilbestrol (DES), de mélanges d'œstrogènes, du BPA et du MEHP sur le testicule de rat fœtal et néonatal (Chauvigne *et al.*, 2009; Delbes *et al.*, 2007; Eladak *et al.*, 2015; Lasseonde *et al.*, 2015).

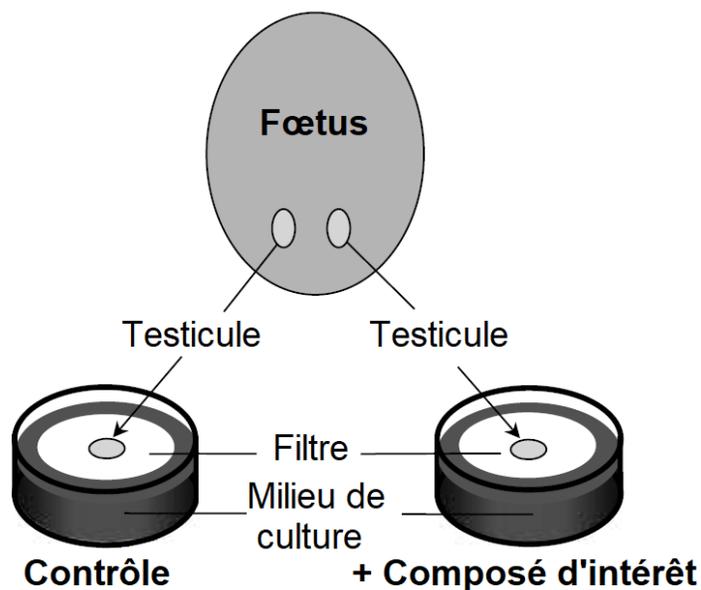


Figure 1.4. Culture organotypique de testicules fœtaux. Les testicules sont collectés et déposés sur une membrane poreuse qui flotte dans du milieu de culture. Figure adaptée de Rouiller-Fabre *et al.*, 2003.

5. Les plastifiants

5.1. Le DEHP

Tableau 1.1. Caractéristiques du DEHP

Identification	DEHP - Phtalate de bis (2-éthylhexyle) ¹	Structure
Famille	Phtalate à chaîne moyenne	
Formule chimique	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	
CAS	117-81-7	
Poids moléculaire	390,6 g/mol	
Log du coefficient de partage octanol/eau (K_{ow})	7,14 (expérimental)	

1. ECHA, 2008

5.1.1. Utilisations et exposition

Le DEHP (identifié dans le Tableau 1.1) est le phtalate le plus communément utilisé en tant que plastifiant procurant de la flexibilité aux PVC. Sa production au Canada en 2012 a été estimée à 1 000 000-10 000 000 kg (ECCC, 2014). Son utilisation est omniprésente dans les jouets pour enfant, les emballages, le matériel médical, les lubrifiants ou encore les produits de soin corporels (Schettler, 2006). Ce plastifiant n'est pas lié de façon covalente à sa matrice et peut donc se retrouver dans l'environnement (Thomas & Thomas, 1984). L'ingestion par l'alimentation constitue la principale voie d'exposition (Fromme *et al.*, 2007). Cependant, toutes les autres voies d'exposition sont aussi impliquées, comme l'exposition cutanée et l'inhalation (Duty *et al.*, 2005; Heudorf *et al.*, 2007; Wormuth *et al.*, 2006).

Le DEHP n'est pas considéré comme un composé persistant et se dégrade rapidement dans l'eau et dans les sols (Furtmann, 1994; Ruzicková *et al.*, 2016). Son utilisation est cependant si omniprésente que les populations sont malgré tout quotidiennement exposées partout dans le monde à divers degrés. Au Canada en 2015, le DEHP a été détecté dans 111 des 159 échantillons d'aliments analysés. Les concentrations trouvées se situaient entre 14,4 et 7 154 ng/g (Arbuckle *et al.*, 2014). Toujours au Canada, le DEHP était présent dans la poussière de 100 % des 126 maisons d'une autre étude, avec une concentration médiane de 462 µg/g de poussière (Kubwabo *et al.*, 2013). Des métabolites du DEHP ont été détectés dans le lait maternel en Europe (Suède, Allemagne, Italie et Danemark) (Fromme *et al.*, 2011; Guerranti *et al.*, 2013; Hogberg *et al.*, 2008; Mortensen *et al.*, 2005), mais également au Canada, où la concentration médiane était de 1,26 µg/L de lait (ECCC, 2017). Ce composé et ses métabolites peuvent traverser la barrière placentaire. En effet, le MEHP a été retrouvé dans des échantillons de liquide amniotique testés entre 2009 et 2018, en Europe et en Asie, à des concentrations moyennes de 0,8 à 2,7 µg/L (Katsikantami *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018; Wittassek *et al.*, 2009). En 2003, Latini et ses collaborateurs ont détecté le DEHP dans le sang de cordon à une concentration moyenne de $1,9 \pm 1,15$ µg/mL (Latini *et al.*, 2003).

Au Canada, aux États-Unis et dans la Communauté Européenne, l'usage de DEHP dans les jouets pour enfant et les articles de puériculture est limité depuis le début des années 2000 (DGSESC, 2001; JOUE, 2005; US EPA, 2012). En Europe, le DEHP est également interdit dans les produits cosmétiques et les emballages en plastique en contact avec les aliments gras (JOUE, 2007; JOUE, 2009).

5.1.2. Les métabolites principaux du DEHP

Chez le rat, les phtalates diesters comme le DEHP sont transformés en monoesters. Dans le cas du DEHP, le MEHP est ainsi son métabolite actif principal. Les monoesters sont ensuite oxydés, glucuronidés et éliminés dans l'urine (Williams & Blanchfield, 1975). Chez l'humain, le DEHP est rapidement dégradé en MEHP par les lipases acides (Kessler *et al.*, 2012; Koch & Calafat, 2009), qui est ensuite métabolisé par les enzymes du cytochrome P450 hépatiques et intestinales en divers métabolites oxydatifs secondaires : le phtalate de mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyle (MEHHP), le phtalate de mono-2-éthyl-5-oxohexyle (MEOHP) et le phtalate de mono-2-éthyl-5-carboxypentyle (MECPP) (voir la Figure 1.5) (Frederiksen *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2018).

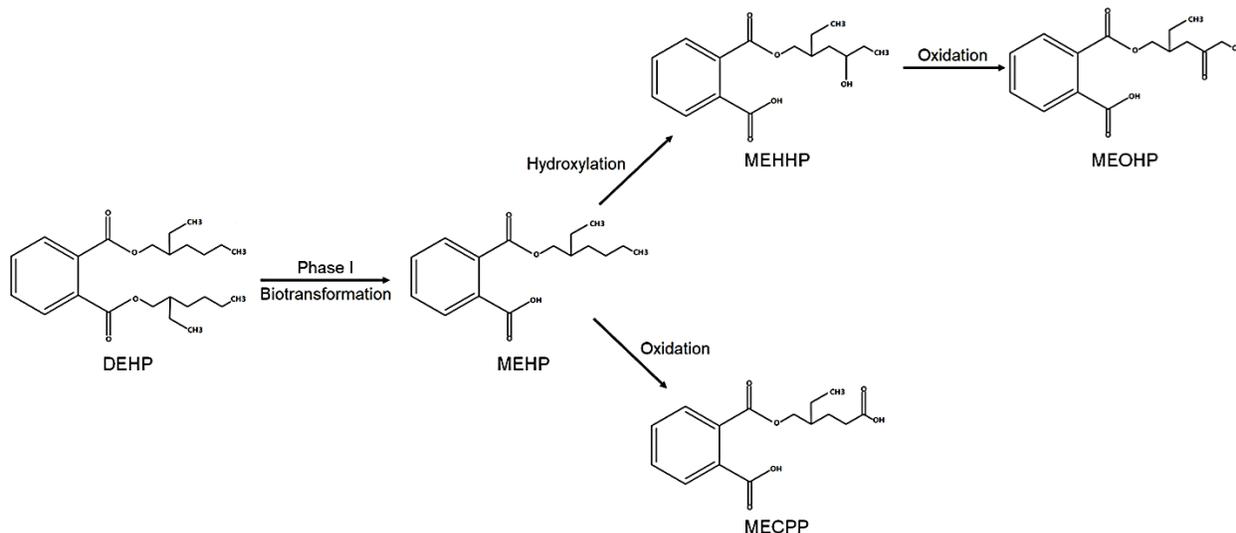


Figure 1.5. Métabolites du DEHP (Phtalate de bis (2-éthylhexyle)). Abréviations : MEHHP, phtalate de mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyle; MEOHP, phtalate de mono-2-éthyl-5-oxohexyle; MECPP, phtalate de mono-2-éthyl-5-carboxypentyle. Adaptée de Kim *et al.*, 2018.

5.1.3. Effets sur le système reproducteur masculin

Données épidémiologiques. Swan et ses collaborateurs (2008) ont été les premiers à établir une relation entre une exposition aux phtalates pendant la gestation et la distance anogénitale, un marqueur de l'exposition fœtale aux anti-androgènes. En 2008, ils ont observé une relation inverse et significative entre la distance anogénitale ajustée au poids chez des garçons âgés entre 0 et 40 mois et les concentrations urinaires des métabolites du DEHP (MEHP,

MEOHP, MEHHP) chez leurs mères pendant la gestation, suggérant qu'une exposition *in utero* aux phtalates pourrait altérer « la virilisation » chez l'humain comme elle le fait chez le rat (Swan, 2008). En revanche, Huang et ses collaborateurs (2009) n'ont trouvé aucune association entre la distance anogénitale chez les nouveau-nés de sexe masculin et l'exposition prénatale aux phtalates *in utero*, telle qu'évaluée à partir des concentrations de monoesters de phtalate (dont le MEHP) dans l'urine des mères (Huang *et al.*, 2009). Selon Albert et ses collaborateurs (2014), il est possible que les enfants de plus de trois mois dans l'étude de Swan et ses collaborateurs (2008) aient été affectés par une exposition postnatale aux phtalates, expliquant la différence entre les résultats de Swan et ses collaborateurs (2008) et de Huang et ses collaborateurs (2009) (Albert & Jegou, 2014). Dans une autre étude, Ormond et ses collaborateurs (2009) ont établi que les enfants dont les mères avaient été exposées au phtalates pendant la gestation dans le cadre de leur travail (par exemple via des produits pour les cheveux, des solvants, des désinfectants, des pesticides, des colles ou de l'encre d'imprimerie) étaient plus à risque d'avoir un hypospadias (Ormond *et al.*, 2009).

Les effets d'une exposition au DEHP sur les enfants et les adolescents ont été très peu étudiés. Au Danemark, les plus hauts niveaux d'exposition journaliers au DEHP observés chez des enfants atteignaient 100 µg/kg de poids corporel (WHO/IPCS)/jour (j) (Müller *et al.*, 2003). En Turquie, les niveaux plasmatiques de DEHP et de MEHP étaient significativement plus élevés chez des adolescents atteints de gynécomastie, caractérisée par le développement excessif des glandes mammaires chez l'homme (Durmaz *et al.*, 2010).

Dans quatre études en 2005, 2009, 2016 et 2018, aucune relation n'a pu être établie chez l'adulte entre les concentrations urinaires de DEHP et de MEHP et la qualité de la semence (volume de la semence, concentration, motilité et intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, concentrations sériques de testostérone) (Albert *et al.*, 2018; Herr *et al.*, 2009; Jonsson *et al.*, 2005; Thurston *et al.*, 2016). Par contre, des hommes exposés au MEHP dans le cadre de leur travail avaient des niveaux de testostérone libre plus faibles que les travailleurs non exposés (Pan *et al.* 2006). De même, dans une cohorte de 881 hommes au Danemark, des concentrations urinaires élevées de MEHP ont été négativement associées à une diminution de la testostérone totale et du ratio testostérone/estradiol (Joensen *et al.*, 2012b).

Données expérimentales *in vivo*. En 2014, on estime que 73 % des études portant sur les effets des phtalates sur le testicule *in vivo* ont été effectuées chez les rongeurs, et un tiers d'entre elles impliquaient des expositions *in utero* chez le rat (Albert & Jegou, 2014). La plupart de ces

études ont observé les effets suivants sur le testicule pour des doses de DEHP entre 250 et 750 mg/kg pc/j (revues dans Albert et ses collaborateurs (2014)):

- Diminution de la synthèse de testostérone (Parks *et al.*, 2000)
- Hypospadias (Parks *et al.*, 2000)
- Cryptorchidies (Li *et al.*, 2000)
- Diminution de la distance anogénitale (Gray *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 2000)

Pour de plus faibles doses (10 mg/kg pc/jour), Christiansen et ses collaborateurs (2010) ont également observé une diminution de la distance anogénitale, en plus d'une augmentation de la rétention des mamelons et d'une diminution du poids de la prostate (Christiansen *et al.*, 2010).

Chez le rat prépubère, le MEHP cause l'apoptose des spermatocytes (Murphy *et al.*, 2014; Stermer *et al.*, 2017) et la disparition des filaments de vimentine nécessaires au maintien des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli (Dalgaard *et al.*, 2001). Ces jonctions constituent la barrière hémato-testiculaire, essentielle à la maturation et à la survie des cellules germinales (Richburg & Boekelheide, 1996).

Chez le rat adulte, la morphologie des testicules a été altérée après une exposition au DEHP de 60 jours, mais aucun changement significatif n'a été observé au niveau des sécrétions de testostérone (Agarwal *et al.*, 1986). Dans la plupart des cas, les effets du DEHP chez l'adulte disparaissent après l'arrêt du traitement, suggérant leur réversibilité (Agarwal *et al.*, 1986).

Données expérimentales ex vivo. Les effets du DEHP et de ses métabolites ont été évalués sur le testicule fœtal en culture. L'ensemble des études ayant testé le MEHP avec ce modèle est détaillé dans le Tableau 1.2.

Pendant trois jours, Li et ses collaborateurs (2003) ont supplémenté les milieux de culture de testicules fœtaux de rats de 13,5 jpc avec différentes concentrations de MEHP (5×10^{-5} à 2×10^{-4} M). À ce stade précoce de développement, aucun effet n'a été observé au niveau de l'intégrité des cordons testiculaires des niveaux d'AMH et du nombre de cellules germinales (Li & Kim, 2003). Toutefois, une exposition entre 18,5 jpc et 3 jpp a eu pour effet d'altérer la prolifération et les fonctions des cellules de Sertoli (diminution de la production d'AMH et de la protéine GATA) et d'induire l'apoptose des cellules germinales (Li & Kim, 2003).

En 2009, Chauvigné et ses collaborateurs ont été les premiers à établir que le testicule fœtal de rat est incapable de métaboliser le DEHP entre 14,5 jpc et 17,5 jpc. Avec un modèle similaire de culture organotypique, ils ont déterminé qu'une exposition à 10^{-5} M de DEHP pendant trois jours avait un effet pro-androgénique sur des testicules fœtaux mis en culture à 14,5 jpc. Au

contraire, à la même concentration, le MEHP et son métabolite, le 5-OH-MEHP, avaient plutôt un effet anti-androgénique en plus de causer une diminution du nombre de gonocytes et de la production d'AMH. Le MEHP diminuait également l'expression de l'INSL3 et l'activité de la CYP-lyase, une enzyme impliquée dans la synthèse de testostérone (Chauvigne *et al.*, 2011). Des tests de radiomarquage avec le ^{14}C -DEHP et le ^{14}C -MEHP ont par la suite révélé que ces effets ont été observés alors que les testicules fœtaux n'absorbaient que 0,3 à 0,4 % des composés, soit environ 2,5 $\mu\text{g/L}$ (Chauvigne *et al.*, 2009), une concentration parfois retrouvée dans le plasma de femmes enceintes et le sang de cordon de nouveau-nés (Latini *et al.*, 2003).

La réponse du testicule fœtal au MEHP varie d'une espèce à l'autre. Chez la souris, une haute dose de MEHP (2×10^{-4} M) a induit une augmentation des sécrétions de testostérone de testicules en culture âgés entre 13,5 jpc et 18,5 jpc (Lehraiki *et al.*, 2009), un effet totalement à l'opposé de ce qui est habituellement observé chez le rat à un stade de développement similaire. Malgré l'absence d'effet anti-androgénique, une diminution du nombre de gonocytes et une augmentation de la hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA), de la CYP17a1 et de STAR a été observée. Chez des testicules humains de 7 à 12 semaines issus de cliniques d'avortement, 10^{-4} M de MEHP n'ont eu aucun effet sur la sécrétion de testostérone après une exposition de trois jours (Lambrot *et al.*, 2009). Une diminution de l'expression d'AMH et du nombre de cellules germinales a toutefois été observée. Il est cependant possible qu'une plus longue période d'exposition ou une exposition à des stades plus tardifs aient davantage imité une exposition *in utero* du fœtus humain au MEHP (Albert & Jegou, 2014).

Enfin, Desdoits-Lethimonier et ses collaborateurs (2012) ont étudié l'effet d'une exposition au DEHP et au MEHP sur le testicule adulte humain en culture. La production de testostérone était diminuée, mais les niveaux d'inhibine B produits par les cellules de Sertoli et l'apoptose des cellules germinales étaient comparables aux témoins, tout comme le nombre de cellules de Leydig et l'expression d'INSL3 (Desdoits-Lethimonier *et al.*, 2012). Par un radiomarquage basé sur celui développé par Chauvigné et ses collaborateurs (2009), ils ont découvert qu'après une exposition de 24h à 10^{-5} M de ^{14}C -DEHP et de ^{14}C -MEHP, seuls 3 à 6 % des composés étaient retrouvés dans les explants, ce qui correspondait à une exposition d'environ 1 mg/mL (Desdoits-Lethimonier *et al.*, 2012), une dose connue pour avoir des effets anti-androgéniques dans des études épidémiologiques (Han *et al.*, 2009; Meeker *et al.*, 2009a). Dans la même année, une étude sur des microsomes de testicules humains a confirmé que le MEHP pouvait rapidement être métabolisé par le testicule humain adulte (Choi *et al.*, 2012).

Tableau 1.2. Effets du MEHP sur le testicule fœtal et adulte en culture organotypique

Espèce	Jours de prélèvement*	Doses (M)	Effets	Références
Rat	E13,5	5x10 ⁻⁵ - 2x10 ⁻⁴	Aucun	Li et al. 2003
	E18,5 et P3	5x10 ⁻⁵ - 2x10 ⁻⁴	↓ AMH et protéine GATA	
	E18,5 et P3	10 ⁻⁴ - 2x10 ⁻⁴	↓ Prolifération des cellules de Sertoli	
	P3	10 ⁻⁴ - 2x10 ⁻⁴	↓ Gonocytes ↑ Apoptose des gonocytes	
Rat	E14,5	10 ⁻⁵	↓ Testostérone ↓ AMH ↓ Gonocytes ↓ Prolifération des gonocytes ↑ apoptose des gonocytes ↓ expression de l'INSL3 ↓ activité de la CYP-lyase	Chauvigné et al. 2009; Chauvigné et al. 2011
Souris	E13,5 et E18,5	2x10 ⁻⁴	↑ Testostérone ↓ Gonocytes ↑ Apoptose des gonocytes	Lehraiki et al., 2009
	E13,5	2x10 ⁻⁴	↑ HMG-CoA réductase et Cyp17a1	
	E18,5	2x10 ⁻⁴	↑ StAR and Cyp17a1	
Humain	7-12 semaines de gestation	10 ⁻⁴	↓ AMH ↓ Gonocytes ↑ Apoptose des gonocytes	Lambrot et al., 2009
Humain	Adulte	10 ⁻⁵ - 10 ⁻⁴	↓ Testostérone	Desdoits-Lethimonier et al. 2012

* Tous les testicules ont été mis en culture pendant 3 jours à partir du jour de prélèvement indiqué.

E : Jours embryonnaires

P : Jours postnataux

Les mécanismes d'action du DEHP. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer les effets du DEHP et de ses métabolites sur le système reproducteur masculin. D'abord, tel qu'observé chez la souris, l'exposition au DEHP *in utero* réprimerait l'expression d'INSL3, ce qui expliquerait en partie les taux élevés de cryptorchidie observés chez les rats traités (Wilson *et al.*, 2004). La diminution de la synthèse de testostérone fréquemment observée n'impliquerait pas le récepteur des androgènes (Parks *et al.*, 2000). En effet, *in vitro*, à 10 µM et moins, le DEHP et le MEHP n'ont pas démontré d'affinité pour le récepteur des androgènes humain (Parks *et al.*, 2000). Le DEHP modulerait plutôt la transcription de gènes impliqués dans le transport du cholestérol (par exemple STAR), comme démontré dans une étude *in utero* chez le rat, (Borch *et al.*, 2006;

Hannas *et al.*, 2011), ainsi que dans la biosynthèse de la testostérone (Cyp11a1, HSD3B1), tel que démontré *in vivo* chez le rat juvénile (Vo *et al.*, 2009). De plus, la diminution des niveaux de testostérone pourrait inhiber la prolifération des cellules de Sertoli, comme le témoigne la faible expression de la cycline D observée chez le rat néonatal exposé au MEHP (Li *et al.*, 2000). En effet, il a été suggéré que la cycline D est spécifiquement exprimée dans les cellules de Sertoli (Ravnik *et al.*, 1995; Sicinski *et al.*, 1996). La diminution du nombre de cellules de Sertoli, peut-être combiné avec une perturbation de leur cytosquelette par une altération des jonctions communicantes, se traduirait par une dysgénésie des gonocytes (David, 2006). Enfin, on soupçonne qu'une exposition gestationnelle au DEHP pourrait avoir des effets transgénérationnels en perturbant la méthylation de l'ADN du sperme, comme démontré dans une étude chez le rat (Manikkam *et al.*, 2013).

5.2. Substituts du DEHP à l'étude

5.2.1. Le DiNP

Tableau 1.3. Caractéristiques du DiNP

Identification	DiNP – Phtalate de diisononyle	Structure
Famille	Phtalate à chaîne moyenne ¹	
Formule chimique	C ₂₆ H ₄₂ O ₄ ¹	
CAS	28553-12-0 ¹	
Poids moléculaire	418,6 g/mol	
Log du coefficient de partage octanol/eau (K_{ow})	8,60 (calculé) ²	

1. Environment Canada, 2014; 2. Cousins & Mackay, 2000

Utilisations et expositions. Le DiNP (identifié dans le Tableau 1.3) est un phtalate à chaîne moyenne (Health Canada, 2015) utilisé comme substitut du DEHP (SCHER, 2008) dans les produits électroniques, les revêtements de sol en vinyle, les toitures, les jouets pour enfants, le cuir artificiel, ou encore les emballages alimentaires (Ash & Ash, 2003; Environment Canada, 2014). Comme le DEHP, il n'est pas chimiquement lié aux polymères (Hakkarainen, 2008). Dans l'environnement, ce plastifiant se dégrade rapidement dans l'eau (O'Grady *et al.*, 1985) et dans les sédiments (Kickham *et al.*, 2012). Toutefois, en raison de son hydrophobicité, son degré de sorption dans les sols est important, ce qui peut le rendre moins accessible aux microorganismes

capables participer à sa biodégradation (Kickham *et al.*, 2012). Malgré son faible potentiel de bioaccumulation, les quantités importantes de DiNP produites annuellement suggèrent que son relâchement dans l'environnement est continu (Blair *et al.*, 2009; Mackintosh *et al.*, 2004; McConnell, 2007). Au Canada, on estime que sa quantité de production en 2013 se situait entre 1 000 000 kg et 10 000 000 kg (Canada, 2013).

Le DiNP a été détecté dans la poussière de maison en Amérique comme en Europe (Abb *et al.*, 2009; Bornehag *et al.*, 2005; Kubwabo *et al.*, 2013). Par exemple, il a été retrouvé dans des maisons canadiennes à une concentration médiane de 112 µg/g de poussière (Kubwabo *et al.*, 2013). Le DiNP a également été détecté dans des échantillons de nourriture en Taiwan et au Royaume-Uni (Bradley *et al.*, 2013a; Bradley *et al.*, 2013b; Chang *et al.*, 2014), dans le lait maternel en Allemagne (Fromme *et al.*, 2011) et dans des jouets pour enfant dans plusieurs pays (Biedermann-Brem *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011; Stringer *et al.*, 2000).

Aux États-Unis, le DiNP figure dans la liste des substances cancérigènes de la proposition 65 (OEHHA, 2013). Au Canada, la quantité de ce composé dans les jouets pour enfants ne doit pas être supérieure à 1000 mg/kg (Canada, 2016).

Les métabolites du DiNP. Chez le rat, le DiNP est principalement hydrolysé dans le tractus gastro-intestinal en cas d'administration orale (McKee *et al.*, 2002). De façon similaire, il est rapidement distribué et éliminé chez l'humain, le phtalate de mono-isononyle (MiNP) étant le métabolite le moins détecté dans les urines et le phtalate de mono-(carboxyle-isoocyle) (MCiOP) étant le plus détecté (Koch & Angerer, 2007). Dans une étude chez le rat, le MiNP a cependant été trouvé à des concentrations similaires au MCiOP dans le plasma maternel, suggérant que les métabolites urinaires ne reflètent pas nécessairement la distribution réelle du DiNP dans l'organisme (Clewel *et al.*, 2013). Dans cette même étude, le MiNP et ses métabolites oxydatifs ont été détectés dans le plasma et les testicules fœtaux, ainsi que dans le liquide amniotique, indiquant que ces composés peuvent potentiellement franchir la barrière placentaire.

Effets du DiNP sur le système reproducteur masculin. Les études épidémiologiques suggèrent qu'il n'y a pas d'association entre une exposition au DiNP et des anomalies du tractus génital masculin ou des niveaux d'hormones sexuelles, autant chez les enfants que chez les adultes (Joensen *et al.*, 2012a; Main *et al.*, 2006). Les effets du DiNP sur la distance anogénitale d'enfants exposés pendant la gestation sont inconsistants d'une étude à l'autre (Bornehag *et al.*, 2015; Jensen *et al.*, 2016; Swan *et al.*, 2015). Une seule étude a trouvé une association significative entre des anomalies de la morphologie des spermatozoïdes et des métabolites du

DiNP (MiNP et MCIOP) chez des hommes fréquentant une clinique d'infertilité (Jurewicz *et al.*, 2013). En Europe, Specht et ses collaborateurs (2014) ont trouvé une association significative entre les concentrations sériques de métabolites du DiNP et une diminution des niveaux de testostérone sérique chez des hommes (Specht *et al.*, 2014).

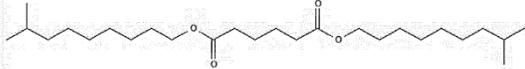
Pour le moment, seul le modèle du rat a été utilisé dans les études animales *in utéro*. Les effets observés se produisent généralement à des doses supérieures à 250 mg/kg pc/j. Une diminution de la production de testostérone par le testicule fœtal a été observée dans plusieurs de ces études (Boberg *et al.*, 2011; Borch *et al.*, 2004; Furr *et al.*, 2014; Hannas *et al.*, 2011). D'autres effets typiques d'une exposition aux phtalates ont également été observés, tels qu'une rétention des mamelons, une augmentation du nombre de gonocytes multinucléés et des cas de cryptorchidie et d'hypospadias, une diminution de la distance anogénitale, ainsi qu'une réduction de la motilité des spermatozoïdes (Boberg *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2000). Hannas et ses collaborateurs (2011) ont constaté une diminution de l'expression de STAR et de la CYP11a après une exposition *in utéro* chez le rat. Cependant, même aux plus fortes doses de DiNP testées, ces effets ne sont pas systématiquement observés d'une étude à l'autre.

Chez le rat pubère, Kwack et ses collaborateurs (2009) ont observé une diminution du compte et de la motilité spermatique après 4 semaines d'exposition à 500 mg/kg pc/j de DiNP (Kwack *et al.*, 2009). Par contre, aucun effet n'a été observé sur des singes pubères (NICNAS, 2008; Pugh *et al.*, 2000).

Dans une étude de Waterman et ses collaborateurs (2000), ainsi que dans des rapports gouvernementaux et internationaux, le DiNP peut réduire le poids des testicules sans induire d'anomalie histologique chez le rat et la souris adultes (EU RAR, 2003; NICNAS, 2008; Waterman *et al.*, 2000).

5.2.2. Le DIDA

Tableau 1.4. Caractéristiques du DIDA

Identification	DIDA - Adipate de diisodécyle	Structure
Famille	Diester aliphatique ¹	
Formule chimique	C ₂₆ H ₅₀ O ₄ ¹	
CAS	27178-16-1 ¹	
Poids moléculaire	426.67 g/mol	

Log du coefficient de partage octanol/eau (K_{ow})	10,1 (estimé) ²	
---	----------------------------	--

1. ECCC, 2018; 2. US EPA, 2008

Utilisations et exposition. Le DIDA (identifié dans le Tableau 1.4) est un plastifiant utilisé dans les produits nettoyants, les produits de traitement des surfaces métalliques et des textiles, les colorants, les polymères et les vernis (ECHA, 2007-2016). En 2011, sa production au Canada était inférieure à 100 kg et son importation se situait entre 1 000 000 et 10 000 000 kg (Canada, 2012). Il existe peu d'évidence que DIDA est utilisé dans les jouets pour enfant, mais, en Europe, ce composé a été détecté dans 3 jouets sur 11 en 2017 (Fiala & Steiner, 2005).

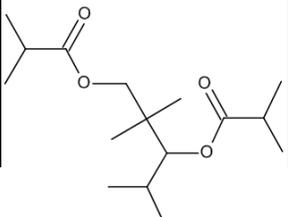
Présentement, il n'existe aucune étude canadienne concernant sa présence dans les sols, l'air et l'eau potable. Les données portant sur l'exposition humaine au DIDA sont pour le moment très limitées. En Suède, il n'a pas été retrouvé dans des échantillons de lait maternel (Remberger *et al.*, 2005).

Les métabolites principaux du DIDA. Il n'existe encore aucune donnée concernant les métabolites du DIDA.

Les effets du DIDA. La toxicité de ce composé *in vivo* est aussi peu étudiée. Selon un rapport de Santé Canada en 2018, il n'existe présentement aucune donnée publiée sur la toxicocinétique, l'exposition à court et à long terme, ainsi que sur la toxicité reproductive et développementale du DIDA (ECCC, 2018). Il n'existe pas davantage de classification du danger par l'*European Chemicals Agency* (ECHA) ou l'EPA.

5.2.3. Le TXIB

Tableau 1.5. Caractéristiques du TXIB

Identification	TXIB - Diisobutyrate de 2,2,4-triméthyl-1,3-pentanediol ¹	Structure
Famille	Alcane triméthyl pentanyle	
Formule chimique	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	
CAS	6846-50-0	
Poids moléculaire	286,41 g/mol	

Log du coefficient de partage octanol/eau (K _{ow})	4,1 (estimé)	
--	--------------	--

1. Maag *et al.*, 2010

Utilisations et exposition. Le TXIB (identifié dans le Tableau 1.5) est un plastifiant utilisé dans les PVC, les automobiles, les planchers, les articles de puériculture, les jouets, les polyuréthanes et les produits adhésifs (Eastman, 2020). Cette substance possède une pression de vapeur élevée et est donc particulièrement volatile (Jarnstrom *et al.*, 2008). En 2009, l'OECD évaluait sa production à 1000-10 000 tonnes par année dans l'Union Européenne (ECHA, 2014; OECD, 2009). Entre 1999 et 2011, le TXIB faisait partie des plastifiants alternatifs majoritairement utilisés en Suède (Bui *et al.*, 2016). Dans plusieurs études, le TXIB était d'ailleurs le substitut le plus détecté dans l'air d'écoles en Suède (1,64 µg/m³) (Kim *et al.*, 2007), de maisons japonaises nouvellement construites (20,8 µg/m³) (Takeuchi *et al.*, 2014) et d'habitations en Europe nouvellement peinturées (Wieslander *et al.*, 1997).

Les métabolites principaux du TXIB. Aucune donnée n'a été trouvée concernant les métabolites du TXIB.

Les effets du TXIB. Les quelques études épidémiologiques et *in vivo* disponibles dans la littérature tendent à associer une exposition aérienne au TXIB avec une inflammation des voies respiratoires. Dans une étude menée par Wieslander et ses collaborateurs (1997), la prévalence des symptômes d'asthme a été associée à une exposition aux émanations de peinture fraîche qui contenait de fortes concentrations de TXIB (Wieslander *et al.*, 1997). Bönish et ses collaborateurs (2012) ont exposé des souris au TXIB émis par un revêtement de sol en PVC et ont observé une exacerbation des inflammations respiratoires (Bonisch *et al.*, 2012). *In vitro*, le TXIB a réduit la production d'IL-2 d'une lignée de cellules dendritiques en maturation (Bonisch *et al.*, 2012).

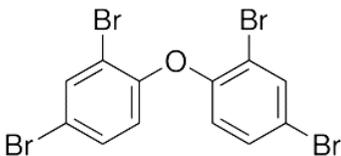
La plupart des autres études animales sur la toxicité du TXIB se limitent à des résumés d'études toxicologiques réglementaires décrivant peu les résultats et les démarches scientifiques dont ils sont issus. Celles-ci ont établi que le TXIB est rapidement métabolisé (Maag *et al.*, 2010). Ses deux métabolites, le 2,2,4-triméthyl pentanediol (TMPD) et le TXIB-3-14C, ont été identifiés dans les fèces (espèce animale non spécifiée). La toxicité aiguë du TXIB est considérée comme étant faible chez le rat adulte (Maag *et al.*, 2010). Une légère augmentation du poids du foie a été observé chez des rats ayant consommé de façon répétée de la nourriture contenant 1 % de TXIB

(Maag *et al.*, 2010). Dans une étude en reprotoxicité (OECD 421), le TXIB à très fortes doses (905 mg/kg pc/j) a induit une diminution du nombre de spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires (Maag *et al.*, 2010).

6. Les retardateurs de flamme

6.1. Le BDE-47

Tableau 1.6. Caractéristiques du BDE-47

Identification	BDE-47 - 2,2',4,4'-Tétrabromodiphényl éther	Structure
Famille	Polybromodiphényléther	
Formule chimique	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O ¹	
CAS	5436-43-1 ¹	
Poids moléculaire	485,8 g/mol	
Log du coefficient de partage octanol/eau (K _{ow})	6,8 ²	

1. US EPA, 2004; 2. Braekevelt *et al.*, 2003

6.1.1. Utilisations et expositions

Le BDE-47 (identifié dans le Tableau 1.6) est l'un des 209 congénères de la famille des PBDE (Staskal *et al.*, 2005). Chaque congénère se distingue par le nombre et la position des substitutions de brome et est retrouvé à différents pourcentages dans des mixtures commerciales. Le BDE-47 est un congénère présent dans la mixture des pentabromodiphényléthers (pentaBDE), aussi appelée DE-71 (WHO, 1994).

Produits en grande quantité depuis 1960, les PBDE sont des additifs utilisés comme retardateurs de flamme. On estime qu'environ 1,5 million de tonnes de PBDE ont été produites entre 1970 et 2005 (US EPA, 2006). Ils ne sont pas chimiquement liés à leurs matrices et peuvent donc se retrouver dans l'environnement (Rahman *et al.*, 2001). On les retrouve dans une large gamme de produits de consommation, dont les matériaux de construction, les produits électroniques, les meubles, les voitures, les plastiques, ou encore les mousses de polyuréthane (Alaee *et al.*, 2003; Stapleton *et al.*, 2011). L'alimentation est une source importante d'exposition (Bocio *et al.*, 2003; Ohta *et al.*, 2002). Les PBDE sont d'ailleurs retrouvés en grande quantité dans les poissons, la viande et les produits laitiers (Huwe, 2004; Schechter *et al.*, 2004), mais

également dans la poussière de maison. Par exemple, entre 980 et 44 546 ng de PBDE par gramme de poussière ont été retrouvés dans 50 maisons canadiennes (Johnson *et al.*, 2010). Comme tous les PBDE, le BDE-47 est un composé biopersistant lipophile qui tend à se distribuer préférentiellement dans les tissus adipeux et, à moindre degré, dans le foie, les poumons, les reins et le cerveau (Orn & Klasson-Wehler, 1998; Waszak *et al.*, 2012). Sa demi-vie varie d'une espèce à l'autre. Chez l'humain, elle est estimée à 664 jours (Geyer *et al.*, 2004). Une exposition journalière à de petites doses pendant la vie peut donc mener à une accumulation substantielle dans les tissus adipeux au fil des ans. De tous les congénères, le BDE-47 représente environ 55 % de la charge corporelle totale des PBDE, quels que soient la date et le lieu de l'échantillonnage (Hites, 2004). La présence de congénères peu bromés dans l'environnement a d'autant plus tendance à être amplifiée par la biodégradation des congénères très bromés (déshalogénéation par les microorganismes, dégradation par le métabolisme des animaux exposés, photodégradation) (Eriksson *et al.*, 2004; Huwe & Smith, 2007; Stapleton *et al.*, 2006; Van den Steen *et al.*, 2007; van Pee & Unversucht, 2003).

Les résultats de Zao et ses collaborateurs (2013) issus de fœtus avortés en Chine indiquent que les PBDE peuvent facilement traverser la barrière placentaire au cours du premier trimestre de grossesse, surtout les congénères à plus faible teneur en brome (dont le BDE-47) (Zhao *et al.*, 2013). Les concentrations moyennes de PBDE détectées dans les fœtus étaient de $4,46 \pm 2,88$ ng par gramme de lipides (Zhao *et al.*, 2013). Plusieurs autres études rapportent également la présence de PBDE dans des échantillons fœtaux en Amérique du Nord (Doucet *et al.*, 2009; Herbstman *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2012), en Asie (Kim *et al.*, 2009) et en Europe (Gruenewald *et al.*, 2003). Par exemple, le BDE-47 a été retrouvé dans le sang de cordon à une concentration moyenne de $4,57 \pm 2,90$ ng/g de lipide dans une étude en Corée (Kim *et al.*, 2009). En 2012, aux États-Unis, il a été détecté dans le liquide amniotique à une concentration moyenne de $380 \pm 1\,141$ pg/mL (Miller *et al.*, 2012). Les PBDE sont aussi retrouvés dans le lait maternel (Marchitti *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013). Aux États-Unis, le BDE-47 était l'un des congénères les plus détectés, avec une concentration moyenne de $40,8 \pm 59,4$ ng par gramme de lipides de lait. La concentration totale de PBDE était de 34 ng par gramme de lipides (Schechter *et al.*, 2003).

Les PBDE sont détectés chez l'adulte partout dans le monde, et parfois en quantités importantes. Par exemple, aux États-Unis, leur concentration moyenne chez des habitants de New York était de 399 ng par gramme de lipides (Johnson-Restrepo *et al.*, 2005). Depuis, des études plus récentes ont démontré que les concentrations trouvées dans la population en Europe (Law *et al.*, 2014) et en Amérique (Guo *et al.*, 2016; Zota *et al.*, 2013) tendent à diminuer. Cette diminution a cependant été contredite par la suite dans une étude où des échantillons de sang

provenant de 1 253 femmes entre 2011 et 2015 démontraient au contraire une augmentation de l'exposition aux PBDE dans le temps (Hurley *et al.*, 2017).

En raison de leur persistance dans l'environnement, les PBDE ont été bannis en Europe en 2003 (Dodson *et al.*, 2012). Aux États-Unis, le pentaBDE, l'octaBDE ont été volontairement discontinués par les manufacturiers en 2004, suivis du BDE-209 en 2013 (US EPA, 2014). Au Canada, la fabrication de tous les PBDE est interdite depuis 2008 et l'utilisation, la vente et l'importation de pentaBDE, de tétraBDE et d'hexaBDE sont réglementées (ECCC, 2009).

6.1.2. Les métabolites principaux du BDE-47

Le BDE-47 est hydroxylé par les microsomes hépatiques du rat en plusieurs métabolites, principalement en 4'-OH-BDE-49 par la CYP1A1 et en 3-OH-BDE-47 par la CYP3A1 (Erratico *et al.*, 2011). Chez l'humain, les métabolites hydroxylés du BDE-47 sont sulfatés et, à moindre degré, glucuronidés (Erratico *et al.*, 2015).

6.1.3. Effets sur le système reproducteur masculin

Données épidémiologiques. Chez l'humain, il n'existe encore aucune étude associant des troubles du système reproducteur masculin à une exposition *in utero* ou pendant l'enfance aux PBDE. Par contre, quelques données d'effet chez l'adulte existent. Par exemple, chez 501 hommes du Michigan et du Texas, les concentrations de PBDE dans le sang ont été associées à une diminution de la qualité de la semence ainsi qu'à une augmentation d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Mumford *et al.*, 2015). La mobilité du sperme provenant d'hommes d'une clinique de fertilité a également été négativement associée à une exposition au BDE-47, au BDE-100 et aux PBDE totaux (Abdelouahab *et al.*, 2011). Dans une autre étude menée chez des hommes d'une clinique de fertilité, les concentrations de BDE-47 et 99 retrouvées dans la poussière de leurs maisons ont été négativement associées aux niveaux d'androgène libre, de LH et d'hormone folliculo-stimulante (FSH), et positivement associées à l'inhibine B et à la *Sex Hormone-Binding Globulin* (SHBG) (Meeker *et al.*, 2009b). De même, dans une étude semblable, une association positive entre les pentaBDE et les niveaux de SHBG et d'estradiol a été établie, ainsi qu'une association négative avec la FSH (Johnson *et al.*, 2013). Chez des hommes en santé au plus fort de leur potentiel de reproduction de la ville de Montréal, la présence de BDE-47 et de BDE-100 dans les cheveux a été négativement associée à la concentration et à la motilité spermatique (Albert *et al.*, 2018).

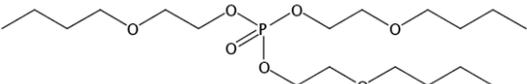
Données expérimentales in vivo. Il existe peu d'études animales sur les répercussions chez l'adulte d'une exposition *in utero* au BDE-47. Toutefois, chez des rats exposés au BDE-47 entre 8 et 21 jpc à 0,2 mg/kg pc/j (une dose correspondant à une exposition environnementale) Khalil et ses collaborateurs (2017) ont observé une activation de gènes associés à une réponse immunitaire (Khalil *et al.*, 2017). Il est connu chez la souris mâle qu'une inflammation couplée au blocage de cytokines anti-inflammatoires a pour effet de diminuer le poids testiculaire et d'affecter la morphologie des spermatozoïdes (Belloni *et al.*, 2014), deux anomalies qui ont été observées chez les rats traités dans l'étude de Khalil et ses collaborateurs (2017). La taille des spermatozoïdes avait d'ailleurs tendance à augmenter, possiblement en raison de la dérégulation de l'expression des protamines, qui jouent un rôle important dans la compaction de la chromatine des spermatozoïdes (Rathke *et al.*, 2014). La sécrétion de testostérone n'était pas affectée dans cette étude.

Des études chez le rat adulte ont associé une exposition aux pentaBDE (doses entre 0,27 et 200 mg/kg pc/j) avec des anomalies de la morphologie des spermatozoïdes et du poids de l'épididyme et de la vésicule séminale (van der Ven *et al.*, 2008), ainsi qu'avec une apoptose des cellules germinales et une augmentation des *Reactive-Oxygen Species* (ROS) (Zhang *et al.*, 2013).

6.2. Substituts du BDE-47 à l'étude

6.2.1. Le TBEP

Tableau 1.7. Caractéristiques du TBEP

Identification	TBEP - Phosphate de tributoxyéthyle ¹	Structure
Famille Formule chimique CAS Poids moléculaire Log du coefficient de partage octanol/eau (Koe)	Organophosphate $C_{18}H_{39}O_7P$ 78-51-3 398,47 g/mol 4,38	

1. van Esch, 2000

Utilisations et expositions. Le TBEP (identifié dans le Tableau 1.7) est un plastifiant utilisé dans le cirage à plancher, les caoutchoucs synthétiques ainsi que divers articles en plastique

(van Esch). En 2000, sa production annuelle en Europe était estimée entre 5 000 et 6 000 tonnes (van Esch). Le TBEP serait considéré comme facilement biodégradable selon un test de l'OCDE (OECD 301B) (Mead & Handley, 1998). Dans les années 80 et 90, il a été fréquemment détecté dans l'air (Weschler, 1984; Yasuda, 1980), la poussière (Nakashima *et al.*, 1993), l'eau potable (LeBel & Williams, 1983) et la nourriture (Gunderson, 1995). Plus récemment, plusieurs études rapportent que le TBEP est parmi les organophosphates les plus détectés dans notre environnement. Dans des effluents en Suède, il était l'un des organophosphates les plus abondants (3 100-11 000 ng/L) (Marklund *et al.*, 2005), tout comme dans des échantillons d'eau d'épuration en Autriche (5400 ng/L) (Martinez-Carballo *et al.*, 2007) et dans l'eau du robinet en Chine (Li *et al.*, 2014a). En Amérique du Nord, le TBEP a été détecté dans les sédiments des Grands Lacs (Cao *et al.*, 2017), tout comme ceux du Lac Tai en Chine (Cao *et al.*, 2012). Dans la poussière de maisons en Nouvelle-Zélande, les concentrations moyennes de TBEP étaient de 13 687,5 ng/g de poussière (Ali *et al.*, 2012).

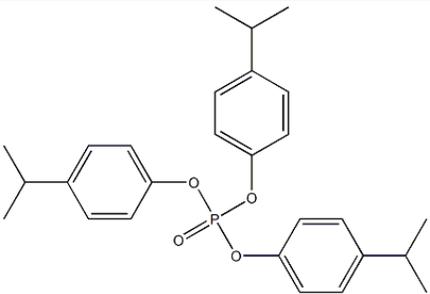
Dans la faune, on a constaté la présence de TBEP dans des œufs de harengs en Amérique, dans les Grands Lacs (Greaves & Letcher, 2014), ainsi que chez des pygargues à queue blanche et leurs poussins en Norvège (Eulaers *et al.*, 2014). Chez l'humain, le TBEP a été détecté dans le lait maternel en Asie (concentrations médianes entre non-détectables et 206 ng/g de lipide) (Kim *et al.*, 2014) et en Suède (concentration médiane de 4,7 ng/g de lipides) (Sundkvist *et al.*, 2010), ainsi que dans des échantillons d'urine d'enfant en Allemagne (concentration médiane de 2,0 µg/L) (Fromme *et al.*, 2014).

Les métabolites principaux du TBEP. La toxicocinétique et les métabolites de ce composé n'ont pas encore été caractérisés.

Les effets du TBEP sur la reproduction. Les effets du TBEP sur la reproduction sont peu documentés. Un rapport non publié de Monsanto n'a rapporté aucun effet de ce plastifiant sur des rats exposés entre 6 jpc et 15 jpc (van Esch, 2000). *In vitro*, le TBEP réduit la viabilité d'une lignée immortalisée de cellules de Leydig de souris (cellules de Leydig TM3), induit un stress oxydatif et réduit l'expression de gènes reliés à la synthèse de testostérone (p450scc, p450-17α, 17β-HSD) (Jin *et al.*, 2016). Il agirait également en tant qu'antagoniste des récepteurs aux androgènes (IC50 = 2,59x10⁻⁵ M) (Elliott *et al.*, 2017).

6.2.2. L'IPPP

Tableau 1.8. Caractéristiques de l'IPPP

Identification	IPPP - Phosphate de triphényle isopropylié	Structure
Famille Formule chimique CAS Poids moléculaire Log du coefficient de partage octanol/eau (Koe)	Organophosphate ¹ C ₂₇ H ₃₃ O ₄ P ¹ 68937-41-7 ¹ 452,52 g/mol 5,1 ²	

1. US EPA, 2015; 2. van der Veen & de Boer, 2012

Utilisations et expositions. L'IPPP (identifié dans le Tableau 1.8) est un organophosphate utilisé en tant que retardateur de flamme dans les câbles, les mousses en vinyle ou encore les lubrifiants (Brooke *et al.*, 2009; Weil, 1993). On le retrouve en général dans des mixtures commerciales avec d'autres phosphates de triphényle isopropyliés (US EPA, 2015). L'IPPP est notamment retrouvé dans la mixture Firemaster 550 (McGee *et al.*, 2013), qui est de plus en plus utilisée depuis la mise en place de réglementations concernant l'utilisation de mixtures de pentaBDE (Dodson *et al.*, 2012). Aux États-Unis, il a été détecté dans l'air, l'eau, les sédiments et le sol (Boethling & Cooper, 1985; Brooke *et al.*, 2009; David & Seiber, 1999; Salamova *et al.*, 2014). Plusieurs composés apparentés (par exemple l'isopropylphényl phényl phosphate (ip-PPP), le triphényl phosphate (TPHP) ou le diphenyle phosphate (DPHP)), ont été détectés dans 100 % des échantillons d'urine de mères et de leurs enfants aux États-Unis (Butt *et al.*, 2016), ainsi que chez des patients d'une clinique de fertilité (Ingle *et al.*, 2018). Malgré la prévalence de l'exposition, aucun effet sur la fertilité n'a été observé. Par contre, une diminution du taux de fécondation chez des femmes fréquentant une clinique de fertilité a été associée à la détection de ces composés dans l'urine (Carignan *et al.*, 2017; Carignan *et al.*, 2018).

Les métabolites principaux de l'IPPP. Il n'existe actuellement aucune donnée sur la toxicocinétique et les métabolites de l'IPPP chez les animaux et les humains.

Les effets de l'IPPP. La plupart des études animales sur la toxicité de l'IPPP se limitent à des résumés d'études toxicologiques réglementaires. Celles-ci ont observé, entre autres, une

diminution du poids testiculaire, une légère augmentation du poids des glandes surrénales et une inhibition de l'acétylcholinestérase dans le cerveau chez les rongeurs adultes (US EPA, 2015). La plupart de ces résultats ont été obtenus à partir de mélanges commerciaux (par exemple Firemaster 550, Reolube HYD et Reofos 50) qui contenaient de l'IPPP.

L'une des rares études publiques disponibles s'est penchée sur les effets du Firemaster 550 chez le rat pendant la gestation et la lactation. Les quantités d'IPPP dans cette mixture sont estimées à 55 % (Phillips *et al.*, 2017). Les résultats comprenaient une augmentation des niveaux de thyroxine sérique et une réduction de l'activité hépatique de la carboxylestérase chez les mères, ainsi qu'une puberté précoce chez les femelles, une prise de poids et une hypertrophie cardiaque chez les mâles (Patisaul *et al.*, 2013). Dans une autre étude réalisée par Wade et ses collaborateurs (2019) chez le rat adulte, l'exposition à l'IPPP a provoqué une augmentation du poids du foie et des glandes surrénales chez les mâles et les femelles (Wade *et al.*, 2019). Les effets sur les gonades et la reproduction n'ont pas été évalués dans cette étude.

7. Problématique, objectifs et hypothèses

7.1. Problématique

Globalement, cette revue de littérature a mis en évidence les points suivants:

- Le testicule fœtal est très vulnérable aux perturbations hormonales au cours de la fenêtre de masculinisation programmée qui a lieu avant la différenciation morphologique du système reproducteur masculin.
- Une exposition aux PE au cours de la période fœtale peut avoir des répercussions à moyen et long terme sur l'appareil reproducteur et la fertilité à l'âge adulte.
- De nombreux composés de source synthétique sont considérés comme des PE, comme le DEHP, de la famille des plastifiants, et le BDE-47, de la famille des retardateurs de flamme.
- Le potentiel PE et la toxicité des substituts du DEHP et du BDE-47 sont encore très peu caractérisés. Pourtant, ces substituts sont présentement détectés dans l'environnement et l'exposition humaine est souvent déjà avérée.
- Actuellement, les méthodes utilisées pour tester le potentiel PE de nouvelles substances sont coûteuses en temps et en ressources.
- La culture organotypique de testicule fœtal permet de tester rapidement plusieurs substances ou plusieurs concentrations d'une même substance, de manière à compléter les études *in vitro* tout en limitant le temps d'analyse, le coût et l'utilisation d'animaux par rapport aux études

développementales classiques. Cette méthode a déjà été utilisée pour étudier les impacts du métabolite actif principal du DEHP sur le testicule fœtal (Chauvigne *et al.*, 2009; Chauvigne *et al.*, 2011).

7.2. Objectif et hypothèses

L'objectif de ce projet de recherche consiste à évaluer le potentiel PE et la toxicité de substituts du DEHP et du BDE-47 en utilisant un modèle de culture organotypique de testicules fœtaux de rat. Notre hypothèse est que, tout comme dans les études ayant testé les effets du DEHP et de ses métabolites sur le testicule fœtal de rat en culture (Chauvigne *et al.*, 2009; Chauvigne *et al.*, 2011), le MEHP devrait induire une diminution significative des sécrétions basales et stimulées par la LH de testostérone et ainsi valider notre modèle de culture. D'après les données non-publiées du laboratoire de Bernard Robaire de l'Université McGill, nous pensons également que le MEHP et le BDE-47, ainsi que les substituts qui semblent être les plus cytotoxiques (TXIB et IPPP) sur les lignées de cellules de Leydig MA-10 et/ou germinales C18-4, ont plus de chance de démontrer avec notre modèle un potentiel PE et une toxicité sur les principaux types de cellules du testicule que les composés qui semblent être les moins cytotoxiques (DiNP, DIDA et TBEP).

Pour tester ces hypothèses, les testicules fœtaux de rat ont été exposés en culture organotypique au MEHP, au BDE-47 et aux substituts sélectionnés sur une période de trois jours correspondant à la fenêtre de masculinisation programmée. Les composés ont été testés à 10^{-5} M, une concentration pour laquelle le MEHP est connu pour diminuer les sécrétions de testostérone des testicules fœtaux de rats en culture (Chauvigne *et al.*, 2009). Le potentiel PE a été déterminé en fonction des effets des composés sur la sécrétion de testostérone. La toxicité a été évaluée par immunofluorescence à l'aide d'un triple marquage des principaux types de cellules testiculaires.

CHAPITRE 2: SCREENING FOR TOXICITY AND ENDOCRINE DISRUPTOR POTENTIAL OF EMERGING PLASTICIZERS AND FLAME-RETARDANTS USING RAT FETAL TESTIS ORGAN CULTURE

Titre de l'article en français : Criblage de la toxicité et du potentiel perturbateur endocrinien de plastifiants et d'ignifugeants émergents en culture organotypique de testicules fœtaux de rat.

L'article est préparé en vue d'une soumission à la revue *Reproductive Toxicology*.

Contribution des auteurs

Les expériences et les analyses contenues dans cet article ont été réalisées par Sarah Tardif, la première auteure. La supervision de la démarche scientifique et l'avancement du projet de recherche ont été supervisés par la directrice de recherche, Géraldine Delbès, et son collaborateur Bernard Robaire. L'article a été rédigé par Sarah Tardif et révisé en partie par Géraldine Delbès.

Résumé de l'article en français

Désignés comme perturbateurs endocriniens (PE) dans les dernières années, le bis (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP), un plastifiant, et le 2,2',4,4'-tétrabromodiphényléther (BDE-47), un ignifugeant, sont actuellement réglementés et remplacés par des substituts dont la toxicité est inconnue. Trois substituts du DEHP, le phtalate de diisononyle (DiNP), l'adipate de diisodécyle (DIDA) et le diisobutyrate de 2,2,4-triméthyl-1,3-pentanediol (TXIB), et deux substituts du BDE-47, le phosphate de tributoxyéthyle (TBEP) et le phosphate de triphényle isopropylé (IPPP), ont été évalués et comparés aux produits qu'ils remplacent en utilisant un modèle de culture organotypique de testicules fœtaux de rat. Cette méthode a déjà été utilisée pour tester les effets de 10^{-5} M de MEHP, le métabolite actif principal du DEHP. Les sécrétions journalières de testostérone basales et stimulées par la LH ont été mesurées par dosage immuno-enzymatique (ELISA). Après trois jours de culture, la densité et le taux de prolifération des principaux types de cellules testiculaires ont été analysés par immunofluorescence. À 10^{-5} M, seul le MEHP a induit une diminution significative de la sécrétion de testostérone et de la prolifération des cellules de Sertoli. Une diminution de la densité des cellules germinales a été observée après traitement au MEHP ou au BDE-47, mais seule l'exposition au MEHP a eu un effet significatif. Les résultats

n'indiquent aucune preuve d'un potentiel PE et d'une toxicité marquée des substituts, mais devront être appuyés par davantage que trois réplicats afin de déterminer si d'autres études toxicologiques sont nécessaires.

Mots-clés : Testicule fœtal, plastifiants, retardateurs de flamme, culture organotypique, testostérone, cellules de Leydig, cellules de Sertoli, cellules germinales.

Article à être soumis

SCREENING FOR TOXICITY AND ENDOCRINE DISRUPTOR POTENTIAL OF EMERGING PLASTICIZERS AND FLAME-RETARDANTS USING RAT FETAL TESTIS ORGAN CULTURE

Sarah Tardif¹, Bernard Robaire^{2,3} and Geraldine DELBES^{1,*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier Santé et Biotechnologie, 531 boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada (H7V 1B7)

²Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, (Quebec) Canada.

³Department of Obstetrics & Gynecology, McGill University, Montreal, QC, H4A 3J1, Canada

*Corresponding author:

Geraldine Delbes

Institut national de la recherche scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
531 boulevard des Prairies, Laval (Quebec), Canada H7V 1B7.

Phone: 450 687-5010 ext. 8830

E-mail: geraldine.delbes@iaf.inrs.ca

Short title: **SAFETY OF EMERGING PLASTICIZERS AND FLAME-RETARDANTS**

Abbreviations: EDC, endocrine disrupting chemical; TDS, testicular dysgenesis syndrome; PBDE, polybrominated diphenyl ether; DEHP, bis (2-ethylhexyl) phthalate; MEHP, monoethylhexyl phthalate; DiNP, diisononyl-phthalate; DIDA, diisodecyl adipate; TXIB, 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate; BDE-47, 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether; TBEP, tributoxyethyl phosphate; IPPP, isopropylated triphenyl phosphate ; BPA, bisphenol A; dpc, days post-coitum; 3 β -HSD, 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase ; MIS, Mullerian inhibiting substance; SMA, smooth muscle actin; Wilcoxon matched-pairs signed rank test, analysis of median; Mann-Whitney test; analysis of median.

Abstract

Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), a plasticizer, and 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), a brominated flame-retardant, have been designated as endocrine disrupting chemicals (EDCs) and are currently being replaced by emerging products of unknown toxicity. Three substitutes for DEHP, diisononyl phthalate (DiNP), diisodecyl adipate (DIDA) and 2,2,4 trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB), and two substitutes for BDE-47, tributoxyethyl phosphate (TBEP) and isopropyl triphenyl phosphate (IPPP), were evaluated and compared to the products they replace using an organ culture model of rat fetal testes. This method was previously used to assess the effects of 10^{-5} M of MEHP, the major active metabolite of DEHP. Daily basal and LH-stimulated testosterone secretions were measured by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). After three days of culture, the density and proliferation rate of the main testicular cell types were analysed by immunofluorescence. At 10^{-5} M, only MEHP induced a significant decrease in testosterone secretions and Sertoli cell proliferation. A decrease in germ cell density was observed after treatment with MEHP or BDE-47, but only exposure to MEHP had a significant effect. The results indicate no evidence of EDC potential or marked toxicity of the substitutes but will need to be supported by more than three replicates to determine if further toxicological studies are required.

Key words: Fetal testis, plasticizers, flame retardants, organ culture, testosterone, Leydig cells, Sertoli cells, germ cells.

Highlights:

1. DEHP and 3 of its substitutes (DiNP, DIDA and TIXB) were tested using organ culture
2. BDE-47 and 2 of its substitutes (TBEP and IPPP) were tested using organ culture
3. Only MEHP induces a decrease of testosterone secretions of rat fetal testes in culture
4. Only MEHP induces a decrease of the density of rat fetal germ cells
5. Only MEHP induces a decrease of proliferation of rat fetal Sertoli cells

Introduction

Growing concern have been raised regarding the impacts of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on male reproduction. In the past years, several chemicals of synthetic sources have been shown to be EDCs because of their anti-androgenic properties and their effects on the male reproductive tract (Akingbemi *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 2005). This is the case for bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), which belong to the families of phthalates and brominated flame retardants, respectively. DEHP is the most commonly used phthalate as an additive providing flexibility to polyvinyl chloride. Its use is therefore ubiquitous in children's toys, packaging, medical equipment, lubricants and body care products (Kavlock *et al.*, 2006; Schettler, 2006). In rat, *in utero* exposure to DEHP and/or its metabolites at doses ranging from 10 mg/kg/day to 750 mg/kg/day is known to induce a decrease of testosterone synthesis, hypospadias, cryptorchidism and nipple retention (Christiansen *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 2000). A decrease of the anogenital distance of baby boys has also been associated with high maternal exposure to DEHP and its metabolites, such as MEHP (Swan, 2008).

BDE-47 is the dominant congener of polybrominated diphenyl ethers (Geyer *et al.*, 2004), a class of flame-retardant chemicals found in textiles, furniture and electrical items (Stapleton *et al.*, 2008; US EPA, 2009). Exposure to doses of BDE-47 between 0.2 and 200 mg/kg/body weight/day induces a decrease of testis weight as well as sperm production and motility in adult and in *in utero* rodent models (Khalil *et al.*, 2017; van der Ven *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013). Abnormal spermatozoa morphology and decrease of sperm motility have also been associated with BDE-47 exposure in adult men (Abdelouahab *et al.*, 2011; Mumford *et al.*, 2015).

In 2010, the Canadian Health Measures Survey (CHMS) data revealed that Canadians are largely exposed to plasticizers and flame-retardants (CHMS, 2010). Indeed, these compounds are not chemically bound to product materials and can consequently leach out into the environment (Thomas & Thomas, 1984). For example, in Canada in 2015, DEHP was detected in 111 of 159 food samples tested and 100 % of dust sampled in 126 homes (Arbuckle *et al.*, 2014; Kubwabo *et al.*, 2013). Even more concerning, both MEHP and BDE-47 have been found in samples of human amniotic fluid and cord blood in various countries. For example, between 2009 and 2018, MEHP was found in amniotic fluid in Europe and Asia at average concentrations of 0.8 to 2.7 µg/L (Katsikantami *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018; Wittassek *et al.*, 2009). In a 2003 study, Latini and collaborators detected DEHP in cord blood at an average concentration of 1.9 µg/mL (Latini *et al.*, 2003).

BDE-47 was found in cord blood at an average concentration of 4.57 ng/g of lipid in a study in Korea (Kim *et al.*, 2009). In the United States, it was detected in amniotic fluid at a mean concentration of 380 pg/mL (Miller *et al.*, 2012).

These evidences of fetal exposure to EDCs is of particular concern considering that a hormonal imbalance during the fetal stage can lead to disorders of the male reproductive function in adulthood (Skakkebaek *et al.*, 2001). The fetal testis is particularly sensitive to androgen variation, especially during the programmed masculinization window that occur between 15.5 and 18.5 days post-coitum (dpc) in rat (Welsh *et al.*, 2008). Exposure to EDCs during this period is associated with abnormalities of testicular development that include cryptorchidism, hypospadias and testicular cancer, gathered into one syndrome called the “Testicular Dysgenesis Syndrome” (TDS) (Sharpe & Skakkebaek, 2008).

Given their toxicity, MEHP and BDE-47 are currently regulated in several countries. To meet market demand, they are gradually replaced by emerging products. Current regulations do not require to demonstrate that alternative chemicals are safer than those they replace. Consequently, these compounds with unknown toxicity and EDC potential are already found in our environment (Bui *et al.*, 2016; Calafat *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2017). Therefore, there is a need to develop rapid and sensitive methods that provide insights into the EDC potential of these emerging chemicals. To this end, organ cultures of rat fetal testes, a particularly sensitive organ to steroid hormone modulations, can be used for such test. Indeed, this model has previously been used to test DEHP/MEHP toxicity (Chauvigne *et al.*, 2009; Lambrot *et al.*, 2009) and more recently to study the toxicity of Bisphenol A substitutes (Geyer *et al.*) such as Bisphenol S and Bisphenol F (Eladak *et al.*, 2015). This organ-based assay reproduces *ex vivo* the *in vivo* development of the fetal testis while preserving testicular architecture and intercellular communications, unlike cell lines. Also, it allows precise study of the action of a given compound at a specific dose and exposure time. Since the controlled and the treated testes can come from the same fetus, individual variability is limited. Furthermore, this procedure is less time-consuming than *in vivo* studies and requires less animals.

In this study, we applied this experimental approach to test the EDC potential and the toxicity of three substitutes for DEHP and two substitutes for BDE-47 and compared their effects with those of legacy compounds. All substitutes are currently detected in indoor dust and/or consumer products (Bui *et al.*, 2016; Calafat *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2014) and their selection was based on range of cytotoxicity detected on two testicular cell lines: the MA-10 and the C18-4

(Bernard Robaire laboratory, McGill University, unpublished data). For the plasticizers family, we tested two replacements, diisononyl-phthalate (DiNP) and diisodecyl adipate (DIDA), which seem to be the least cytotoxic, and the potentially most toxic replacement, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB). For the flame-retardant family, we tested tributoxyethyl phosphate (TBEP), which seems to be the least toxic substitute, and isopropylated triphenyl phosphate (IPPP), potentially the most toxic. The EDC potential was evaluated based on the effect on testosterone secretions while the toxicity on testicular development was tested using immunofluorescence staining that allowed the simultaneous study of germ cells, Sertoli cells and Leydig cells.

Material and methods

Chemicals

Tested chemicals were purchased from different suppliers as listed in Table 2.1. Stock solutions of each chemical were made at 1000X in DMSO (Sigma Aldrich, #472301-4L) and stored at -80°C . At the beginning of each week of culture, 1000X stock solutions were diluted to 10X into culture medium (DMEM/F-12, HEPES 15 mM without phenol red – Gibco, #11039021) supplemented by 0.04 mg/mL of gentamicin (Life Technologies, #1570-060) and kept at 4°C . The 10X solution was diluted ten times in the culture well daily during organ culture to obtain a final concentration of 10^{-5} M. Control wells received 1:1000 of the DMSO vehicle.

Table 2.1. List of plasticizers and flame retardants.

Molecular weight (g/mol)	Chemical name	CAS	Supplier	CoA purity (%)
278.34	Monoethylhexyl phthalate (MEHP)	4376-20-9	Wako Pure Chemical Industries Ltd. via Fisher Scientific	96.3
418.6	Diisononyl-phthalate (DiNP)	28553-12-0	MP Biomedicals LLC	99.6
426.67	Diisodecyl adipate (DIDA)	27178-16-1	Sigma-Aldrich	99.7
286.41	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB)	6846-50-0	Sigma-Aldrich	99.34
485.8	2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)	5436-43-1	Cerilliant via Sigma-Aldrich	98

398.47	Tributoxyethyl phosphate (TBEP)	78-51-3	Sigma-Aldrich	93.6
452.52	Isopropylated triphenyl phosphate (IPPP)	68937-41-7	Gift from Michael G. Wade, Environment Health Science and Research Bureau, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada	Not listed

Animals

Sprague-Dawley rats expressing GFP (ROSA-EGFP) specifically in germ cells were used (Cronkhite *et al.*, 2005). Animal studies were conducted in accordance with the guidelines set out by the Canadian Council of Animal Care (CCAC) and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the INRS (Protocol N^o: 1808-01). Females were caged with males for one night. Sperm-positive females were identified in the following morning by vaginal smears. That day was counted as 0.5 days post-coitum (dpc). At 15.5 dpc, pregnant females were euthanized by CO₂ asphyxiation followed by cervical dislocation, and fetuses were quickly removed from the uterus and placed on ice. Their sex was determined by the morphology of the gonads under a binocular microscope. In semi-sterile conditions, testes were dissected from the fetuses and kept in HBSS (Gibco, #14175-095) on ice before seeding in culture.

Organ culture

Organ cultures were done as previously described (Lassonde *et al.*, 2015). Briefly, each testis was placed on hydrophilic PTFE cell culture inserts with pore size of 0.4 µm (Millipore, #PICM01250). Inserts were floating on top of 400 µL of culture media in a 24-well culture plate. For each animal, one testis was placed in control media (containing 1/1000 DMSO) and the other was placed in media containing 10⁻⁵ M of the chemical to be tested. Cultures were incubated for 3 days in a humidified atmosphere at 37 °C and 5 % CO₂. Culture media was changed daily and kept at -20 °C for further testosterone measurements. After 72h of culture, 100 ng/mL of ovine luteinized hormone (Gahankari & Golhar) (National Hormone and Pituitary Program, #AFP8614B) and 10⁻⁵ M of bromodeoxyuridine (BrdU) (BD Cell proliferation Kit, #557891) were added to fresh culture media for a subsequent 3h incubation. At the end of culture, testes were fixed for 24h in fresh modified Davidson Fluid (30 % Formalin 37-40 % (Bioshop, #FOR201-1), 15 % Anhydrous Ethanol, 5 % Glacial acetic acid (Fisher Scientific, #A38212) and 50 % double-distilled water (ddH₂O)) (Latendresse *et al.*, 2002). Fixed testes were dehydrated, embedded in paraffin and cut in 5 µm sections for further histological analysis.

Testosterone secretion measurements

Basal and LH-stimulated testosterone secretions were measured by ELISA (kit IBL, #IB79106) in daily-collected culture media. Optical density was determined at 450 nm using a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan GO, Rev. 1.0, #N10589). Standard curves were generated using GraphPad Prism 6 and followed a four-parameter logistic regression model.

Histology

Three sections per testis were mounted on one slide, deparaffinized, rehydrated and stained with hematoxylin (Surgipath, #3801520) for 2 minutes and with eosin (Leica, #3801602) for 3 minutes. Stained sections were dehydrated and slides were mounted using Permount mounting medium (Fisher Chemical, #SP15-100).

Immunofluorescence

3 β -HSB / GFP / MIS triple staining. Two representative sections per testis were mounted on one slide, deparaffinized and rehydrated. Slides were submerged and microwaved for 10 minutes at full power in a pH9 antigen-retrieval Buffer containing Tris 10 mM (Sigma Life Scientific, #T1503-KG), EDTA 1 mM (Sigma Aldrich, #EDS-500G) and Tween20 0,05 % (Fisher Scientific, #BP337-500). Slides were microwaved again for 7 minutes at 30 % power, left to cool down for 15 minutes at room temperature and washed 3 times, 5 minutes in ddH₂O. Incubation with blocking solutions and antibodies were done in a humidified chamber. Tissues were blocked at room temperature in 5 % BSA (Sigma Life Science, #A403-506) in PBS for 1h. The 3 β -HSB/GFP/MIS triple staining was performed by incubating the tissues overnight at 4 °C with three conjugated primary antibodies (anti-3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) (1:200, Chicken, Immune Biosolution, #Y00098-ATTO647), anti-green fluorescent protein (GFP) (1:200, Rabbit, Life technologies, #A21311) and anti-Mullerian inhibiting substance (MIS) (1:200, mouse, Santa Cruz, #sc-166752 AF594)) diluted in PBS containing 1 % BSA (Figures S1-S3). After 3 washes in PBS for 5 minutes each, slides were incubated with Dapi (Thermo-Fisher, #D1306) for 15 minutes at room temperature. After 3 washes in PBS, slides were mounted using the Prolong Gold Antifade mountant (Thermo Fisher Scientific, #P36930). Slides were dried overnight at room temperature then kept at 4 °C. Negative controls were done by omitting primary antibodies.

SMA/BrdU/3 β -HSB triple staining. At least 2 sections per testis were mounted on one slide, deparaffinized and rehydrated. Tissues were incubated for 5 minutes at room temperature with pepsin (Sigma, #R2283-15 mL), 10 minutes at 37 °C with 0.2N HCl (Fisher Scientific, #A114-212) and 10 minutes at 37 °C with 2N HCl, with PBS washed in between. Tissues were then blocked for 1h at room temperature in 5 % BSA in PBS. SMA/3 β -HSD/BrdU triple staining was performed by incubating the tissues overnight at 4 °C with the primary antibodies (conjugated anti-smooth muscle actin (SMA) (1:400, rabbit, Abcam, #ab202509), anti-BrdU (1:200, BD Cell proliferation Kit, #557891) and conjugated anti-3 β -HSD (1:200, Chicken, Immune Biosolution, #Y00098-ATTO647)) in PBS containing 1 % BSA (Figures S6-S7). Tissues were washed in PBS and incubated with anti-mouse IgG (H+L) AF488 (1:200, Goat, Invitrogen, #1787787) in 1 % BSA in PBS for 1h at room temperature. Tissue were washed again in PBS, stained with Dapi for 15 minutes at room temperature and mounted as described above. Negative controls were done by omitting primary antibodies.

Stereology and cell counting

8-bit color images of testicular sections were taken at 20X using a Nikon eclipse Ti-S inverted microscope equipped with a DS-Ri2 camera and the NIS-Elements imaging software. Analysis were done blind to the treatment group, using the ImageJ software on at least two sections per sample.

Cell and testis surface measurements

The surfaces of each tissue section and testis cords were determined using the free-hand selections tool to respectively draw around the tissue or the cords delimited by the MIS-staining. Leydig cell surfaces were calculated by converting the pictures to RGB color images. Using the color Threshold tool on the 3 β -HSD fluorescence intensity, we were able to automatically determine, select and measure Leydig cell surface per section.

Cell density and surface

Cell number was determined using the multi-point tool on sections stained with 3 β -HSB, GFP and MIS. Sertoli cells (MIS-positive cells) or germ cells (GFP-positive cells) contained in well delimited testis cords were counted and cell density was determined by dividing their number by

the corresponding testis cord surface. For each sample, the cell density was determined for at least 75 000 μm^2 of intact testis cords. Similarly, Leydig cells (3β -HSD-positive cells) density and surface were established by dividing the Leydig cell number or surface by the total tissue surface.

Proliferation index

Proliferation was evaluated based on the incorporation of BrdU in the last 3h of culture. BrdU-positive and BrdU-negative cells were counted within testis cords delimited by the α -SMA staining or in 3β -HSD-positive cells in the interstitium (Figure 4). Within testis cords, Sertoli cells were identified based on their nucleus morphology. Proliferation index was calculated by dividing the number of BrdU-positive Sertoli cells or Leydig cells by their total number. For each sample, totals of at least 290 Sertoli cells or 200 Leydig cells were counted.

Statistics

Data are expressed as the mean \pm standard error to the mean (SEM) of at least 3 different cultures, each originating from different litters (n). For testosterone secretion analysis, mean values of the exposed testes are compared to the control contralateral testes with a two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test. For immunofluorescence analysis, means values after treatment are compared to controls using a two-tailed Mann-Whitney test.

Results

To screen the impact of MEHP, BDE-47 and their substitutes, we used an organ culture system that replicates *ex vivo* the *in vivo* rat fetal development. Testes from fetuses sampled at 15.5 dpc were cultured for 3 days, one in control media and the contralateral in media supplemented with 10^{-5} M of plasticizers MEHP or its substitutes DiNP, DIDA or TXIB, or with 10^{-5} M of flame retardants BDE-47 or its substitutes TBEP and IPPP.

Impact on basal and LH-stimulated testosterone secretion

To test the EDC potential of MEHP, BDE-47 and their substitutes, we tested their impact on daily testosterone secretion measured in culture media. Treatment with 10^{-5} M MEHP was used as a positive control as it significantly decreased daily basal testosterone secretions from

24h (Chauvigne *et al.*, 2009). Our data showed the same effects (Figure 2.1A). However, none of MEHP substitutes tested had any effect (Figures 2.1A). Exposure to neither 10^{-5} M of BDE-47 nor its substitutes TBEP and IPPP had any effect (Figure 2.1B).

After 72h of culture, 100 ng/ml of LH was added to the culture media for 3h to test the impact on LH-stimulated testosterone secretion. Control and treated testes all kept their ability to respond to LH-treatment and significantly increased testosterone secretion compared to the basal one (Figure 2.1A and B). Results show that similarly to what was observed for basal daily testosterone, LH-stimulated testosterone secretions were significantly decreased only after exposure to MEHP (Figure 2.1A and B).

Impact on the global testicular tissue organisation

The toxicity of the chemicals was first evaluated on testicular histology. Cross sections were stained with eosin and hematoxylin to visualise the global tissue organisation. Visual analysis of 3 sections per sample for at least 3 samples per treatment showed that the two fetal testicular compartments, the interstitium and the testis cords, were preserved for all treatments compared to controls (Figure 2.2).

Impact on cell density and surface

More in-depth analysis of the impact of each chemical was done using a triple immunofluorescence staining in which germ cells were identified as GFP-positive, Sertoli cells as MIS-positive and Leydig cells as 3β -HSD-positive (Figures S1-S3). Counterstaining for Dapi was done to visualize nuclei. The staining for each cellular marker was specific, but highly autofluorescent cells were observed in the interstitium even without antibody staining (Figure S4A and B) and their number was not affected by any treatment (Figure S4C).

Germ cell and Sertoli cell density were determined in intact testis cords (Figure 2.3A), defined as complete, organized and artefact-free. The average surface of "intact" testis cords per tissue section did not vary for any treatment compared to controls (Figure S5). As shown in Figure 2.3D, a decrease in germ cell density was observed after treatment with MEHP or BDE-47, but only exposure to MEHP had a significant effect. In parallel, the density of Sertoli cells was not affected by any treatment (Figure 2.3E).

Leydig cell density (Figure 2.3B) and surface (Figure 2.3C) were also quantified after exposure to each chemical. For all treatments, we did not observe any effect (Figure 2.3F and G).

Impact on cell proliferation and apoptosis

To further characterize the impact of each treatment, we measured cell proliferation by BrdU incorporation during the last 3 hours of culture, revealed by immunofluorescence staining (Figures S6-S7). To identify cell types, we did a co-staining with 3 β -HSD identifying interstitial Leydig cells and α -SMA revealing the peritubular cells surrounding the testis cords. Inside testis cords, germ cells and Sertoli cells were differentiated based on the morphology of their nucleus (Figure 2.4A). No BrdU-positive germ cells was ever observed as at that stage they are quiescent. This revealed that none of the treatment affected the entrance in the quiescence phase. However, we observed BrdU-positive Sertoli cells and confirmed that MEHP significantly decreased the percentage of BrdU-positive Sertoli cells (Figure 2.4C). However, none of the other treatment had any effect on Sertoli cells proliferation. Finally, we observed very low rate of BrdU-positive Leydig cells (Figure 2.4B and D) with less than 0.5 % in controls. Therefore, we could not test the impact of MEHP on this parameter because of the low intensity of 3 β -HSD. Interestingly, every other chemical tested, except for DIDA, significantly increased the percentage of BrdU-positive Leydig cells (Figure 2.4D).

To further understand the negative impact of MEHP on germ cells, we used cross sections stained with eosin and hematoxylin and searched for apoptotic bodies, identified by their condensed nucleus and the white halo around them (Figure 2.5). Visual analysis of apoptosis inside the testis cords showed no difference between the control and the treated testes.

Discussion

The main objective of the present work was to evaluate the direct effects of three DEHP substitutes (DiNP, DIDA and TXIB) and two BDE-47 substitutes (TBEP and IPPP) on rat fetal testis development and function. Their effects were compared with those of the legacy compounds they replace, MEHP, the main active metabolite of DEHP, and BDE-47. To this end, we used an organ culture system of rat fetal testis previously validated by others assessing the impact of MEHP, BPA and other xenoestrogens (Chauvigne *et al.*, 2009; Eladak *et al.*, 2015; Lassonde *et al.*, 2015; Lassarguere *et al.*, 2003). The EDC potential of each compound was

evaluated based on the effect on testosterone secretions while the toxicity on testicular development was tested using immunofluorescence staining that allowed the simultaneous study of germ cells, Sertoli cells and Leydig cells.

EDC potential of the compounds

Using our organ culture system, we found that 10^{-5} M of MEHP induces a significant decrease of basal and LH-stimulated testosterone secretions of 15.5 dpc rat fetal testes cultured until day 18.5 post-coitum. The greatest decrease in testosterone secretions (around -75 %) was observed after 72 hours of culture. A previous organ culture study showed similar results with 14.5 dpc rat fetal testes cultured for 3 days with 10^{-5} M of MEHP (Chauvigne *et al.*, 2009). Compared to controls, basal testosterone levels were slightly decreased after 24h of exposure, then drastically decreased after 48h and 72h of exposure (Chauvigne *et al.*, 2009). The intrinsic relative amplitude of the response to LH was unchanged, indicating that the antiandrogenic activity of MEHP occurs separately from Leydig cell receptivity to LH (Chauvigne *et al.*, 2009). As in our study, testes were cultured during the programmed masculinisation window (around 15.5 to 19.5 dpc in rat), when the fetal testis is the most sensible to androgens variations (Welsh *et al.*, 2008). These data are consistent with an *in-utero* rat study where maternal DEHP treatment at 750 mg/kg/day from gestational day (GD) 14 to postnatal day (PND) 3 caused a reduction in testosterone production (Parks *et al.*, 2000). The consistency between the literature and our results makes the treatment with MEHP a good positive control for the decrease of testosterone secretions of cultured rat fetal testes.

In contrast to MEHP, the legacy compound of the plasticizers family, DiNP, DIDA and TXIB had no effect on basal and LH-stimulated testosterone secretions. We did not find any published *in utero* studies on the male reproductive system to compare this result, nor epidemiological studies, except for DiNP, a phthalate with a structure similar to DEHP. Contradicting our results, previous *in utero* studies have shown that this phthalate can decreased testosterone production by rat fetal testes at doses range generally above 250 mg/kg body weight/day (Boberg *et al.*, 2011; Borch *et al.*, 2004; Furr *et al.*, 2014; Hannas *et al.*, 2011). In rat, Hannas and collaborators (2011) also found a decrease in STAR and CYP11a expression following exposure to DiNP between GD14 and GD18 (Hannas *et al.*, 2011). However, even at high doses of DiNP, these effects were not consistently observed across studies. In general, they are similar to the effects of DEHP, but remain less significant. Considering these findings, we cannot exclude the possibility that DiNP could affect testosterone secretions of rat fetal testis explants at higher doses. It is also

possible that its metabolites could have a greater or opposite effect on androgen secretions of the fetal testis. In another rat fetal testis culture study, DEHP was shown to have a pro-androgenic effect on the fetal testis, whereas its monoester metabolite, MEHP, had an anti-androgenic effect (Chauvigne *et al.*, 2009). In further studies, it would therefore be important to test with our culture model if mono-isononyl phthalate (MiNP), the monoester metabolite of DiNP (Clewell *et al.*, 2013), has an antiandrogenic effect similar to MEHP.

We did not observe any impact of BDE-47 on basal and LH-stimulated testosterone secretions. Its two substitutes, TBEP and IPPP, both organophosphates, also had no effect. We cannot compare these results with other *ex vivo* studies since this is the first time that flame-retardants or any organophosphate have been tested with this culture model. In the literature, we only found one relevant *in utero* study in rat regarding the effect of BDE-47 on the male reproductive system. Maternal exposure to environmental relevant doses of BDE-47 (0.2 mg/kg body weight/day) from GD8 to PND21 increased abnormal sperm morphology without affecting testosterone levels (Khalil *et al.*, 2017). However, a study in adult rats associated exposure to 0,27-200 mg/kg body weight/day of pentaBDEs with abnormalities in sperm morphology, as well as a decrease in epididymal and seminal vesicle weights (van der Ven *et al.*, 2008), possibly related to antiandrogenic activity (Brooks, 1979). Evidence of effects of BDE-47 on testosterone levels is not always consistent in epidemiological studies. Studies on men recruited from fertility clinics and the general population showed that the presence of BDE-47 in serum or hair was rather negatively associated with sperm motility, sperm concentration or semen quality and positively associated with abnormal sperm morphology (Abdelouahab *et al.*, 2011; Albert *et al.*, 2018; Mumford *et al.*, 2015). One study found a statistical inverse relationship between PBDE in house dust and free androgen index and LH levels (Meeker *et al.*, 2009b). Overall, more studies on fetal exposure to BDE-47 are needed to understand how the effects of this compound on the male reproductive system could be age-dependent.

Toxicity of the compounds

Effects on the germ cell density and proliferation. Although it did not impair the global testicular organisation, 10^{-5} M of MEHP significantly decreased the germ cell density, unlike the substitutes of both plasticizers and flame-retardants families. Firstly, our data validates our calculation of the cell density. By counting the number of cells per surface of testis cords, we were able to obtain reproductive results in the controls. Secondly, we observed a known effect of MEHP on the germ cell number with a minimum surface of testis cords (minimum of $75,000 \mu\text{m}^2$). Indeed,

this result is in line with other rat fetal testis culture studies where similar MEHP concentrations induced a decrease in germ cell number, potentially by apoptosis (Chauvigne *et al.*, 2009; Li & Kim, 2003). Interestingly, the same effects were observed in cultured mouse and human fetal testes (Lambrot *et al.*, 2009; Lehraiki *et al.*, 2009). In parallel, apoptosis of spermatocytes has been observed in pubertal rats (Murphy *et al.*, 2014; Stermer *et al.*, 2017).

BDE-47 tended to decrease the germ cell density. In the case that the addition of more than four replicates would make this result significant, our data would be consistent with a study in adult rats, which showed that 0.001-1 mg/kg/day of BDE-47 decreased the germ cell number by apoptosis via the upregulation of FAS/FASL, p53 and caspase 3, possibly due to an increased of ROS production in seminiferous tubules (Zhang *et al.*, 2013). These effects were more important after exposure to 3-OH-BDE47, the major oxidative metabolite of BDE-47 (Zhang *et al.*, 2013). As for DiNP, it would therefore be interesting to test the metabolites of BDE-47 with our culture model in further studies.

Effects on the Sertoli cell density and proliferation. Our experiments showed that neither BDE-47 nor any substitute had any affect on Sertoli cell density and proliferation. We observed a significant decrease in Sertoli cell proliferation after treatment with MEHP, confirming what was shown in another rat fetal testis organ culture (Li & Kim, 2003). However, according to our data, this decrease in proliferation did not result in a significant decrease in Sertoli cell density. Visual analysis of apoptosis inside the testis cords showed no difference between the control and the treated testes. Therefore, we cannot at the moment justify the lack of effect of MEHP on the Sertoli cell density by a decrease in apoptosis. Interestingly, in the literature, the decrease in Sertoli cell proliferation is a proposed mechanism explaining the reduction in germ cell number (David, 2006), which is consistent with the decrease in germ cell density that we observed. The decrease of the germ cell number may be attributable to a reduction of testosterone levels, but also to a disturbance of Sertoli cell cytoskeleton by an alteration of gap junctions (David, 2006) and vimentin filaments (Dalgaard *et al.*, 2001) that would result in gonocyte dysgenesis.

Effects on the Leydig cell density, surface and proliferation. Although our results showed a decrease in germ cell density and Sertoli cell proliferation after treatment with MEHP, we could not determine the toxic effect of this compound on the Leydig cells. Indeed, the Leydig cell density and surface could not be determined after this treatment because the intensity of the immunostaining for 3 β -HSD was too weak, suggesting an impact of MEHP on the expression of 3 β -HSD enzyme. This could be in line with the decrease in testosterone secretions that we

observed after treatment with this compound. Indeed, one proposed mechanism explaining the antiandrogenic effects of DEHP and its metabolites is their modulations of the transcription of gene involved in testosterone synthesis. In the literature, the tendency of MEHP to decrease the expression of enzymes involved in steroidogenesis has often been described in *ex vivo* studies (Chauvigne *et al.*, 2011; Lehraiki *et al.*, 2009). Its parent compound DEHP is also known to modulate the transcription of genes involved in cholesterol transport (e.g. STAR), as demonstrated in an *in utero* study in rats (Borch *et al.*, 2006; Hannas *et al.*, 2011), as well as in testosterone biosynthesis (Cyp11a1, HSD3B1), as demonstrated *in vivo* in juvenile rats (Vo *et al.*, 2009). Although the effect of MEHP on the intensity of the immunostaining for 3 β -HSD is of interest, the comparison between its toxic effect on the Leydig cells and those of the substitutes becomes however impossible. One solution to this problem would be to increase the concentration of 3 β -HSD used in immunofluorescence experiments to increase the signal. We could also test other steroidogenic enzymes that are not affected by MEHP.

Consistent with their lack of antiandrogenic effect on cultured rat fetal testes, neither BDE-47 nor the substitutes had any effect on the Leydig cell density and surface. However, except DIDA, they all induced a significant increase in Leydig cell proliferation, suggesting that the cells continue to proliferate instead of differentiating. This increase was not sufficient to have an immediate effect on testosterone secretions or the Leydig cell density. It should be noted that this effect needs to be confirmed with more than three replicates considering the high variabilities of the results and the fact that a very low number of BrDU-positive Leydig cells could be counted. In fact, almost no Leydig cells were proliferating in control (0,41 %) and treatments (\leq 1,93 %), confirming a similar result from an *in vivo* mouse study at an equivalent developmental stage (Miyabayashi *et al.*, 2013).

Parallel with analogs of the substitutes

Unlike DiNP, known to sometimes have similar effects to DEHP but less potent (Boberg *et al.*, 2011; Borch *et al.*, 2004; Furr *et al.*, 2014; Hannas *et al.*, 2011), as previously mentioned, there is no relevant data for most of the tested substitutes regarding their effects on the male reproductive system. A few studies have been conducted on mammals with some of their analogs. For example, di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA, CAS# 103-23-1), an analog of DIDA (ECCC, 2018), has been shown to have no testicular toxicity or antiandrogenic effects on prepubertal and adult rat exposed to a dose of 400 mg/kg body weight/day (Borch *et al.*, 2004). A report by The Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel reviewed data relevant to 28 monoalkylglycol

dialkyl acid esters structurally related to TXIB (Becker, 2017). Based mostly on few reproductive toxicity information available as summaries of regulatory toxicology studies, none of the compound seemed to have any effect on the male reproductive system (Becker, 2017). However, tubular degeneration and spermatid retention were observed in adult rats treated for 28 days with high-dose (3000 mg/kg body weight/day) of tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP, CAS# 78-42-2) (Pelletier *et al.*, 2020), an organophosphate structurally very similar to TBEP. House dust concentrations of triphenyl phosphate (TPP, CAS# 115-86-6), an analog of IPPP, have also been associated with a substantial decline in sperm concentration (-19 %) of 50 men recruited from U.S. infertility clinic (Meeker & Stanley, 2010).

So far, the effects of organophosphates structurally similar to TBEP and IPPP on the male reproductive system appear to be of greater concern than those of analogues of DIDA and TXIB. However, in order to draw a parallel with our results, more studies regarding their effect on the testis after fetal exposure are needed. Of course, there exist countless other analogs of the substitutes tested in our study, clearly demonstrating the need to develop rapid and efficient methods for determining the EDC potential and the toxicity of emerging plasticizers and flame-retardants.

Parallel with the cytotoxicity data on MA-10 Leydig cells and C18-4 germ cells

Overall, only MEHP had an effect on testosterone secretions. This result appears to be inconsistent with the preliminary cytotoxicity data provided by Bernard Robaire laboratory where, for example, BDE-47 and IPPP were more cytotoxic on MA-10 Leydig cells than MEHP (IC₅₀ of 22.4 μM , 7.84 μM and 157.0 μM , respectively). However, in the present study, the compounds were tested with the rat model at the fetal stage, whereas MA-10 cell line represents adult mouse Leydig cell (Ascoli, 1981). Organ culture also preserves the testicular architecture and intercellular communications, unlike cell lines. Apart from the choice of the method, the mere fact of using different species and ages could explain the differences in the results obtained. For example, it has been shown in fetal testis organ culture that the effect of MEHP on testosterone secretions is highly age and species-dependant. Indeed, at doses ranging from 5×10^{-5} M to 2×10^{-4} M, MEHP induced a significant decrease in testosterone secretions if rat testes were collected at 14.5 dpc or 3 days post-partum (dpp), but no effect was observed on testes collected at 13.5 dpc (Li & Kim, 2003). As well, discrepancies between species have been observed as 2×10^{-4} M to 10^{-5} M MEHP can inhibit testosterone secretion in rat while it had pro-androgenic effects on mouse testes collected at 13.5 dpc and 18.5 dpc (Lehraiki *et al.*, 2009) and no effect on human testes obtained

between 7 to 12 weeks of gestation (Lambrot *et al.*, 2009). However, it should be considered that the programmed masculinization window is less characterized in humans. Also, in the study by Lambrot and collaborators (2009), the duration of the cultures was only of 3 days, which does not really reflect a true *in utero* human exposure.

The amount of compound absorbed by the fetal testis could be another factor that could explain the difference between our results and the preliminary cytotoxicity data on testicular cell lines. Radiolabelling assays have shown that only 0.3-0.4 % of 10^{-5} M of ^{14}C -MEHP was detected in cultured fetal rat testes (Chauvigne *et al.*, 2009). The authors concluded that the active concentration of MEHP found in their study was within the order of magnitude of concentrations found in the plasma of pregnant women (680 $\mu\text{g/L}$) or neonate cord blood (520 $\mu\text{g/L}$) (Latini *et al.*, 2003).

In the end, all the experimental approaches mentioned complement each other and must be taken into account to make the most reliable EDC potential assessment of a given chemical.

Conclusion

This is the first study to test DEHP substitutes and members of the flame-retardants family with this organ culture model. Our results show that, at 10^{-5} M, only MEHP induced a decrease of basal and LH-stimulated testosterone secretions of rat fetal testes in culture. MEHP also reduced the germ cell density and Sertoli cell proliferation. Most importantly, using our culture system, none of the substitutes showed any evidence of EDC potential or marked toxicity. However, their safety on the fetal testis needs to be confirmed with additional replicates, especially with regard to the analysis of Leydig cell proliferation. Given the need to develop rapid and sensitive methods that provide insights into the EDC potential of emerging chemicals, this technic is an interesting way to complete *in vitro* studies and indicate whether further toxicological studies are needed. Overall, this study allows for the identification of less toxic alternatives and provides essential information regarding the need for their regulation.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Centre de recherche interdisciplinaire sur le bien-être, la santé, la société et l'environnement (Cinbiose). Sarah Tardif received fellowships from the Réseau Québécois en Reproduction (RQR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Acknowledgments

The authors would like to thank Arlette Rwigemera (Institut national de la recherche scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Canada) for her technical advises and Trang Lu (McGill University, Canada) for sharing stocks of chemicals and her cytotoxicity results on MA-10 and C18-4 cells.

Figures

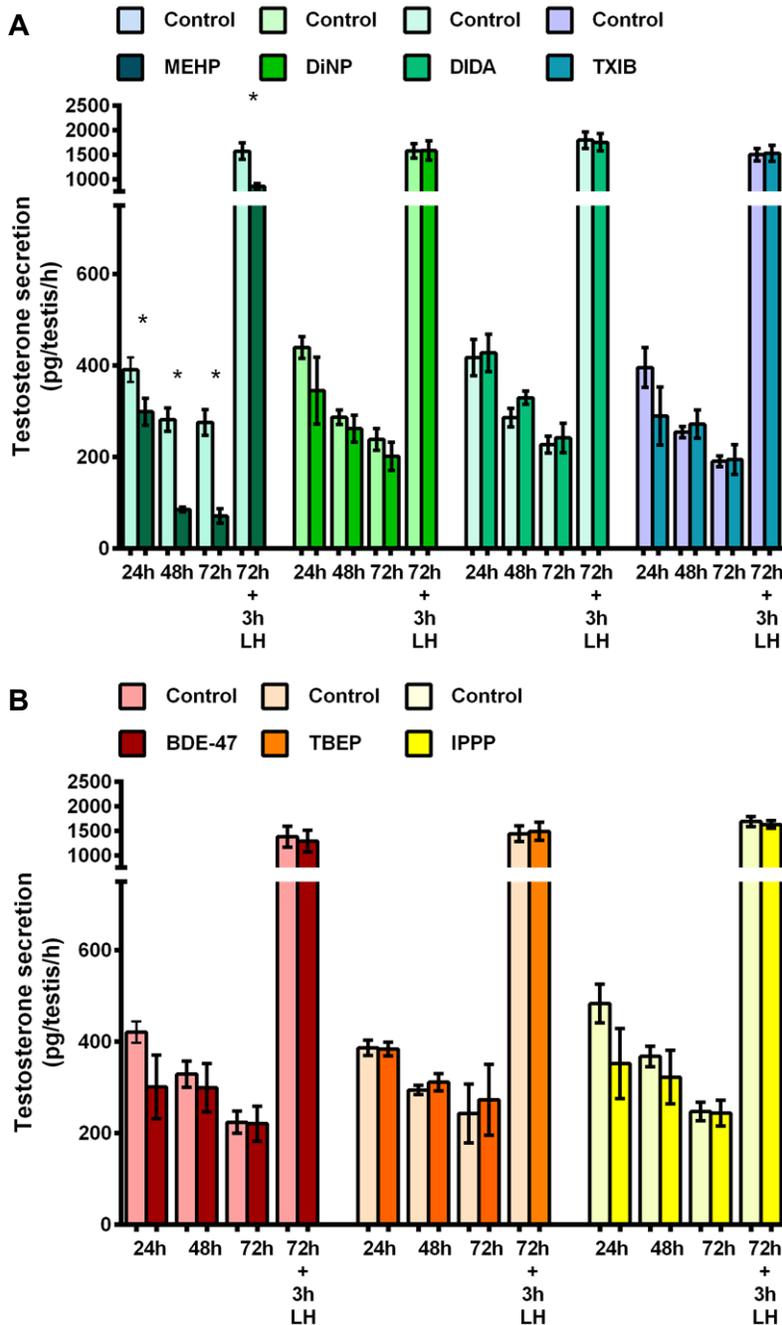


Figure 2.1. Effect of the chemicals on basal and LH-stimulated testosterone secretion from 15.5 days old rat fetal testes cultured for 3 days. One testis from each fetus was cultured in control medium and the other in medium containing (A) 10^{-5} M of 4 plasticizers (MEHP, DiNP, DIDA, TXIB) or (B) 10^{-5} M of 3 flame retardants (BDE-47, TBEP, IPPP). Media were changed every 24h and supplemented with 100 ng/mL of oLH from 72h to 75h. Testosterone was measured by ELISA. Values are expressed in pg/testis/h and are mean \pm SEM of at least 5 biological replicates from different litters. * $P < 0.05$ in the Wilcoxon matched-pairs signed rank test with the corresponding control value.

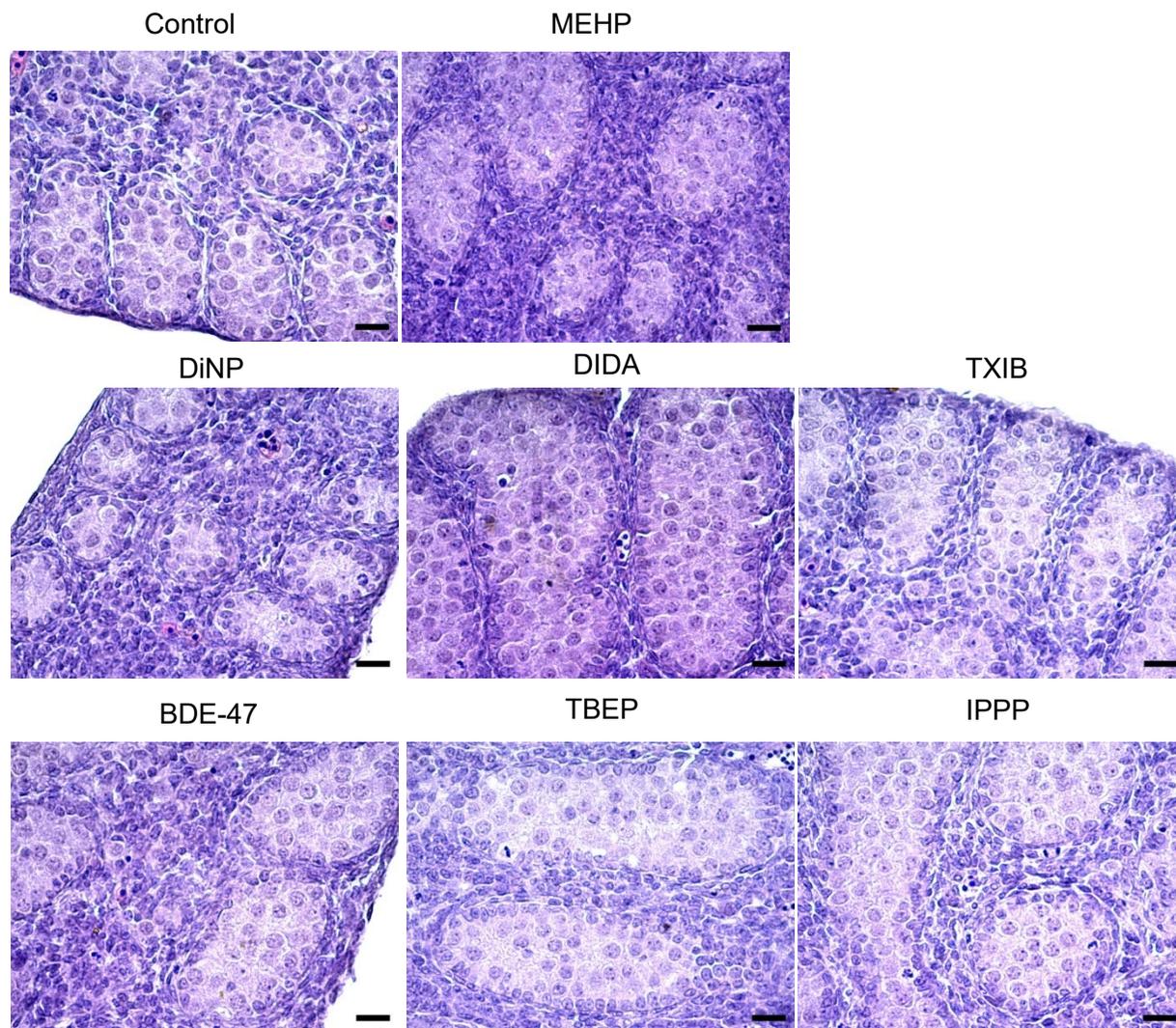


Figure 2.2. Effect of the chemicals on the global testicular organisation of 15.5 days old rat fetal testes cultured for 3 days. One testis from each fetus was cultured in control medium and the other in medium containing 10^{-5} M of 4 plasticizers (MEHP, DiNP, DIDA, TXIB) or 10^{-5} M of 3 flame retardants (BDE-47, TBEP, IPPP). Cross sections of the testes were stained with eosin and hematoxylin. Pictures shown are representative of at least 3 biological replicates from different litters. Scale bar represents 10 μ m.

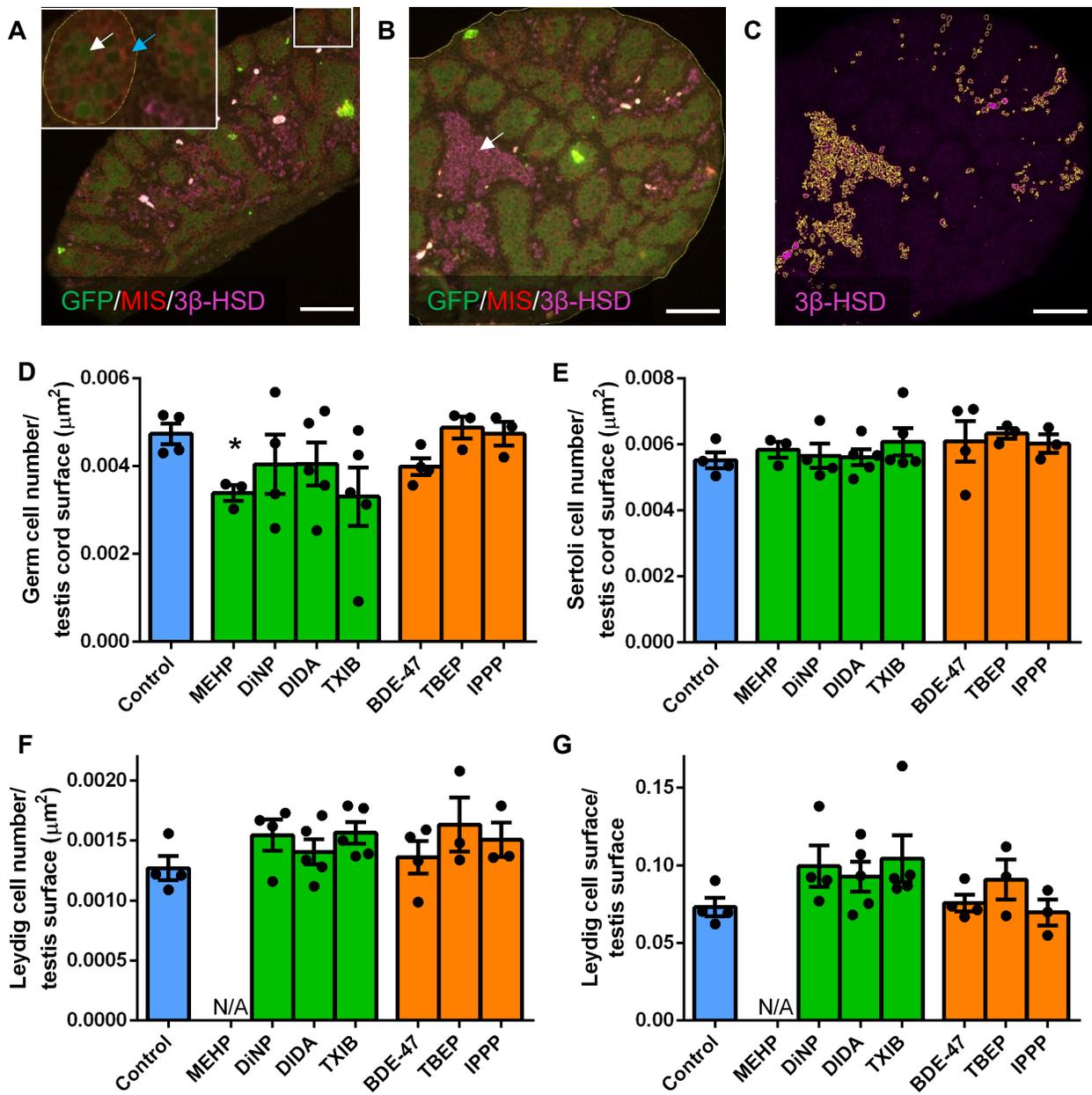


Figure 2.3. Effect of the chemicals on the density and surface of the main testicular cell types. Rat fetal testes of 15.5 days old were cultured for 3 days and exposed to 10^{-5} M of 4 plasticizers (MEHP, DiNP, DIDA, TXIB) or 10^{-5} M of 3 flame retardants (BDE-47, TBEP, IPPP). A triple staining for GFP (green: marker of germ cells), MIS (red: marker of Sertoli cells) and 3β -HSD (purple: marker of Leydig cells) was performed on cross sections. (A) Germ cells (white arrow) and Sertoli cells (blue arrow) inside the testis cords (indicated by the boundary). (B) Leydig cells (white arrow) in a testis section (indicated by the boundary). (C) Selected surface of the Leydig cells. Scale bar represents 100 μm . (D) Germ cell density. (E) Sertoli cell density. (F) Leydig cell density. (G) Leydig cell surface per testis surface. Results are expressed as the mean \pm SEM of at least 3 biological replicates from different litters. N/A = not applicable. * $P \leq 0.05$ in the unpaired two-tailed Mann-Whitney test with control values.

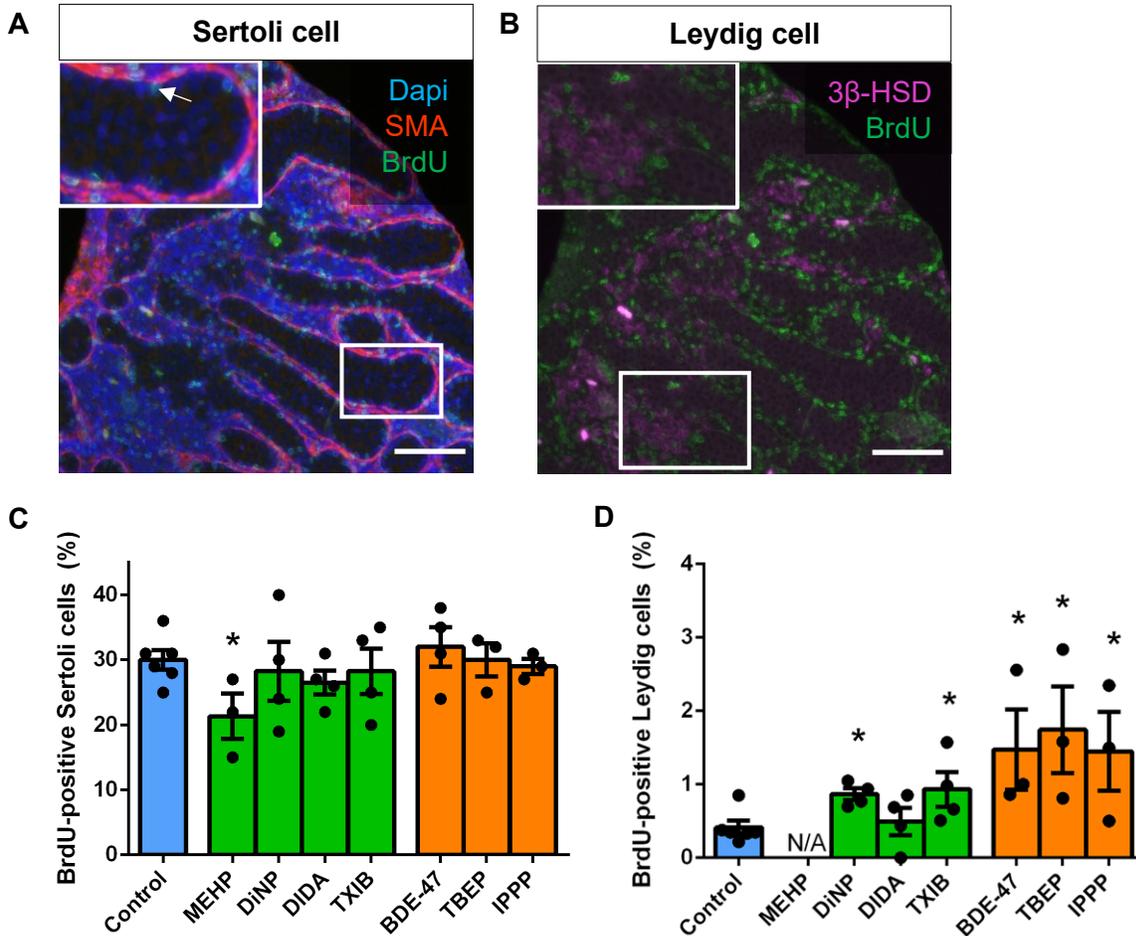


Figure 2.4. Effect of the chemicals on the proliferation of Sertoli and Leydig cells of 15.5 days old rat fetal testes cultured for 3 days. Proliferating cells were identified using a counterstaining for Dapi (blue: marker of nucleus) and a triple staining for BrdU (green: marker of proliferating cells), SMA (red: marker of smooth muscle actin) and 3β-HSD (purple: marker of Leydig cells). Testes were exposed to 10^{-5} M of 4 plasticizers (MEHP, DiNP, DIDA, TXIB) or 10^{-5} M of 3 flame retardants (BDE-47, TBEP, IPPP). (A) BrdU-positive Sertoli cell (white arrow). (B) BrdU-negative Leydig cells. Scale bar represents 100 μm. (C) Percentage of BrdU-positive Sertoli cells. (D) Percentage of Leydig cells double-stained with 3β-HSD and BrdU. Results are presented as the mean ± SEM of at least 3 biological replicates from different litters. N/A = not applicable. * $P \leq 0.05$ in the unpaired two-tailed Mann-Whitney test with control values.

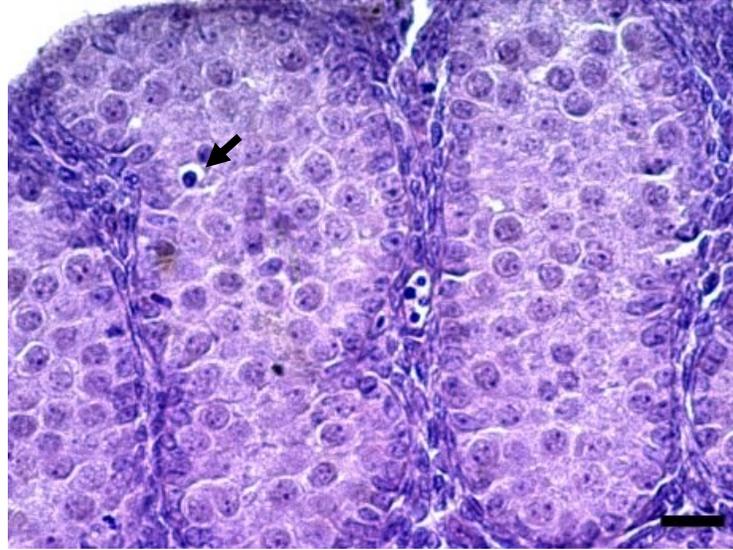


Figure 2.5. Apoptotic body in a 15.5 days old rat fetal testis cultured for 3 days. Cross sections of the testes were stained with eosin and hematoxylin. Apoptotic cells were identified by their condensed nucleus and the white halo around them (arrow). Scale bar represents 10 μm .

Supplementals

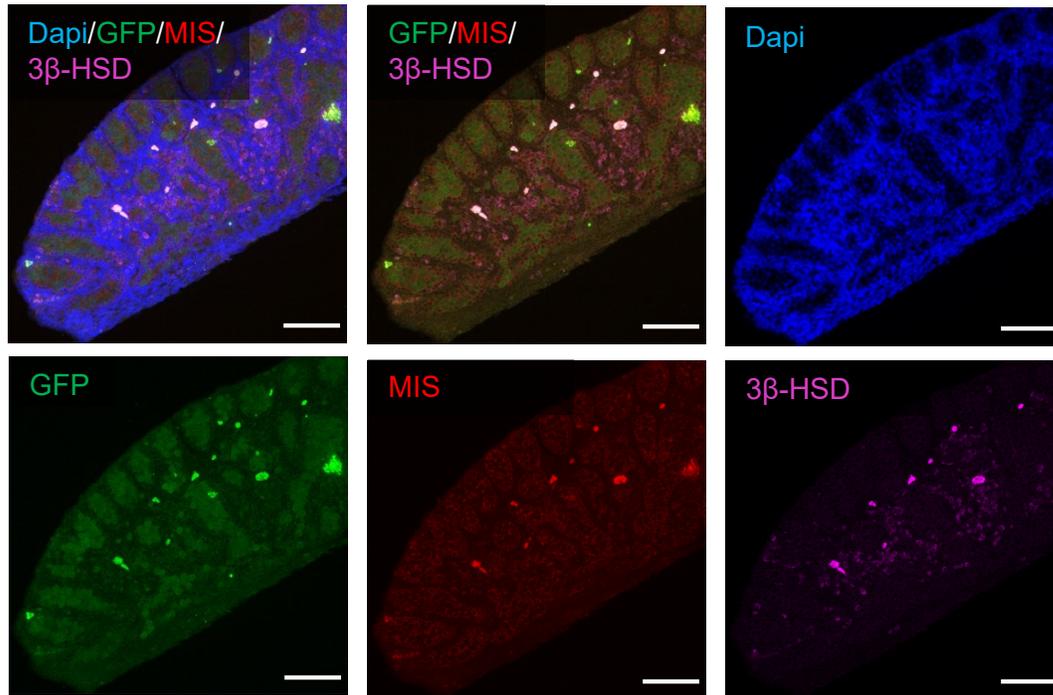


Figure S1. GFP/MIS/3 β -HSD triple staining. Counterstaining for Dapi (blue: marker of nucleus) and triple staining for GFP (green: marker of germ cells), MIS (red: marker of Sertoli cells) and 3 β -HSD (purple: marker of Leydig cells) of one representative cross section of a 15.5 days old rat fetal testis is shown. Scale bar represents 100 μ m.

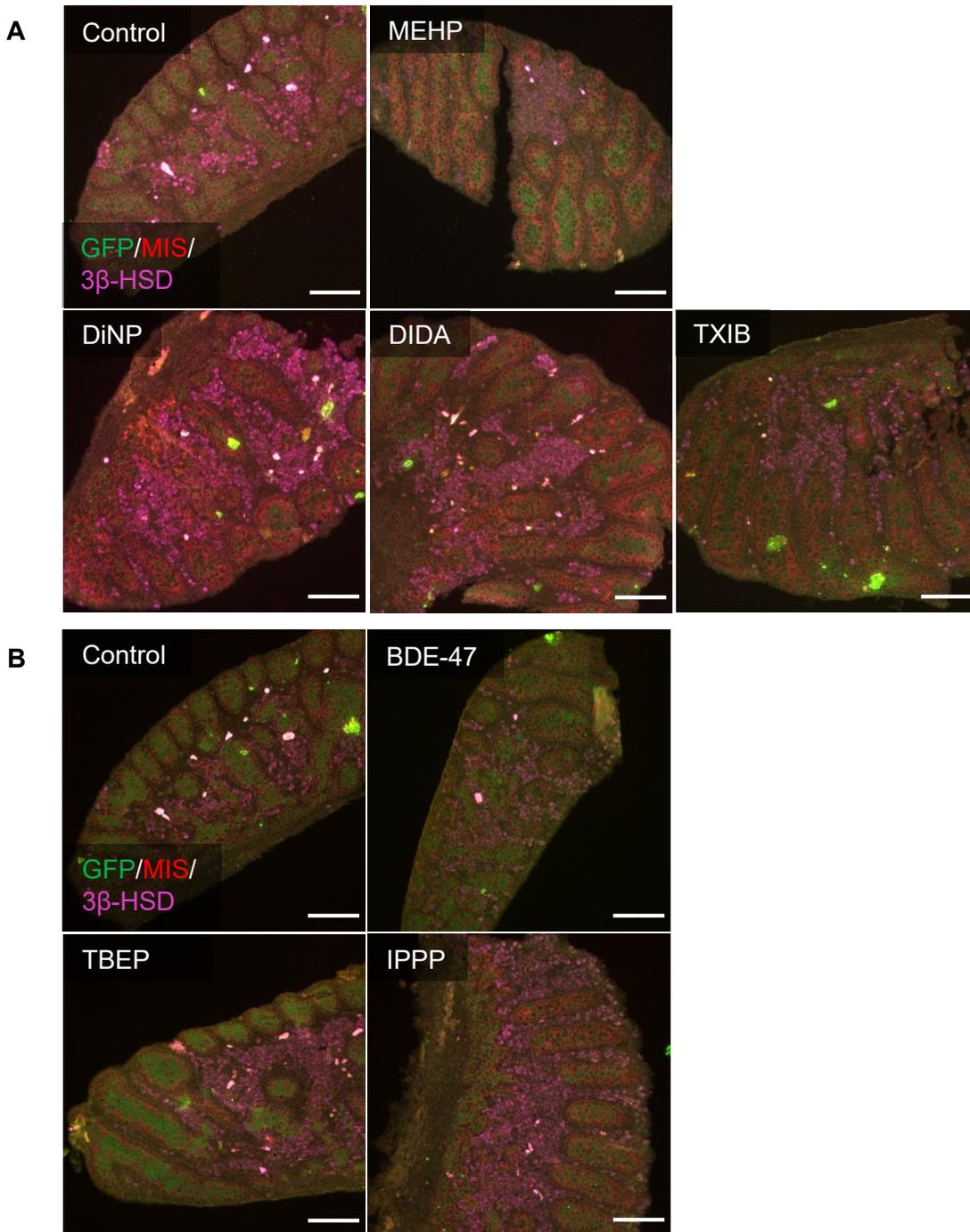


Figure S2. GFP/MIS/3β-HSD triple staining shown for each treatment. Cross sections of 15.5 days old rat fetal testes cultured for 3 days and exposed to 10^{-5} M of 4 plasticizers (MEHP, DiNP, DIDA, TXIB) or 10^{-5} M of 3 flame retardants (BDE-47, TBEP, IPPP) were triple stained for GFP (green: marker of germ cells), MIS (red: marker of Sertoli cells) and 3β-HSD (purple: marker of Leydig cells). Results in A and B were obtained from 2 different immunofluorescence stainings. Scale bar represents 100 μm.

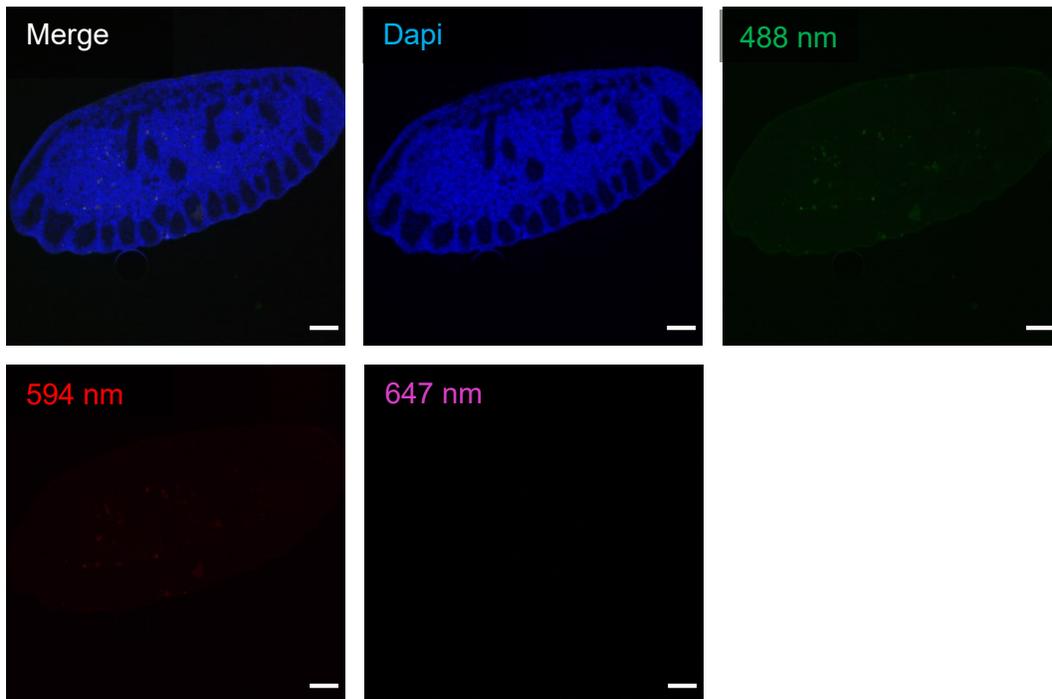


Figure S3. Negative control of the GFP/MIS/3 β -HSD triple staining. Negative control was done by omitting primary antibodies. One representative cross section of a 15.5 days old rat fetal testis cultured for 3 days is shown. Exposition times for each wavelength were greater than those used for the GFP/MIS/3 β -HSD triple stainings. Dapi (in blue) is a marker of nucleus. Scale bar = 100 μ m.

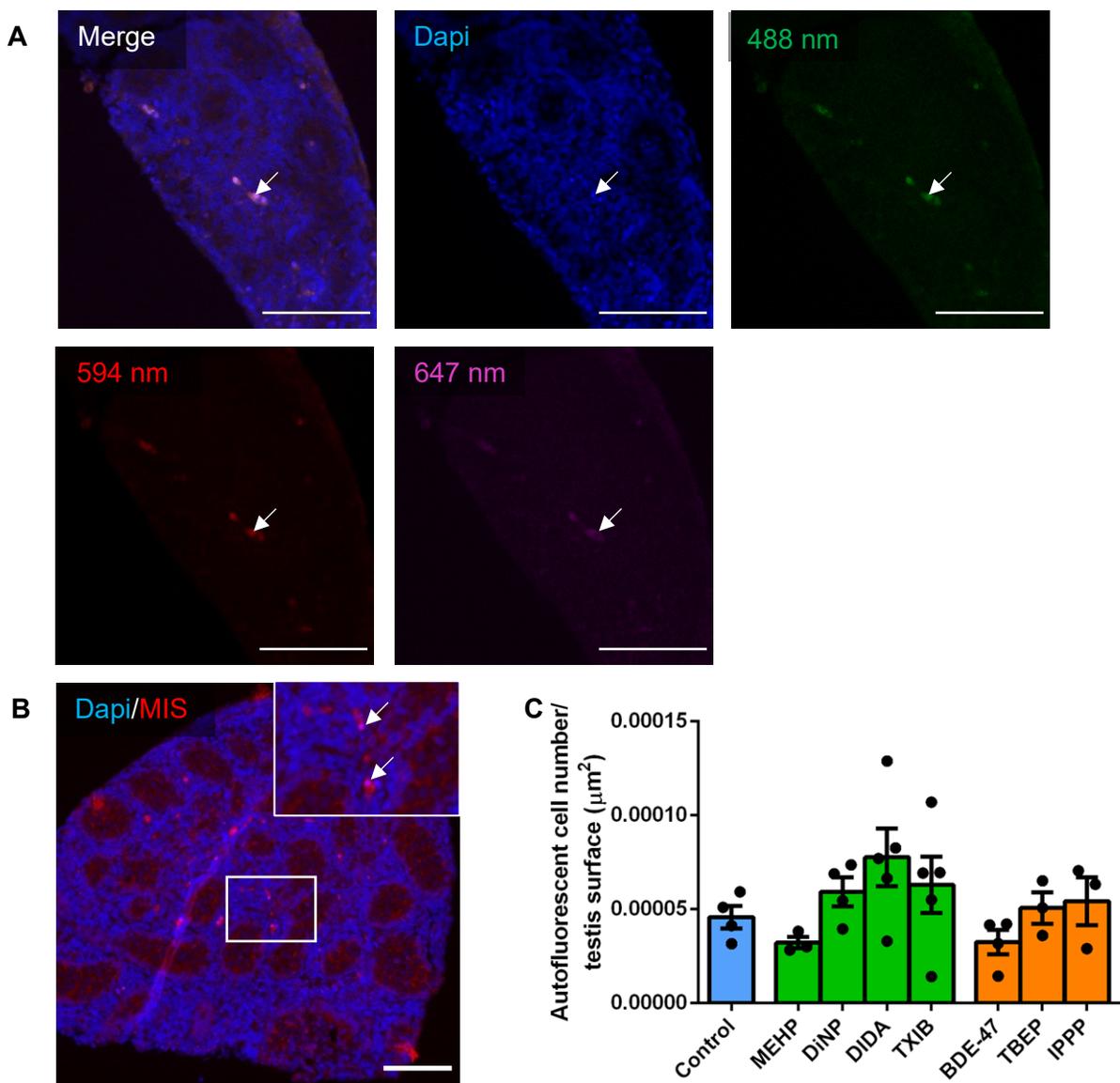


Figure S4. Presence of autofluorescent cells. (A) Representative cross section of a 15.5 days old rat fetal testis counterstained with Dapi (blue: marker of the nucleus). Autofluorescent cells (white arrows) were observed for each wavelength. Scale bars = 100 μm . (B) Autofluorescent cells (white arrow) were counted in 15.5 days old rat fetal testes exposed to exposed to 10^{-5} M of 4 plasticizers (MEHP, DiNP, DIDA, TXIB) or 10^{-5} M of 3 flame retardants (BDE-47, TBEP, IPPP), counterstained for Dapi and stained for MIS (red: marker of Sertoli cells). Scale bar represents 100 μm . (C) Density of autofluorescent cells. Results are presented as the mean \pm SEM of at least 3 biological replicates from different litters. Treated and control testes were compared by an unpaired two-tailed Mann-Whitney test.

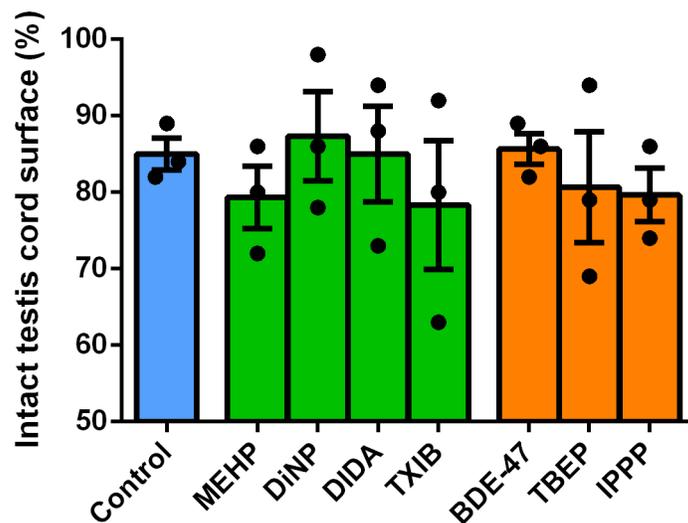


Figure S5. Percentage of intact testis cords. Cross sections of 15.5 days old rat fetal testes cultured for 3 days and exposed to 10^{-5} M of 4 plasticizers (MEHP, DiNP, DIDA, TXIB) or 10^{-5} M of 3 flame retardants (BDE-47, TBEP, IPPP) were stained for MIS (Marker of Sertoli cells). Intact testis cords = complete, organized and artefacts-free testis cords. Values are expressed in percentage of MIS-positive intact testis cords per MIS-positive total testis cords. Results are presented as the mean \pm SEM of 3 biological replicates from different litters. Treated and control testes were compared by an unpaired two-tailed Mann-Whitney test.

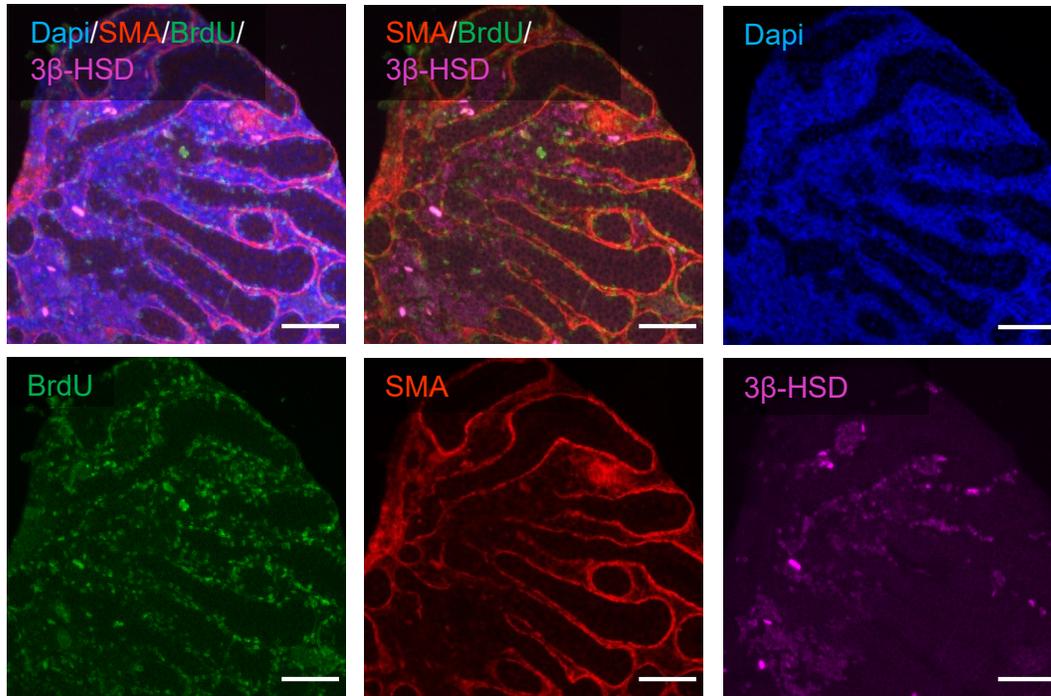


Figure S6. BrdU/SMA/3β-HSD triple staining. Counterstaining for Dapi (blue: marker of nucleus) and triple staining for BrdU (green: marker of proliferating cells), SMA (red: marker of smooth muscle actin) and 3β-HSD (purple: marker of Leydig cells) of one representative cross section of a 15.5 days old fetal rat testes cultured for 3 days is shown. Scale bar represents 100 μm.

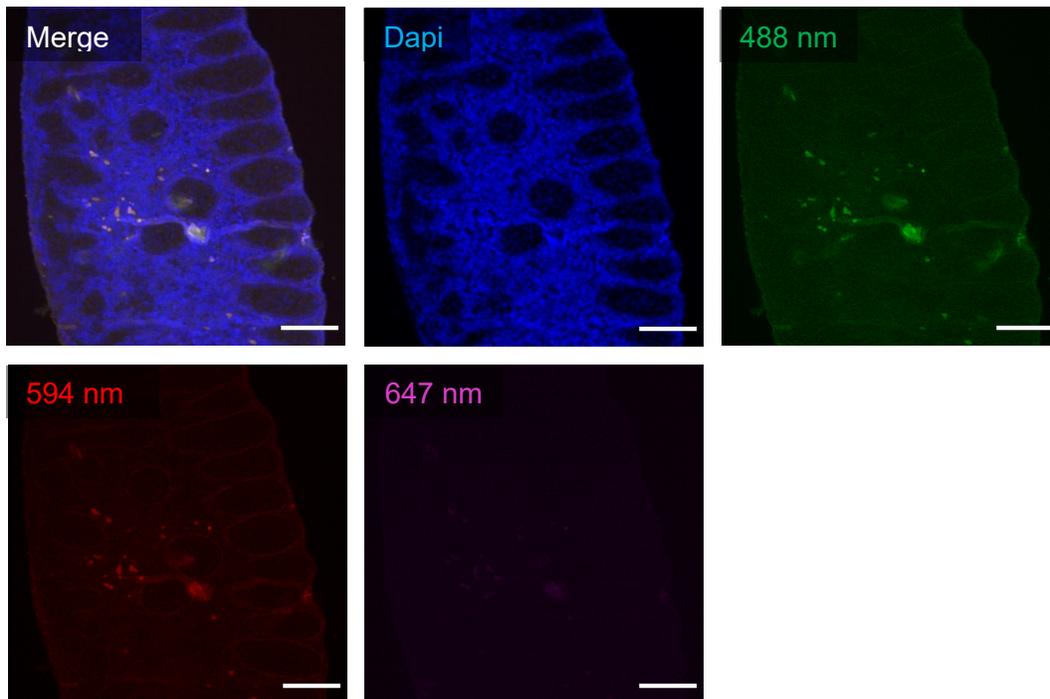


Figure S7. Negative control of the BrdU/SMA/3 β -HSD triple staining. Negative control was done by omitting primary antibodies. One representative section of a 15.5 days old rat fetal testes cultured for 3 days is shown. Exposition times for each wavelength were greater than those used for the triple stainings. Dapi (in blue) is a marker of nucleus. Scale bar = 100 μ m.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les résultats et les avancées des connaissances

L'objectif global de ce travail était de déterminer si des substituts du DEHP et du BDE-47 déjà présents dans l'environnement sont plus sécuritaires que les composés qu'ils remplacent. Pour ce faire, nous avons utilisé un système de culture organotypique de testicules fœtaux de rats, un organe très sensible aux variations des niveaux d'androgènes, particulièrement au cours de la fenêtre de masculinisation programmée qui a lieu chez le rat entre 14,5 jpc et 18,5 jpc (Welsh *et al.*, 2008). Ce modèle a préalablement été validé par d'autres études qui ont évalué l'impact du MEHP, du BPA et d'autres xénoestrogènes (Chauvigne *et al.*, 2009; Delbes *et al.*, 2007; Eladak *et al.*, 2015; Lassonde *et al.*, 2015; Lassarguere *et al.*, 2003). Basé sur la gamme de cytotoxicité détectée sur deux lignées cellulaires du testicule, la MA-10 et la C18-4 (laboratoire Bernard Robaire, Université McGill, données non publiées), nous avons décidé de tester les substituts qui semblent être les moins cytotoxiques (DIDA, DiNP, TBEP) et les substituts qui semblent être les plus cytotoxiques (TXIB et IPPP), que nous avons comparés au MEHP et au BDE-47. Leur potentiel PE a été déterminé par des mesures quotidiennes des sécrétions de testostérone basales et stimulées par la LH de testicules fœtaux de rat en culture. Leur toxicité a été évaluée en testant leur effet sur la structure globale des testicules, ainsi que sur la densité et la prolifération des principaux types de cellules du testicule fœtal : les cellules germinales, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig.

Les effets des composés sur les sécrétions de testostérone

Nos résultats ont démontré qu'à 10^{-5} M, le MEHP a induit une diminution significative des sécrétions de testostérone basales et stimulées par la LH de testicules fœtaux de rat de 15,5 jpc cultivés jusqu'au 18,5e jour post-partum. La plus grande diminution des sécrétions de testostérone (environ -75 %) a été observée après 72h de culture. Le traitement au MEHP a pu agir en tant que contrôle positif pour la diminution des sécrétions de testostérone, puisqu'avec ce même modèle de culture et la même dose MEHP, une étude précédente a obtenu des résultats similaires avec des testicules fœtaux de rat prélevés à 14,5 jpc (Chauvigne *et al.*, 2009).

En parallèle, nous n'avons pas observé d'impact du BDE-47 sur les sécrétions de testostérone basales et stimulées par la LH. De façon similaire, dans la seule étude *in utero* pertinente que nous avons trouvée, l'exposition maternelle à de faibles doses de BDE-47 (0,2

mg/kg de poids corporel/jour) n'a pas affecté les niveaux de testostérone (Khalil *et al.*, 2017). Considérant que certaines études épidémiologiques et *in vivo* suggèrent parfois un effet anti-androgénique des pentaBDE chez l'adulte (diminutions du poids de l'épididyme et des vésicules séminales, ainsi que des niveaux d'androgènes libre et de la LH) (Meeker *et al.*, 2009b; van der Ven *et al.*, 2008), davantage d'études sur l'exposition fœtale au BDE-47 sont nécessaires pour comprendre comment les effets de ce composé sur le système reproducteur masculin pourraient dépendre de l'âge.

Les substituts n'ont pas davantage eu d'effet sur les sécrétions de testostérone basales et stimulées par la LH. Pourtant, des études *in utero* chez le rat à des doses généralement supérieures à 250 mg/kg de pc/j ont démontré que le DiNP peut diminuer la production de la testostérone et l'expression de STAR et de CYP11a (Boberg *et al.*, 2011; Borch *et al.*, 2004; Furr *et al.*, 2014; Hannas *et al.*, 2011). Cependant, même à des doses élevées de DiNP, ces effets ne sont pas systématiquement observés d'une étude à l'autre.

Les effets toxiques des composés

Effets sur les cellules germinales. Pour tous les traitements, l'immunocoloration au BrDU a confirmé qu'aucun gonocyte ne proliférait à 18,5 jpc car à ce stade, ils sont quiescents (Culty, 2009).

Bien qu'elle n'ait pas altéré l'organisation globale des testicules, une concentration de 10^{-5} M de MEHP a diminué significativement la densité des cellules germinales, conformément à d'autres études de cultures organotypiques de testicules fœtaux où des concentrations similaires de MEHP ont induit une diminution du nombre de cellules germinales, potentiellement par apoptose (Chauvigne *et al.*, 2009; Li & Kim, 2003). Les mêmes effets ont été observés dans des cultures de testicules fœtaux de souris et d'humains (Lambrot *et al.*, 2009; Lehraiki *et al.*, 2009).

Après traitement au BDE-47, une tendance à diminuer la densité des cellules germinales a été observée. Dans le cas où cette tendance deviendrait significative par l'ajout de réplicats, cet effet serait corroboré par une étude *in vivo* chez le rat adulte, où une diminution du nombre de cellules germinales possiblement attribuable à une augmentation de l'apoptose a été observée (Zhang *et al.*, 2013).

Comparativement aux composés qu'ils remplacent, aucun substitut n'a démontré d'effet sur la densité des cellules germinales.

Effets sur les cellules de Sertoli. Nous avons observé une diminution significative de la prolifération des cellules de Sertoli sans effet sur la densité après traitement au MEHP. L'analyse visuelle de l'apoptose à l'intérieur des cordons testiculaires n'a démontré aucune différence entre les testicules témoins et les testicules traités. Par conséquent, nous ne pouvons pour l'instant justifier l'absence d'effet du MEHP sur la densité des cellules de Sertoli par une diminution de l'apoptose. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Li et ses collaborateurs (2003) qui, avec un modèle de culture similaire, ont aussi constaté une diminution de la prolifération des cellules de Sertoli chez des testicules fœtaux de rats prélevés à 18,5 jpc et 3 jpp (Li & Kim, 2003). Le BDE-47 et les substituts n'ont pas affecté l'organisation globale des testicules ni la densité et la prolifération des cellules de Sertoli.

Effets sur les cellules de Leydig. Après traitement avec le MEHP, l'immunomarquage de la 3 β -HSD était si faible qu'il nous a été impossible déterminer la densité et la surface des cellules de Leydig. La tendance du MEHP à diminuer l'expression d'enzymes de la stéroïdogénèse a d'ailleurs été rapportée dans d'autres études de cultures organotypiques de testicules fœtaux de rat et de souris (Chauvigne *et al.*, 2011; Lehraiki *et al.*, 2009).

D'après nos résultats, le BDE-47 et les substituts n'ont pas davantage affecté la densité et la surface des cellules de Leydig. Cependant, à l'exception de DIDA, une augmentation significative de la prolifération des cellules de Leydig a été observée, bien qu'elle ne soit pas suffisante pour avoir un effet immédiat sur la testostérone. La fonctionnalité de ce test doit être déterminée compte tenu des fortes variabilités entre les différents réplicats et du fait qu'un très faible nombre de cellules de Leydig positives au BrDU a pu être compté. En fait, presque aucune cellule de Leydig ne proliférait, ce qui confirme un résultat similaire obtenu lors d'une étude *in vivo* sur des souris à un stade de développement équivalent (Miyabayashi *et al.*, 2013).

Le modèle d'étude

Le choix de l'âge et de l'espèce pour évaluer le potentiel PE

Dans l'ensemble, seul le MEHP a eu un effet sur les sécrétions de testostérone. Ce résultat semble contredire les données préliminaires de cytotoxicité obtenues du laboratoire de Bernard Robaire où, par exemple, le BDE-47 et l'IPPP étaient plus cytotoxiques sur les cellules de Leydig MA-10 que le MEHP (IC50 de 22,4 μ M, 7,84 μ M et 157,0 μ M, respectivement). Nos données ne concordent par davantage avec les résultats préliminaires de cytotoxicité obtenus

sur les lignées de cellules germinales C18-4, où l'IPPP (IC50 : 18,1 μM) était plus cytotoxique que le MEHP (IC50 : 75,6 μM) et le BDE-47 (36,2 μM), alors que le MEHP a pourtant été le seul à diminuer significativement la densité des cellules germinales du testicule fœtal dans notre étude. À noter cependant que nous avons testé les composés avec le modèle du rat au stade fœtal, alors que les cellules MA-10 constituent une lignée cellulaire de cellules de Leydig tumorales isolée d'une souris adulte (Ascoli, 1981). Quant à la lignée de cellules germinales C18-4, il s'agit d'une lignée de spermatogonies de type A de souris (Hofmann *et al.*, 2005). À prendre en compte également, la culture organotypique préserve l'architecture testiculaire et les communications intercellulaires, contrairement aux lignées cellulaires. La différence entre nos résultats issus de cultures organotypiques de testicules fœtaux de rat et ceux issus de cultures de lignées cellulaires souligne donc non seulement l'impact du choix du modèle, mais également de l'espèce et de l'âge sur les effets donnés d'un composé.

Le choix de l'âge. En culture organotypique, un résultat peut différer singulièrement d'un autre si les testicules fœtaux sont prélevés 24h plus tôt ou plus tard. En effet, chez le testicule fœtal des rongeurs, une perturbation hormonale ou de l'expression de certains gènes de quelques heures peut avoir des répercussions majeures sur le développement des différents types cellulaires. L'étude de Li et ses collaborateurs (2003) illustre bien cet aspect. À des doses allant de 5×10^{-5} M à 2×10^{-4} M, le MEHP n'a pas affecté les niveaux d'androgènes chez des testicules fœtaux de rats prélevés à 13,5 jpc, mais a induit une diminution des sécrétions de testostérone si les organes étaient prélevés un jour plus tard, à 14,5 jpc (Li & Kim, 2003). Chez la souris *in vivo*, les niveaux d'expression spatiotemporels du gène *Sry*, nécessaires à la différenciation des cellules de Sertoli, doivent atteindre un seuil déterminé au cours d'une période très restreinte (entre ~11,5-11,75 jpc) (Bullejos & Koopman, 2005). De plus, entre les stades fœtal et adulte, les fonctions d'une population d'un type cellulaire sont parfois régulées de façons très différentes. Au stade fœtal chez les rongeurs, par exemple, la régulation des sécrétions de testostérone par les cellules de Leydig fœtales est indépendante de la LH (O'Shaughnessy *et al.*, 1998; Pointis & Mahoudeau, 1977), alors que chez les populations de cellules de Leydig adultes, les sécrétions de testostérone sont dépendantes de la LH (Lei *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2001). Tout comme la régulation de leurs fonctions, leur réponse à un composé donné peut varier. *In vivo*, une exposition *in utero* au DEHP entraîne en général une diminution des sécrétions de testostérone (Parks *et al.*, 2000), tandis qu'une exposition chez l'adulte n'affecte pas nécessairement les niveaux d'androgènes (Agarwal *et al.*, 1986).

À l'égard de l'âge du modèle choisi, il convient donc de faire particulièrement attention avant d'extrapoler au stade fœtal des données obtenues chez l'adulte. Ceci met en valeur l'importance d'intégrer des modèles *in vitro* représentatifs du stade fœtal aux techniques actuelles utilisées pour détecter un PE afin d'orienter de façon plus appropriée les études *in vivo* subséquentes.

Le choix de l'espèce. Pour un même modèle expérimental (i.e. culture organotypique), le choix de l'espèce peut tout autant faire varier les effets d'un composé (Habert *et al.*, 2014). Par exemple, contrairement au modèle du rat, une concentration de 2×10^{-4} M de MEHP a eu des effets pro-androgéniques sur des testicules de souris collectés à 13,5 jpc et 18,5 jpc (Lehraiki *et al.*, 2009). De façon surprenante, les sécrétions de testostérone de testicules humains âgés entre 7 et 12 semaines provenant de cliniques d'avortement n'ont pas été affectées par 10^{-5} M de MEHP (Lambrot *et al.*, 2009). Finalement, la culture organotypique illustre bien à quel point le choix de l'espèce peut avoir un impact important sur les données obtenues.

La culture organotypique : une étude à court-terme

En plus de limiter la durée des expérimentations, le coût et l'utilisation d'animaux de laboratoire, la culture organotypique peut se révéler particulièrement utile pour détecter les effets précoces d'un composé qui pourraient entraîner des effets à long terme sur la fertilité masculine, tels que les symptômes compris dans le syndrome de dysgénésie testiculaire (cryptorchidie, hypospadias, cancer des testicules, réduction de la fertilité) (Skakkebaek *et al.*, 2001). Par exemple, avec notre modèle, une diminution des sécrétions de testostérone nous permettrait d'anticiper à l'âge adulte des problèmes au niveau du développement du tractus génital masculin, ou encore une diminution de la spermatogenèse (Griswold & Behringer, 2009; Holdcraft & Braun, 2004; Klönisch *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2009). De même, une réduction de la population et de la prolifération des cellules de Sertoli pendant le développement pourrait indiquer une diminution à l'âge adulte du nombre de cellules de Leydig et de cellules germinales (Rebourcet *et al.*, 2017), ce qui aurait potentiellement pour conséquence de réduire la quantité de spermatozoïdes produite par les testicules. Ou encore, la réduction du nombre de cellules de Leydig fœtales et de leur production d'androgènes nous permettrait d'anticiper une perturbation subséquente du développement et des fonctions des cellules de Leydig adultes (Su *et al.*, 2018; van den Driesche *et al.*, 2017).

Cependant, notre modèle de culture nous permet uniquement de tester les effets d'un composé sur une très courte durée, car il maintient le développement et l'architecture testiculaire pour une période limitée. Après 3 à 4 jours de culture, on observe déjà une désorganisation tissulaire. Par contre, notre modèle a pour avantage de tester des composés au cours de la fenêtre de masculinisation programmée (entre 14,5 jpc et 18,5 jpc) où le testicule fœtal est le plus sensible aux perturbations des niveaux d'androgènes (Welsh *et al.*, 2009). En outre, si la présence d'effets sur le testicule fœtal permet de prédire certaines répercussions possibles à l'âge adulte, l'absence d'effet ne signifie toutefois pas nécessairement une absence d'effet subséquent. De plus, il est possible que les effets observés d'un composé sur le testicule fœtal disparaissent après la cessation du traitement, comme c'est parfois le cas dans des études *in vivo* (Agarwal *et al.*, 1986). Dans cet optique, la mise au point d'une méthode de culture organotypique à long terme qui permettrait d'étudier *in vitro* les effets d'une exposition chronique serait très pertinente.

Les études *ex vivo* classiques sur lesquelles s'inspire notre système utilisent la méthode dite d'interphase dans laquelle les échantillons sont placés à l'interphase entre le milieu de culture et une couche de gaz (Trowell, 1959). Cependant, cette méthode ne dispose pas d'un système circulatoire comparable aux modèles *in vivo*, où les capillaires sanguins entourant le tissu fournissent des nutriments et de l'oxygène et éliminent les déchets de manière efficace et continue. En 2016 et 2017, Komeya et ses collaborateurs ont conçu des dispositifs microfluidiques avec et sans pompe dans lesquels une membrane poreuse sépare un tissu d'un milieu de culture en circulation, imitant la relation *in vivo* entre le flux microvasculaire et les tissus environnants (Komeya *et al.*, 2017; Komeya *et al.*, 2016). Des tissus de testicules de souris de 4,5 jpp en culture dans ces dispositifs ont maintenu avec succès la spermatogenèse pendant 6 mois. Les spermatozoïdes produits étaient suffisamment fonctionnels pour générer une progéniture saine par micro-insémination. De plus, les tissus continuaient à produire de la testostérone et répondaient à la stimulation par la LH. L'intégration de tels dispositifs en culture organotypique permettraient de tester la toxicité d'un composé donné sur le testicule pendant plusieurs mois *in vitro* et même potentiellement d'étudier ses effets sur la spermatogenèse et la progéniture. Toutefois, il faudrait tout d'abord vérifier si ce système fonctionnerait avec des tissus de testicules fœtaux. De plus, la production d'un appareil microfluidique demeure pour le moment peu accessible puisqu'elle nécessite de l'expertise, du temps, de la main-d'œuvre et peut être coûteuse. Dans le cas d'un appareil muni d'une pompe, le nombre d'échantillons est également limité, non pas par le nombre d'appareils, mais par le nombre de pompes ou des seringues adaptées à la pompe (Komeya *et al.*, 2017).

La fragilité des testicules fœtaux après culture

Dans notre modèle de culture, les testicules ont tendance à s'aplatir sur la surface du filtre, possiblement afin de maximiser l'apport en oxygène fourni au-dessus du tissu et l'apport en nutriments fourni en dessous par la membrane poreuse via le milieu de culture. Cette hypothèse est appuyée par une étude en 2018 où, dans un modèle de culture sur agarose, le fait d'étaler les tissus dans un moule en deux dimensions de manière à ce qu'ils se développent en forme de disque avait pour avantage d'éviter une dégénérescence ou une nécrose des tissus centraux due à une perméation insuffisante de l'oxygène et des nutriments (Kojima *et al.*, 2018). En soi, l'aplatissement des testicules fœtaux sur leurs membranes est donc une bonne chose. Cette tendance devient problématique techniquement après culture, quand vient le temps de manipuler les tissus lors de la préparation manuelle pour l'histologie (au moment de les déshydrater, de les incorporer dans la paraffine et de les sectionner au microtome). En effet, les testicules après culture, d'une épaisseur approximative de 250 μm d'après le nombre moyen de sections de 5 μm que nous obtenions par tissu, sont trop fins et trop fragiles par rapport au nombre de traitements qu'ils subissent entre la fin des cultures et les expériences d'histologie et d'immunofluorescence. Ainsi, il était techniquement très difficile d'obtenir 100 % des coupes d'un tissu. Or, pour effectuer un compte absolu du nombre de cellules par testicule, il est nécessaire de faire un montage avec les sections représentatives du tissu en entier et donc d'analyser, par exemple, une coupe sur cinq (Lassonde *et al.*, 2015).

Puisque nous avons rarement pu obtenir des tissus entiers, nous avons développé une technique alternative où nous avons plutôt analysé la densité des cellules au lieu du compte absolu. En comptant le nombre de cellules par surface de tissu ou de cordons testiculaires, nous avons pu obtenir des résultats reproductifs dans les témoins. Avec une surface minimale de cordons testiculaires (minimum de 75 000 μm^2), nous avons également pu observer des effets connus du MEHP sur le nombre de cellules germinales et la prolifération des cellules de Sertoli (Chauvigne *et al.*, 2009). Par contre, il sera nécessaire de valider l'absence d'effet des traitements et la variabilité de certains résultats en augmentant la surface de tissu analysé, par exemple en testant au minimum quatre coupes au lieu de deux.

Une alternative intéressante qui permettrait de limiter le nombre de manipulations après culture serait d'effectuer les expériences d'immunofluorescence avec l'organe entier (technique du « *whole mount* »). Tel que décrit dans Jamadagni et ses collaborateurs (2019), au lieu d'incorporer les tissus en paraffine et de les sectionner, ceux-ci seraient plutôt directement perméabilisés après la fixation, par exemple avec de la collagénase et du Triton-X, puis

immunomarqués avec les anticorps appropriés (Jamadagni & Patten, 2019). Les tissus seraient ensuite visualisés par immunofluorescence par microscopie confocale multiphoton, qui permet d'imager un échantillon à de très faibles profondeurs de champ et d'obtenir une représentation tridimensionnelle d'un organe d'une épaisseur pouvant aller jusqu'à environ 500 µm, voire davantage (Kikuchi *et al.*, 2019; Rigby & Goldie, 1999). Ce type de technique est souvent utilisé dans des études utilisant l'embryon de poisson-zèbre comme modèle expérimental (Chitramuthu & Bennett, 2013; Jamadagni & Patten, 2019; Thisse & Thisse, 2014).

Métabolites, métabolisme et doses des composés étudiés

Les métabolites et le métabolisme. L'un des inconvénients de la culture organotypique est l'absence du métabolisme hépatique. Le fait qu'aucun des substituts n'ait affecté les sécrétions de testostérone et les principaux types de cellules testiculaires ne signifie pas que leurs métabolites n'auraient aucun effet. Par exemple, comme mentionné précédemment, l'apoptose des cellules germinales et la production de ROS dans des testicules de rats adultes étaient plus importantes après une exposition au métabolite actif principal du BDE-47 que le BDE-47 lui-même (Zhang *et al.*, 2013). En outre, il a été démontré que le DEHP avait un effet pro-androgénique sur le testicule fœtal en culture, tandis que le MEHP avait un effet anti-androgénique (Chauvigne *et al.*, 2009). La même étude a démontré que le testicule fœtal de rat n'est pas capable de métaboliser le DEHP. Malheureusement, les métabolites des substances chimiques émergentes sont rarement caractérisés. Pour confirmer la sûreté des substituts, dont les métabolites sont pour la plupart inconnus, il serait essentiel d'évaluer leur biotransformation. Pour ce faire, nous pourrions avoir recours à des microsomes hépatiques de rat, comme l'ont fait Erratico et ses collaborateurs (2011), qui ont caractérisé le métabolisme oxydatif du BDE-47 (Erratico *et al.*, 2011), puis de tester les principaux métabolites actifs en culture organotypique.

L'évaluation des concentrations de composés absorbés par les testicules en culture constituerait également une autre information importante. Des essais de radiomarquage ont démontré que seulement 0,3-0,4 % de 10^{-5} M de ^{14}C -MEHP étaient présents dans des testicules de rats fœtaux en culture (Chauvigne *et al.*, 2009). Les auteurs ont conclu que la concentration active de MEHP trouvée dans les organes était de l'ordre de grandeur des concentrations trouvées dans le plasma des femmes enceintes (680 µg/L) ou dans le sang de cordon de nouveau-nés (520 µg/L) (Latini *et al.*, 2003). Compte tenu de ce résultat, il nous sera d'autant plus nécessaire d'évaluer l'absorption de nos composés par les testicules fœtaux par

radiomarquage afin de déterminer à quel point la dose étudiée s'éloigne ou se rapproche d'une exposition humaine environnementale.

La dose étudiée. Ceci amène la question de la dose testée dans notre étude. Nous avons choisi de tester 10^{-5} M, car à cette dose, le MEHP est connu pour avoir des effets anti-androgéniques sur le testicule fœtal en culture (Chauvigne *et al.*, 2009), ce qui nous permettait d'utiliser ce composé à titre de contrôle positif pour la diminution des sécrétions de testostérone de façon à valider notre modèle. Compte tenu du nombre important de substituts du DEHP et du BDE-47 actuellement présents dans l'environnement, nous avons choisi de tester un nombre maximal de composés au lieu de tester plusieurs doses sur un petit nombre de composés. La possibilité de tester simultanément plusieurs doses d'un composé avec une seule portée de rats est d'ailleurs l'une des forces de notre système de culture organotypique de testicules fœtaux de rat qu'il nous faudra exploiter dans nos prochaines études. Ces analyses subséquentes seraient particulièrement importantes dans la mesure où les PE peuvent avoir des courbes doses-réponses non-monotoniques. Par exemple, dans une étude de culture organotypique de testicules fœtaux humains, les bisphénols S et F, deux substituts du BPA, ont diminué significativement les sécrétions de testostérone après 48h de culture aux doses minimales (10 nM) et maximales (10 000 nM), mais pas aux doses intermédiaires (100 nM) (Eladak *et al.*, 2015).

Perspectives de recherche

Analyses de l'épigénome. L'étude de marqueurs épigénétiques après les traitements pourrait constituer un autre avancement possible au projet.

Pendant le développement, les gonocytes subissent une réinitialisation de l'épigénome, essentielle au rétablissement des empreintes parentales, l'effacement des épimutations et la génération de l'identité transcriptionnelle de la lignée germinale (Ly *et al.*, 2015). Cette reprogrammation se produit en partie par la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones qui sont interdépendantes (Ly *et al.*, 2015). Il a été démontré que l'altération de la reprogrammation épigénétique au cours du développement périnatal affecte de manière permanente l'épigénome du sperme, ce qui pourrait entraîner des conséquences néfastes pour la descendance (Frick *et al.*, 2011; Radford *et al.*, 2014; Siklenka *et al.*, 2015). Récemment, les travaux de notre laboratoire ont suggéré que la culture organotypique de testicules fœtaux de rat âgés de 16,5 jpc ou 18,5 jpc et cultivés pendant 2 à 4 jours pouvait reproduire la cinétique des modifications de marqueurs épigénétiques (H3K4me2, H3K4me3 et

5mc) et des empreintes parentales (H19 et Snrpn) (Rwigemera *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent que la culture organotypique de testicules fœtaux de rat peut reproduire le processus de reprogrammation épigénétique *in vivo* et pourrait être utilisée pour étudier l'impact des produits chimiques environnementaux sur l'établissement de l'épigénome des cellules germinales mâles. Ces dernières ont d'ailleurs pu être purifiées par cytométrie en flux grâce à notre modèle de rat transgénique exprimant la GFP spécifiquement dans les cellules germinales (Rwigemera *et al.*, 2017). Avec notre modèle, il serait donc possible de déterminer *in vitro* si la cinétique globale de marqueurs épigénétiques est retrouvée dans les gonocytes en maturation suite aux traitements avec nos composés. Pour ce faire, l'immunofluorescence de marqueurs épigénétiques tels que H3K4me2, H3K4me3 et 5mc pourrait être quantifiée, telle que démontrée dans l'étude de Rwigemera et ses collaborateurs (2017). Les niveaux de méthylation (en utilisant par exemple les marqueurs d'empreintes parentales H19 et Snrpn) dans les gonocytes purifiés par cytométrie en flux pourraient également être caractérisés par pyroséquençage (Rwigemera *et al.*, 2017).

Identification des cellules autofluorescentes. Dans des études futures, il nous faudrait identifier un certain type de cellules interstitielles systématiquement présent dans nos échantillons. Ces cellules sont constituées d'un petit noyau rond et ont pour caractéristique d'être hautement autofluorescentes, avec ou sans l'ajout d'anticorps. Leur nombre dans les testicules traités n'est pas significativement augmenté ou diminué par rapport aux témoins. Notre hypothèse est qu'il s'agit de cellules immunitaires. Chez des testicules fœtaux de rat en culture prélevés à 14,5 jpc, Livera et ses collaborateurs (2006) en ont identifié avec l'anticorps ED1 (CD68), qui reconnaît les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages (Livera *et al.*, 2006; Meinhardt *et al.*, 1998). Il est possible qu'il s'agisse de la population interstitielle de macrophages tenant ses origines de la vésicule vitelline et qui est détectée chez la souris à 7,5 jpc (DeFalco *et al.*, 2014), ou alors d'une population de cellules immunitaires qui s'est générée et développée spontanément *in vitro* (Livera *et al.*, 2006). Pour valider cette hypothèse, nous pourrions tester par immunofluorescence un marqueur des monocytes, par exemple l'ED1, tout comme dans l'étude de Livera et ses collaborateurs (2006). Idéalement, le marqueur devrait être couplé à un fluorochrome émettant à 647nm ou plus, puisque nous avons observé que l'autofluorescence à cette longueur d'onde est minimale, à moins évidemment d'augmenter considérablement le temps d'exposition.

Analyses de substituts supplémentaires. D'autres remplaçants du MEHP et du BDE-47 présentement détectés dans l'environnement peuvent éventuellement être testés avec notre

modèle. Dans la famille des plastifiants, ceux-ci incluent par exemple le téréphtalate de di-2-éthylhexyle (DEHTP), le di-isononylcyclohexane-1,2 dicarboxylate (DINCH), l'adipate de 2-éthylhexyle (DEHA), ou encore le phosphate de tris(dichloro-isopropyle) (TDCPP) (Bui *et al.*, 2016; Calafat *et al.*, 2015). Dans la famille des retardateurs de flamme, le phosphate de triphényle (TPhP), le phosphate de tris(dichloro-isopropyle) (TDCPP) et le phosphate de tricrésyle (TCrP) pourraient également être testés (Fan *et al.*, 2014). Actuellement, le bisphénol A, désigné comme PE (Rezg *et al.*, 2014; Rochester, 2013), a lui aussi été remplacé par divers substituts, comme le bisphénol S et le bisphénol F (Lehmler *et al.*, 2018). Dans une étude ayant utilisé le modèle de culture organotypique de testicules fœtaux humains, les bisphénols S et F avaient un potentiel PE équivalent au BPA et réduisaient les sécrétions basales de testostérone à une concentration de 10 nM (Eladak *et al.*, 2015). Le potentiel PE et la toxicité de tous les substituts mentionnés pourraient éventuellement être testés avec notre modèle de culture.

Conclusion

Pour la première fois, des substituts du DEHP et des membres de la famille des retardateurs de flamme ont été testés avec notre modèle de culture d'organotypique de testicules fœtaux de rat. Nos résultats démontrent que, à 10^{-5} M, seul le MEHP induit une diminution des sécrétions de testostérone basales et stimulées par la LH de testicules fœtaux de rats en culture. Le MEHP et le BDE-47 ont tous les deux diminué la densité des cellules germinales, mais cette diminution n'était significative qu'après traitement au MEHP. L'exposition au MEHP a également réduit la prolifération des cellules de Sertoli. Finalement, les résultats de cette étude n'indiquent aucun potentiel PE ni aucune toxicité marquée des substituts sur le testicule fœtal de rat en culture. Cette absence d'effet doit être confirmée par des réplicats supplémentaires, notamment en ce qui concerne l'analyse de la prolifération des cellules de Leydig. Leurs métabolites doivent également être identifiés et testés en culture organotypique. Dans l'ensemble, cette étude permet d'identifier des substituts moins toxiques et fournit des informations essentielles concernant la nécessité de les réglementer. Étant donné la nécessité de mettre au point des méthodes rapides et sensibles qui permettent de mieux comprendre le potentiel PE de substances chimiques émergentes, la technique utilisée pour cette étude est un moyen prometteur pour compléter les études *in vitro* et indiquer si des études toxicologiques supplémentaires sont nécessaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Abb M, Heinrich T, Sorkau E & Lorenz W (2009) Phthalates in house dust. *Environment international* 35(6):965-970.
- Abdelouahab N, Ainmelk Y & Takser L (2011) Polybrominated diphenyl ethers and sperm quality. *Reprod Toxicol* 31(4):546-550.
- Adham IM, Emmen JM & Engel W (2000) The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. *Molecular and cellular endocrinology* 160(1-2):11-16.
- Adham IM, Steding G, Thamm T, Bullesbach EE, Schwabe C, Paprotta I & Engel W (2002) The overexpression of the insl3 in female mice causes descent of the ovaries. *Mol Endocrinol* 16(2):244-252.
- Agarwal DK, Eustis S, Lamb JcT, Reel JR & Kluwe WM (1986) Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology, and reproductive performance of male rats. *Environmental health perspectives* 65:343-350.
- Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR & Hardy MP (2004) Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145(2):592-603.
- Alaee M, Arias P, Sjodin A & Bergman A (2003) An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment international* 29(6):683-689.
- Albert O, Huang JY, Aleksa K, Hales BF, Goodyer CG, Robaire B, Chevrier J & Chan P (2018) Exposure to polybrominated diphenyl ethers and phthalates in healthy men living in the greater Montreal area: A study of hormonal balance and semen quality. *Environment international* 116:165-175.
- Albert O & Jegou B (2014) A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood. *Human reproduction update* 20(2):231-249.
- Ali N, Dirtu AC, Van den Eede N, Goosey E, Harrad S, Neels H, t Mannetje A, Coakley J, Douwes J & Covaci A (2012) Occurrence of alternative flame retardants in indoor dust from New Zealand: indoor sources and human exposure assessment. *Chemosphere* 88(11):1276-1282.
- Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquie M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E & Nadal A (2008) Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS one* 3(4):e2069.
- Anthony CT & Skinner MK (1989) Cytochemical and biochemical characterization of testicular peritubular myoid cells. *Biology of reproduction* 40(4):811-823.
- Arbuckle TE, Davis K, Marro L, Fisher M, Legrand M, LeBlanc A, Gaudreau E, Foster WG, Choerung V & Fraser WD (2014) Phthalate and bisphenol A exposure among pregnant women in Canada--results from the MIREC study. *Environment international* 68:55-65.
- Ascoli M (1981) Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* 108(1):88-95.
- Ash M & Ash I (2003) *Paint and coating raw materials. Electronic Handbook, 2nd edition*. Endicott (NY).

- Baillie AH (1964) The Histochemistry and Ultrastructure of the Genocyte. *Journal of anatomy* 98:641-645.
- Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C & Scherer G (2006) Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biology of reproduction* 74(1):195-201.
- Barrionuevo F, Burgos M & Jimenez R (2011) Origin and function of embryonic Sertoli cells. *Biomolecular concepts* 2(6):537-547.
- Becker LC (2017) *Safety Assessment of Monoalkylglycol Dialkyl Acid Esters as Used in Cosmetics*. Washington, DC, Cosmetic Ingredient Review. http://www.cir-safety.org/sites/default/files/Monoalkylglycol%20Dialkyl%20Acid%20Esters_0.pdf.
- Behringer RR, Finegold MJ & Cate RL (1994) Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79(3):415-425.
- Belloni V, Sorci G, Paccagnini E, Guerreiro R, Bellenger J & Faivre B (2014) Disrupting immune regulation incurs transient costs in male reproductive function. *PloS one* 9(1):e84606.
- Bhushan S, Tchatalbachev S, Lu Y, Frohlich S, Fijak M, Vijayan V, Chakraborty T & Meinhardt A (2015) Differential activation of inflammatory pathways in testicular macrophages provides a rationale for their subdued inflammatory capacity. *J Immunol* 194(11):5455-5464.
- Biedermann-Brem S, Biedermann M, Pfenninger S, Bauer M, Altkofer W, Rieger K, Hauri U, Droz C & Grob K (2008) Plasticizers in PVC toys and childcare products: what succeeds the phthalates? Market survey 2007. *Chromatographia* 68:227-234.
- Bishop PL & Willett CE (2014) The use and acceptance of Other Scientifically Relevant Information (OSRI) in the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Endocrine Disruptor Screening Program. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 101(1):3-22.
- Blair JD, Ikonomou MG, Kelly BC, SurrIDGE B & Gobas FA (2009) Ultra-trace determination of phthalate ester metabolites in seawater, sediments, and biota from an urbanized marine inlet by LC/ESI-MS/MS. *Environmental science & technology* 43(16):6262-6268.
- Boberg J, Christiansen S, Axelstad M, Kledal TS, Vinggaard AM, Dalgaard M, Nellemann C & Hass U (2011) Reproductive and behavioral effects of diisononyl phthalate (DINP) in perinatally exposed rats. *Reprod Toxicol* 31(2):200-209.
- Bocio A, Llobet JM, Domingo JL, Corbella J, Teixido A & Casas C (2003) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(10):3191-3195.
- Bogatcheva NV, Truong A, Feng S, Engel W, Adham IM & Agoulnik AI (2003) GREAT/LGR8 is the only receptor for insulin-like 3 peptide. *Mol Endocrinol* 17(12):2639-2646.
- Bonisch U, Bohme A, Kohajda T, Mogel I, Schutze N, von Bergen M, Simon JC, Lehmann I & Polte T (2012) Volatile organic compounds enhance allergic airway inflammation in an experimental mouse model. *PloS one* 7(7):e39817.
- Borch J, Axelstad M, Vinggaard AM & Dalgaard M (2006) Diisobutyl phthalate has comparable anti-androgenic effects to di-n-butyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology letters* 163(3):183-190.
- Borch J, Ladefoged O, Hass U & Vinggaard AM (2004) Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod Toxicol* 18(1):53-61.

- Bornehag CG, Carlstedt F, Jonsson BA, Lindh CH, Jensen TK, Bodin A, Jonsson C, Janson S & Swan SH (2015) Prenatal phthalate exposures and anogenital distance in Swedish boys. *Environmental health perspectives* 123(1):101-107.
- Bornehag CG, Lundgren B, Weschler CJ, Sigsgaard T, Hagerhed-Engman L & Sundell J (2005) Phthalates in indoor dust and their association with building characteristics. *Environmental health perspectives* 113(10):1399-1404.
- Boron WF & Boulpaep EL (2012) *Medical physiology: A cellular and molecular approach*. 1600 John F. Kennedy Blvd, Philadelphia, 2e Edition.
- Bott RC, McFee RM, Clopton DT, Toombs C & Cupp AS (2006) Vascular endothelial growth factor and kinase domain region receptor are involved in both seminiferous cord formation and vascular development during testis morphogenesis in the rat. *Biology of reproduction* 75(1):56-67.
- 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. *Molecular reproduction and development* 65(2):194-203.
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H & Koopman P (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312(5773):596-600.
- Bradley EL, Burden RA, Bentayeb K, Driffield M, Harmer N, Mortimer DN, Speck DR, Ticha J & Castle L (2013a) Exposure to phthalic acid, phthalate diesters and phthalate monoesters from foodstuffs: UK total diet study results. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 30(4):735-742.
- Bradley EL, Burden RA, Leon I, Mortimer DN, Speck DR & Castle L (2013b) Determination of phthalate diesters in foods. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 30(4):722-734.
- Braekevelt E, Tittlemier SA & Tomy GT (2003) Direct measurement of octanol-water partition coefficients of some environmentally relevant brominated diphenyl ether congeners. *Chemosphere* 51(7):563-567.
- Brennan J, Karl J & Capel B (2002) Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad. *Developmental biology* 244(2):418-428.
- Brennan J, Tilmann C & Capel B (2003) Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes & development* 17(6):800-810.
- Brooks DE (1979) Influence of androgens on the weights of the male accessory reproductive organs and on the activities of mitochondrial enzymes in the epididymis of the rat. *The Journal of endocrinology* 82(2):293-303.
- Buehr M, Gu S & McLaren A (1993) Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117(1):273-281.
- Bui TT, Giovanoulis G, Cousins AP, Magner J, Cousins IT & de Wit CA (2016) Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. *The Science of the total environment* 541:451-467.
- Bullejos M & Koopman P (2005) Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-Y(DOM) sex reversal. *Developmental biology* 278(2):473-481.

- Calafat AM, Valentin-Blasini L & Ye X (2015) Trends in Exposure to Chemicals in Personal Care and Consumer Products. *Current environmental health reports* 2(4):348-355.
- Canada (2012) *Canadian Environmental Protection Act, 1999: Notice with respect to certain substances on the Domestic Substances List. Canada Gazette, Part I. Canada, Dept. of the Environment.*
- Canada (2013) *Canadian Environmental Protection Act, 1999: Notice with respect to certain phthalate substances.* Canada Gazette, Part I. 1801-1821 p. <http://gazette.gc.ca/rp-pr/p1/2013/2013-07-13/html/notice-avis-eng.html#archived>.
- Canada (2016) Règlement sur les phtalates. (DORS/188, art 37).
- Cao D, Guo J, Wang Y, Li Z, Liang K, Corcoran MB, Hosseini S, Bonina SM, Rockne KJ, Sturchio NC, Giesy JP, Liu J, Li A & Jiang G (2017) Organophosphate Esters in Sediment of the Great Lakes. *Environmental science & technology* 51(3):1441-1449.
- Cao S, Zeng X, Song H, Li H, Yu Z, Sheng G & Fu J (2012) Levels and distributions of organophosphate flame retardants and plasticizers in sediment from Taihu Lake, China. *Environmental toxicology and chemistry* 31(7):1478-1484.
- Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR & Schedl A (2004) Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131(9):1891-1901.
- Chang JW, Chen CY, Yan BR, Chang MH, Tseng SH, Kao YM, Chen JC & Lee CC (2014) Cumulative risk assessment for plasticizer-contaminated food using the hazard index approach. *Environ Pollut* 189:77-84.
- Chauvigne F, Menuet A, Lesne L, Chagnon MC, Chevrier C, Regnier JF, Angerer J & Jegou B (2009) Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environmental health perspectives* 117(4):515-521.
- Chauvigne F, Plummer S, Lesne L, Cravedi JP, Dejucq-Rainsford N, Fostier A & Jegou B (2011) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate directly alters the expression of Leydig cell genes and CYP17 lyase activity in cultured rat fetal testis. *PloS one* 6(11):e27172.
- Chen ZX & Riggs AD (2005) Maintenance and regulation of DNA methylation patterns in mammals. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 83(4):438-448.
- Chitramuthu BP & Bennett HP (2013) High resolution whole mount in situ hybridization within zebrafish embryos to study gene expression and function. *Journal of visualized experiments : JoVE* 10.3791/50644(80):e50644.
- CHMS (2010) *Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada. Results of the Canadian Health Measures Survey Cycle 1 (2007–2009)* Canadian Health Measures Survey. 292 p
- Choi K, Joo H, Campbell JL, Jr., Clewell RA, Andersen ME & Clewell HJ, 3rd (2012) In vitro metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by various tissues and cytochrome P450s of human and rat. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 26(2):315-322.
- Christiansen S, Boberg J, Axelstad M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Metzdorff SB & Hass U (2010) Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reprod Toxicol* 30(2):313-321.

- Clark AM, Garland KK & Russell LD (2000) Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biology of reproduction* 63(6):1825-1838.
- Clewell RA, Sochaski M, Edwards K, Creasy DM, Willson G & Andersen ME (2013) Disposition of diisononyl phthalate and its effects on sexual development of the male fetus following repeated dosing in pregnant rats. *Reprod Toxicol* 35:56-69.
- Coady KK, Biever RC, Denslow ND, Gross M, Guiney PD, Holbech H, Karouna-Renier NK, Katsiadaki I, Krueger H, Levine SL, Maack G, Williams M, Wolf JC & Ankley GT (2017) Current limitations and recommendations to improve testing for the environmental assessment of endocrine active substances. *Integrated environmental assessment and management* 13(2):302-316.
- Codesal J, Regadera J, Nistal M, Regadera-Sejas J & Paniagua R (1990) Involution of human fetal Leydig cells. An immunohistochemical, ultrastructural and quantitative study. *Journal of anatomy* 172:103-114.
- Colborn T, vom Saal FS & Soto AM (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives* 101(5):378-384.
- Combes AN, Wilhelm D, Davidson T, Dejana E, Harley V, Sinclair A & Koopman P (2009) Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental biology* 326(1):112-120.
- Cool J, Carmona FD, Szucsik JC & Capel B (2008) Peritubular myoid cells are not the migrating population required for testis cord formation in the XY gonad. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 2(3):128-133.
- Cousins I & Mackay D (2000) Correlating the physical-chemical properties of phthalate esters using the 'three solubility' approach. *Chemosphere* 41(9):1389-1399.
- Coveney D, Cool J, Oliver T & Capel B (2008) Four-dimensional analysis of vascularization during primary development of an organ, the gonad. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(20):7212-7217.
- Cronkhite JT, Norlander C, Furth JK, Levan G, Garbers DL & Hammer RE (2005) Male and female germline specific expression of an EGFP reporter gene in a unique strain of transgenic rats. *Developmental biology* 284(1):171-183.
- Culty M (2009) Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 87(1):1-26.
- Dalgaard M, Nellemann C, Lam HR, Sorensen IK & Ladefoged O (2001) The acute effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes of prepubertal Wistar rats. *Toxicology letters* 122(1):69-79.
- Daughton CG (2003) Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environmental health perspectives* 111(5):757-774.
- David RM (2006) Proposed mode of action for in utero effects of some phthalate esters on the developing male reproductive tract. *Toxicologic pathology* 34(3):209-219.
- DeFalco T, Bhattacharya I, Williams AV, Sams DM & Capel B (2014) Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(23):E2384-2393.

- DeFalco T, Potter SJ, Williams AV, Waller B, Kan MJ & Capel B (2015) Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. *Cell reports* 12(7):1107-1119.
- Delbes G, Duquenne C, Szenker J, Taccoen J, Habert R & Levacher C (2007) Developmental changes in testicular sensitivity to estrogens throughout fetal and neonatal life. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 99(1):234-243.
- Delbes G, Levacher C, Duquenne C, Racine C, Pakarinen P & Habert R (2005) Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 146(5):2454-2461.
- Desdoits-Lethimonier C, Albert O, Le Bizec B, Perdu E, Zalko D, Courant F, Lesne L, Guille F, Dejucq-Rainsford N & Jegou B (2012) Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. *Hum Reprod* 27(5):1451-1459.
- DGSESC (2001) Guide des exigences canadiennes en matière de sécurité des jouets et des produits connexes dans l'industrie. Programme Sécurité des produits de consommation de la sécurité des produits. Édit Canada S (Direction générale de la santé environnementale et sécurité des consommateurs).
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT & Gore AC (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews* 30(4):293-342.
- Dodson RE, Perovich LJ, Covaci A, Van den Eede N, Ionas AC, Dirtu AC, Brody JG & Rudel RA (2012) After the PBDE phase-out: a broad suite of flame retardants in repeat house dust samples from California. *Environmental science & technology* 46(24):13056-13066.
- Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J & Wylie CC (1986) Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44(6):831-838.
- Doucet J, Tague B, Arnold DL, Cooke GM, Hayward S & Goodyer CG (2009) Persistent organic pollutant residues in human fetal liver and placenta from Greater Montreal, Quebec: a longitudinal study from 1998 through 2006. *Environmental health perspectives* 117(4):605-610.
- Durmaz E, Ozmert EN, Erkekoglu P, Giray B, Derman O, Hincal F & Yurdakok K (2010) Plasma phthalate levels in pubertal gynecomastia. *Pediatrics* 125(1):e122-129.
- Duty SM, Ackerman RM, Calafat AM & Hauser R (2005) Personal care product use predicts urinary concentrations of some phthalate monoesters. *Environmental health perspectives* 113(11):1530-1535.
- Eastman (2020) *Eastman TXIB Formulation Additive*. <https://www.eastman.com/Pages/ProductHome.aspx?product=71066420> (Consulté le 10 juin 2020).
- ECCC (2009) *Gestion des substances toxiques. Informations sur la substance – Polybromodiphényléthers*. Environment and Climate Change Canada.
- ECCC (2014) *Données sur les phtalates collectées en vertu de la Loi canadienne de protection de l'environnement (1999), article 71 : Avis relatif à certains phtalate substances. Données produites par le Programme des substances existantes d'Environnement Canada*. Environnement et Changement Climatique Canada.
- ECCC (2017) *Phthalate Substance Grouping*. Environment and Climate Change Canada - Health Canada. 228 p.

- ECCC (2018) *Draft screening assessment aliphatic diesters group hexanedioic acid diisodecyl ester*. Environment and Climate Change Canada, Health Canada. <https://www.canada.ca/content/dam/eccc/documents/pdf/pded/dida/English%20draft%20screening%20assessment%20aliphatic%20diesters%20group%20hexanedioic%20acid%20diisodecyl%20ester.pdf>.
- ECHA (2007-2016) *Registered substances database; search results for CAS RN 28472-97-1*. Helsinki (FI), European Chemicals Agency.
- ECHA (2008) *Member state committee support document for identification of bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) as a substance of very high concern*. European Chemicals Agency. <https://echa.europa.eu/documents/10162/9e33725c-05fc-41af-b06d-bb969c91b0ab>.
- ECHA (2014) *Information on chemicals*. European Chemicals Agency. <http://echa.europa.eu/information-on-chemicals>.
- Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin MJ, N'Tumba-Byn T, Pozzi-Gaudin S, Benachi A, Livera G, Rouiller-Fabre V & Habert R (2015) A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and sterility* 103(1):11-21.
- Elliott SM, Brigham ME, Lee KE, Banda JA, Choy SJ, Gefell DJ, Minarik TA, Moore JN & Jorgenson ZG (2017) Contaminants of emerging concern in tributaries to the Laurentian Great Lakes: I. Patterns of occurrence. *PLoS one* 12(9):e0182868.
- Emmen JM, McLuskey A, Adham IM, Engel W, Verhoef-Post M, Themmen AP, Grootegoed JA & Brinkmann AO (2000) Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism. *Endocrinology* 141(2):846-849.
- Environment Canada (2014) *Data for substances in the Phthalate Substances Grouping collected under the Canadian Environmental Protection Act, 1999, section 71: Notice with respect to certain phthalate substances*. Health Canada; Existing Substances Program.
- Environnement Canada (2008) *Approche de gestion des risques proposée pour le Phénol, 4,4'-(1-méthyléthylidène), bis (Bisphénol A)*. Numéro de registre du Chemical Abstracts Service (CAS) : 80-05-7. Santé Canada. https://www.ec.gc.ca/ese-ees/6FA54372-A09E-45CD-8A5F-39EBDD55D13A/batch2_80-05-7_rm_fr.pdf.
- Eriksson J, Green N, Marsh G & Bergman A (2004) Photochemical decomposition of 15 polybrominated diphenyl ether congeners in methanol/water. *Environmental science & technology* 38(11):3119-3125.
- Erratico C, Zheng X, Ryden A, Marsh G, Maho W & Covaci A (2015) Human hydroxylated metabolites of BDE-47 and BDE-99 are glucuronidated and sulfated in vitro. *Toxicology letters* 236(2):98-109.
- Erratico CA, Moffatt SC & Bandiera SM (2011) Comparative oxidative metabolism of BDE-47 and BDE-99 by rat hepatic microsomes. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 123(1):37-47.
- EU RAR (2003) *1,2-Benzenedicarboxylic Acid, Di-C8-10-Branched Alkyl Esters, C9-Rich and Di-“Isononyl” Phthalate (DINP)*. European Union Risk Assessment Report. <http://echa.europa.eu/documents/10162/0645f0cb-7880-4d23-acea-27b05ed7de39>.
- Eulaers I, Jaspers VL, Halley DJ, Lepoint G, Nygard T, Pinxten R, Covaci A & Eens M (2014) Brominated and phosphorus flame retardants in White-tailed Eagle *Haliaeetus albicilla*

- nestlings: bioaccumulation and associations with dietary proxies ($\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ and $\delta^{34}S$). *The Science of the total environment* 478:48-57.
- Fan X, Kubwabo C, Rasmussen PE & Wu F (2014) Simultaneous determination of thirteen organophosphate esters in settled indoor house dust and a comparison between two sampling techniques. *The Science of the total environment* 491-492:80-86.
- Fiala F & Steiner I (2005) Plasticizers in toys: Method validation using toy samples and analysis of toys. Final report. (Austrian Standards Institute, Austria).
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN & et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372(6506):525-530.
- Fouquet JP, Meusy-Dessolle N & Dang DC (1984) Relationships between Leydig cell morphometry and plasma testosterone during postnatal development of the monkey, *Macaca fascicularis*. *Reproduction, nutrition, developpement* 24(3):281-296.
- Frederiksen H, Skakkebaek NE & Andersson AM (2007) Metabolism of phthalates in humans. *Molecular nutrition & food research* 51(7):899-911.
- Frick KM, Zhao Z & Fan L (2011) The epigenetics of estrogen: epigenetic regulation of hormone-induced memory enhancement. *Epigenetics* 6(6):675-680.
- Fromme H, Gruber L, Schlummer M, Wolz G, Bohmer S, Angerer J, Mayer R, Liebl B & Bolte G (2007) Intake of phthalates and di(2-ethylhexyl)adipate: results of the Integrated Exposure Assessment Survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data. *Environment international* 33(8):1012-1020.
- Fromme H, Gruber L, Seckin E, Raab U, Zimmermann S, Kiranoglu M, Schlummer M, Schwegler U, Smolic S & Volkel W (2011) Phthalates and their metabolites in breast milk—results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). *Environment international* 37(4):715-722.
- Fromme H, Lahrz T, Kraft M, Fembacher L, Mach C, Dietrich S, Burkardt R, Volkel W & Goen T (2014) Organophosphate flame retardants and plasticizers in the air and dust in German daycare centers and human biomonitoring in visiting children (LUPE 3). *Environment international* 71:158-163.
- Furr JR, Lambright CS, Wilson VS, Foster PM & Gray LE, Jr. (2014) A short-term in vivo screen using fetal testosterone production, a key event in the phthalate adverse outcome pathway, to predict disruption of sexual differentiation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 140(2):403-424.
- Furtmann K (1994) Phthalates in surface water — a method for routine trace level analysis. *Fresenius J Anal Chem* 348:291–296.
- Gahankari DR & Golhar KB (1993) An evaluation of serum and tissue bound immunoglobulins in prostatic diseases. *Journal of postgraduate medicine* 39(2):63-67.
- Gangnerau MN & Picon R (1987) Onset of steroidogenesis and differentiation of functional LH receptors in rat fetal testicular cultures. *Archives of andrology* 18(3):215-224.
- Gao F, Maiti S, Alam N, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Lecureuil C, Guillou F & Huff V (2006) The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(32):11987-11992.

- Garcia TX, DeFalco T, Capel B & Hofmann MC (2013) Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. *Developmental biology* 377(1):188-201.
- Geck P, Szelei J, Jimenez J, Lin TM, Sonnenschein C & Soto AM (1997) Expression of novel genes linked to the androgen-induced, proliferative shutoff in prostate cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 63(4-6):211-218.
- Geyer HJ, Schramm K, Feicht E, Fried K, Henkelmann B, Lenoir D, Darnerud P, Aune M, Schmid P & McDonald T (2004) Terminal elimination half-lives of the brominated flame retardants TBBPA, HBCD, and lower brominated PBDEs in humans. *Organohalogen Compounds* 66:167.
- Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J & Zoeller RT (2015) EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine reviews* 36(6):E1-E150.
- Gray LE, Jr., Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DN & Parks L (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 58(2):350-365.
- Gray LE, Jr., Ostby J, Monosson E & Kelce WR (1999) Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicology and industrial health* 15(1-2):48-64.
- Greaves AK & Letcher RJ (2014) Comparative body compartment composition and in ovo transfer of organophosphate flame retardants in North American Great Lakes herring gulls. *Environmental science & technology* 48(14):7942-7950.
- Griswold SL & Behringer RR (2009) Fetal Leydig cell origin and development. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 3(1):1-15.
- Guerranti C, Sbordoni I, Fanello E, Borghini F, Corsi I & Focardi S (2013) Levels of phthalates in human milk samples from central Italy. *Microchemical Journal* 107:178-181.
- Gunderson EL (1995) Dietary intakes of pesticides, selected elements, and other chemicals: FDA Total Diet Study, June 1984-April 1986. *Journal of AOAC International* 78(4):910-921.
- Guo W, Holden A, Smith SC, Gephart R, Petreas M & Park JS (2016) PBDE levels in breast milk are decreasing in California. *Chemosphere* 150:505-513.
- Guvenius DM, Aronsson A, Ekman-Ordeberg G, Bergman A & Noren K (2003) Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorobiphenyls, and pentachlorophenol. *Environmental health perspectives* 111(9):1235-1241.
- Habert R, Muczynski V, Grisin T, Moison D, Messiaen S, Frydman R, Benachi A, Delbes G, Lambrot R, Lehraiki A, N'Tumba-Byn T, Guerquin MJ, Levacher C, Rouiller-Fabre V & Livera G (2014) Concerns about the widespread use of rodent models for human risk assessments of endocrine disruptors. *Reproduction* 147(4):R119-129.
- Habert R & Picon R (1982) Control of testicular steroidogenesis in foetal rat: effect of decapitation on testosterone and plasma luteinizing hormone-like activity. *Acta endocrinologica* 99(3):466-473.

- Habert R & Picon R (1984) Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *Journal of steroid biochemistry* 21(2):193-198.
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P & Lovell-Badge R (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121(6):1603-1614.
- Hakkarainen M (2008) Migration of Monomeric and Polymeric PVC Plasticizers. *Chromatography for Sustainable Polymeric Materials. Advances in Polymer Science. Advances in Polymer Science*, Albertsson A & Hakkarainen M (Édit.) Springer, Berlin, Heidelberg Vol 211.
- Han SW, Lee H, Han SY, Lim DS, Jung KK, Kwack SJ, Kim KB & Lee BM (2009) An exposure assessment of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in human semen. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 72(21-22):1463-1469.
- Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS & Gray LE, Jr. (2011) Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 123(1):206-216.
- Harikae K, Miura K & Kanai Y (2013) Early gonadogenesis in mammals: significance of long and narrow gonadal structure. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 242(4):330-338.
- Hasthorpe S, Barbic S, Farmer PJ & Hutson JM (1999) Neonatal mouse gonocyte proliferation assayed by an in vitro clonogenic method. *Journal of reproduction and fertility* 116(2):335-344.
- Health Canada (2015) *Technical document: approach for using chemical categories and read-across to address data gaps for effects on the developing male reproductive system: Phthalate Substance Grouping*. Ottawa (ON), Health Canada. <http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca/group/phthalate/index-eng.php>.
- Hebel R & Stromberg M (1986) *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. BioMed Verlag
- Herbst AL (1976) Summary of the changes in the human female genital tract as a consequence of maternal diethylstilbestrol therapy. *Journal of toxicology and environmental health. Supplement* 1:13-20.
- Herbstman JB, Sjodin A, Apelberg BJ, Witter FR, Patterson DG, Halden RU, Jones RS, Park A, Zhang Y, Heidler J, Needham LL & Goldman LR (2007) Determinants of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in an urban population. *Environmental health perspectives* 115(12):1794-1800.
- Herr C, zur Nieden A, Kock H, Schuppe H, Fieber C, Eikmann T, Stilianakis N & Angerer J (2009) Urinary di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-metabolites and male human markers of reproductive function. *International journal of hygiene and environmental health* 212:648-653.
- Heudorf U, Mersch-Sundermann V & Angerer J (2007) Phthalates: toxicology and exposure. *International journal of hygiene and environmental health* 210(5):623-634.
- Hiramatsu R, Matoba S, Kanai-Azuma M, Tsunekawa N, Katoh-Fukui Y, Kurohmaru M, Morohashi K, Wilhelm D, Koopman P & Kanai Y (2009) A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development* 136(1):129-138.

- Hites RA (2004) Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: a meta-analysis of concentrations. *Environmental science & technology* 38(4):945-956.
- Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J & Prins GS (2006) Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer research* 66(11):5624-5632.
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dettin L, Johnson E & Dym M (2005) Immortalization of mouse germ line stem cells. *Stem Cells* 23(2):200-210.
- Hogberg J, Hanberg A, Berglund M, Skerfving S, Remberger M, Calafat AM, Filipsson AF, Jansson B, Johansson N, Appelgren M & Hakansson H (2008) Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environmental health perspectives* 116(3):334-339.
- Holdcraft RW & Braun RE (2004) Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 131(2):459-467.
- Holliday R & Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187(4173):226-232.
- Hu GX, Lian QQ, Ge RS, Hardy DO & Li XK (2009) Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20(3):139-145.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN & Bartley J (1999) Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *American journal of medical genetics* 87(4):349-353.
- Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ & Lee CC (2009) Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environment international* 35(1):14-20.
- Hurley S, Goldberg D, Nelson DO, Guo W, Wang Y, Baek HG, Park JS, Petreas M, Bernstein L, Anton-Culver H & Reynolds P (2017) Temporal Evaluation of Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Serum Levels in Middle-Aged and Older California Women, 2011-2015. *Environmental science & technology* 51(8):4697-4704.
- Hutson JM & Hasthorpe S (2005) Abnormalities of testicular descent. *Cell and tissue research* 322(1):155-158.
- Huwe J (2004) Polybrominated Diphenyl Ethers in meat samples collected from supermarkets across the US. BFR 2004: Toronto, Canada. *BFR 2004: Toronto, Canada* :41-44.
- Huwe JK & Smith DJ (2007) Accumulation, whole-body depletion, and debromination of decabromodiphenyl ether in male sprague-dawley rats following dietary exposure. *Environmental science & technology* 41(7):2371-2377.
- Inoue M, Shima Y, Miyabayashi K, Tokunaga K, Sato T, Baba T, Ohkawa Y, Akiyama H, Suyama M & Morohashi K (2016) Isolation and Characterization of Fetal Leydig Progenitor Cells of Male Mice. *Endocrinology* 157(3):1222-1233.
- Itoh M, Li XQ, Yano A, Xie Q & Takeuchi Y (1998) Patterns of efferent lymphatics of the mouse testis. *Journal of andrology* 19(4):466-472.
- Jamadagni P & Patten SA (2019) 25-hydroxycholesterol impairs neuronal and muscular development in zebrafish. *Neurotoxicology* 75:14-23.
- Jarnstrom H, Saarela K, Kalliokoski P & Pasanen AL (2008) Comparison of VOC and ammonia emissions from individual PVC materials, adhesives and from complete structures. *Environment international* 34(3):420-427.

- Jeanes A, Wilhelm D, Wilson MJ, Bowles J, McClive PJ, Sinclair AH & Koopman P (2005) Evaluation of candidate markers for the peritubular myoid cell lineage in the developing mouse testis. *Reproduction* 130(4):509-516.
- Jensen TK, Frederiksen H, Kyhl HB, Lassen TH, Swan SH, Bornehag CG, Skakkebaek NE, Main KM, Lind DV, Husby S & Andersson AM (2016) Prenatal Exposure to Phthalates and Anogenital Distance in Male Infants from a Low-Exposed Danish Cohort (2010-2012). *Environmental health perspectives* 124(7):1107-1113.
- Jin Y, Chen G & Fu Z (2016) Effects of TBEP on the induction of oxidative stress and endocrine disruption in Tm3 Leydig cells. *Environmental toxicology* 31(10):1276-1286.
- Joensen UN, Frederiksen H, Blomberg Jensen M, Lauritsen MP, Olesen IA, Lassen TH, Andersson AM & Jørgensen N (2012a) Phthalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy Danish men. *Environmental health perspectives* 120(10):1397-1403.
- Joensen UN, Frederiksen H, Blomberg Jensen M, Lauritsen MP, Olesen IA, Lassen TH, Andersson AM & Jørgensen N (2012b) Phthalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy Danish men. *Environmental health perspectives* 120(10):1397-1403.
- Johnson-Restrepo B, Kannan K, Rapaport DP & Rodan BD (2005) Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue from New York. *Environmental science & technology* 39(14):5177-5182.
- Johnson PI, Stapleton HM, Mukherjee B, Hauser R & Meeker JD (2013) Associations between brominated flame retardants in house dust and hormone levels in men. *The Science of the total environment* 445-446:177-184.
- Johnson PI, Stapleton HM, Sjodin A & Meeker JD (2010) Relationships between polybrominated diphenyl ether concentrations in house dust and serum. *Environmental science & technology* 44(14):5627-5632.
- Johnson S, Saikia N & Sahu R (2011) Phthalates in toys available in Indian market. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 86(6):621-626.
- Jonsson BA, Richthoff J, Rylander L, Giwercman A & Hagmar L (2005) Urinary phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in young men. *Epidemiology* 16(4):487-493.
- Josso N, Cate RL, Picard JY, Vigier B, di Clemente N, Wilson C, Imbeaud S, Pepinsky RB, Guerrier D, Boussin L & et al. (1993) Anti-mullerian hormone: the Jost factor. *Recent progress in hormone research* 48:1-59.
- JOUE (2005) *Directive 2005/84/CE du Parlement Européen et du Conseil du 14 décembre 2005 modifiant pour la vingt-deuxième fois la directive 76/769/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (phthalates dans les jouets et les articles de puériculture)*. Journal officiel de l'Union européenne.
- JOUE (2007) *DIRECTIVE 2007/19/CE DE LA COMMISSION du 2 avril 2007 portant modification de la directive 2002/72/CE concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires et de la directive 85/572/CEE du Conseil fixant la liste des simulants à utiliser pour vérifier la migration des constituants*

- des matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires.* Journal officiel de l'Union européenne.
- JOUE (2009) *Règlement (ce) no 1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques.* Journal officiel de l'Union européenne. 151 p.
- JOUE (2011) *Directive 2011/8/UE de la commission du 28 janvier 2011 modifiant la directive 2002/72/CE en ce qui concerne la restriction de l'utilisation du bisphénol A dans les biberons en plastique pour nourrissons.* Journal officiel de l'Union européenne. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:FR:PDF>.
- Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, Hawula W, Jakubowski L & Hanke W (2013) Human urinary phthalate metabolites level and main semen parameters, sperm chromatin structure, sperm aneuploidy and reproductive hormones. *Reprod Toxicol* 42:232-241.
- Karl J & Capel B (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental biology* 203(2):323-333.
- Katsikantami I, Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Karzi V, Hatzidaki E, Stavroulaki A, Vakonaki E, Xezonaki P, Sifakis S, Rizos AK & Tsatsakis AM (2020) Phthalate metabolites concentrations in amniotic fluid and maternal urine: Cumulative exposure and risk assessment. *Toxicology reports* 7:529-538.
- Kavlock R, Barr D, Boekelheide K, Breslin W, Breyse P, Chapin R, Gaido K, Hodgson E, Marcus M, Shea K & Williams P (2006) NTP-CERHR Expert Panel Update on the Reproductive and Developmental Toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 22(3):291-399.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T & Tilson HA (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental health perspectives* 104 Suppl 4:715-740.
- Kessler W, Numtip W, Volkel W, Seckin E, Csanady GA, Putz C, Klein D, Fromme H & Filser JG (2012) Kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in blood and of DEHP metabolites in urine of male volunteers after single ingestion of ring-deuterated DEHP. *Toxicology and applied pharmacology* 264(2):284-291.
- Khalil A, Parker M, Brown SE, Cevik SE, Guo LW, Jensen J, Olmsted A, Portman D, Wu H & Suvorov A (2017) Perinatal exposure to 2,2',4,4' -Tetrabromodiphenyl ether induces testicular toxicity in adult rats. *Toxicology* 389:21-30.
- Kickham P, Otton SV, Moore MM, Ikonomou MG & Gobas FA (2012) Relationship between biodegradation and sorption of phthalate esters and their metabolites in natural sediments. *Environmental toxicology and chemistry* 31(8):1730-1737.
- Kidokoro T, Matoba S, Hiramatsu R, Fujisawa M, Kanai-Azuma M, Taya C, Kurohmaru M, Kawakami H, Hayashi Y, Kanai Y & Yonekawa H (2005) Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice. *Developmental biology* 278(2):511-525.
- Kikuchi K, Shigeta S & Ishikawa T (2019) Depth measurement of molecular permeation using inclined confocal microscopy. *PLoS one* 14(3):e0214504.

- Kim JL, Elfman L, Mi Y, Wieslander G, Smedje G & Norback D (2007) Indoor molds, bacteria, microbial volatile organic compounds and plasticizers in schools--associations with asthma and respiratory symptoms in pupils. *Indoor air* 17(2):153-163.
- Kim JW, Isobe T, Muto M, Tue NM, Katsura K, Malarvannan G, Sudaryanto A, Chang KH, Prudente M, Viet PH, Takahashi S & Tanabe S (2014) Organophosphorus flame retardants (PFRs) in human breast milk from several Asian countries. *Chemosphere* 116:91-97.
- Kim SH, On JW, Pyo H, Ko KS, Won JC, Yang J & Park MJ (2018) Percentage fractions of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites: Association with obesity and insulin resistance in Korean girls. *PLoS one* 13(11):e0208081.
- Kim TH, Lee YJ, Lee E, Patra N, Lee J, Kwack SJ, Kim KB, Chung KK, Han SY, Han JY, Lee BM & Kim HS (2009) Exposure assessment of polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in umbilical cord blood of Korean infants. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 72(21-22):1318-1326.
- Klonisch T, Fowler PA & Hombach-Klonisch S (2004) Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Developmental biology* 270(1):1-18.
- Koch HM & Angerer J (2007) Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. *International journal of hygiene and environmental health* 210(1):9-19.
- Koch HM & Calafat AM (2009) Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 364(1526):2063-2078.
- Kojima K, Nakamura H, Komeya M, Yamanaka H, Makino Y, Okada Y, Akiyama H, Torikai N, Sato T, Fujii T, Kimura H & Ogawa T (2018) Neonatal testis growth recreated in vitro by two-dimensional organ spreading. *Biotechnology and bioengineering* 115(12):3030-3041.
- Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, Sato T, Yao M, Kimura H, Fujii T & Ogawa T (2017) Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. *Scientific reports* 7(1):15459.
- Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Fujii T & Ogawa T (2016) Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Scientific reports* 6:21472.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P & Lovell-Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351(6322):117-121.
- Kortenkamp A, Faust M, Scholze M & Backhaus T (2007) Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environmental health perspectives* 115 Suppl 1:106-114.
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD & Page DC (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(8):2474-2479.
- Kubwabo C, Rasmussen PE, Fan X, Kosarac I, Wu F, Zidek A & Kuchta SL (2013) Analysis of selected phthalates in Canadian indoor dust collected using household vacuum and standardized sampling techniques. *Indoor air* 23(6):506-514.

- Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD, Bathgate RA & Hsueh AJ (2002) INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *The Journal of biological chemistry* 277(35):31283-31286.
- Kwack SJ, Kim KB, Kim HS & Lee BM (2009) Comparative toxicological evaluation of phthalate diesters and metabolites in Sprague-Dawley male rats for risk assessment. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 72(21-22):1446-1454.
- Lambrot R, Muczynski V, Lecureuil C, Angenard G, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Frydman R, Habert R & Rouiller-Fabre V (2009) Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environmental health perspectives* 117(1):32-37.
- Lassonde G, Nasuhoglu D, Pan JF, Gaye B, Yargeau V & Delbes G (2015) Ozone treatment prevents the toxicity of an environmental mixture of estrogens on rat fetal testicular development. *Reprod Toxicol* 58:85-92.
- Lassarguere J, Livera G, Habert R & Jegou B (2003) Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 73(1):160-169.
- Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H & Creasy DM (2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicologic pathology* 30(4):524-533.
- Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F & Mazzeo P (2003) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environmental health perspectives* 111(14):1783-1785.
- Law RJ, Covaci A, Harrad S, Herzke D, Abdallah MA, Fernie K, Toms LM & Takigami H (2014) Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: status at the end of 2012. *Environment international* 65:147-158.
- Lawson KA & Hage WJ (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Foundation symposium* 182:68-84; discussion 84-91.
- LeBel GL & Williams DT (1983) Problems in collection of representative samples for determination of tributyoxyethyl phosphate in potable water. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 66(1):202-203.
- Lehmleer HJ, Liu B, Gadogbe M & Bao W (2018) Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013-2014. *ACS omega* 3(6):6523-6532.
- Lehraiki A, Racine C, Krust A, Habert R & Levacher C (2009) Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 111(2):372-382.
- Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X & Rao CV (2001) Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 15(1):184-200.
- Li H & Kim KH (2003) Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal and neonatal rat testis organ cultures. *Biology of reproduction* 69(6):1964-1972.
- Li H, Papadopoulos V, Vidic B, Dym M & Culty M (1997) Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology* 138(3):1289-1298.

- Li J, Yu N, Zhang B, Jin L, Li M, Hu M, Zhang X, Wei S & Yu H (2014a) Occurrence of organophosphate flame retardants in drinking water from China. *Water research* 54:53-61.
- Li L, Zhang T, Qin XS, Ge W, Ma HG, Sun LL, Hou ZM, Chen H, Chen P, Qin GQ, Shen W & Zhang XF (2014b) Exposure to diethylhexyl phthalate (DEHP) results in a heritable modification of imprint genes DNA methylation in mouse oocytes. *Molecular biology reports* 41(3):1227-1235.
- Li LH, Jester WF, Jr., Laslett AL & Orth JM (2000) A single dose of Di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decreases cyclin D2 expression. *Toxicology and applied pharmacology* 166(3):222-229.
- Li X, Sun H, Yao Y, Zhao Z, Qin X, Duan Y & Wang L (2018) Distribution of Phthalate Metabolites between Paired Maternal-Fetal Samples. *Environmental science & technology* 52(11):6626-6635.
- Li X, Wang Z, Jiang Z, Guo J, Zhang Y, Li C, Chung J, Folmer J, Liu J, Lian Q, Ge R, Zirkin BR & Chen H (2016) Regulation of seminiferous tubule-associated stem Leydig cells in adult rat testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(10):2666-2671.
- Livera G, Delbes G, Pairault C, Rouiller-Fabre V & Habert R (2006) Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell and tissue research* 324(3):507-521.
- Livera G, Rouiller-Fabre V, Valla J & Habert R (2000) Effects of retinoids on the meiosis in the fetal rat ovary in culture. *Molecular and cellular endocrinology* 165(1-2):225-231.
- Ly L, Chan D & Trasler JM (2015) Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline. *Seminars in cell & developmental biology* 43:96-105.
- Ma X, Dong Y, Matzuk MM & Kumar TR (2004) Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(49):17294-17299.
- Maag J, Lassen C, Brandt U, Kjølholt J, Molander L, Mikkelsen S & phthalates laaoats (2010) Identification and assessment of alternatives to selected phthalates. (Danish Ministry of Environment: Danish Environmental Protection Agency (EPA)).
- Mackintosh CE, Maldonado J, Hongwu J, Hoover N, Chong A, Ikonomou MG & Gobas FA (2004) Distribution of phthalate esters in a marine aquatic food web: comparison to polychlorinated biphenyls. *Environmental science & technology* 38(7):2011-2020.
- Maekawa M, Kamimura K & Nagano T (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology* 59(1):1-13.
- Magre S & Jost A (1991) Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *Journal of electron microscopy technique* 19(2):172-188.
- Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, Schmidt IM, Suomi AM, Virtanen HE, Petersen DV, Andersson AM, Toppari J & Skakkebaek NE (2006) Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environmental health perspectives* 114(2):270-276.

- Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C & Skinner MK (2013) Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one* 8(1):e55387.
- Manku G & Culty M (2015) Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. *Reproduction* 149(3):R139-157.
- Marchitti SA, LaKind JS, Naiman DQ, Berlin CM & Kenneke JF (2013) Improving infant exposure and health risk estimates: using serum data to predict polybrominated diphenyl ether concentrations in breast milk. *Environmental science & technology* 47(9):4787-4795.
- Marklund A, Andersson B & Haglund P (2005) Organophosphorus flame retardants and plasticizers in Swedish sewage treatment plants. *Environmental science & technology* 39(19):7423-7429.
- Martin LJ & Touaibia M (2020) Improvement of Testicular Steroidogenesis Using Flavonoids and Isoflavonoids for Prevention of Late-Onset Male Hypogonadism. *Antioxidants (Basel)* 9(3).
- Martinez-Carballo E, Gonzalez-Barreiro C, Sitka A, Scharf S & Gans O (2007) Determination of selected organophosphate esters in the aquatic environment of Austria. *The Science of the total environment* 388(1-3):290-299.
- Mayerhofer A, Lahr G, Seidl K, Eusterschulte B, Christoph A & Gratzl M (1996) The neural cell adhesion molecule (NCAM) provides clues to the development of testicular Leydig cells. *Journal of andrology* 17(3):223-230.
- McConnell M (2007) *Distribution of phthalate monoesters in an aquatic food web. School of Resource and Environmental Management Master of Resource Management Thesis Project Report No. 426.* (Simon Fraser University, Burnaby (BC)).
- McKee RH, El-Hawari M, Stoltz M, Pallas F & Lington AW (2002) Absorption, disposition and metabolism of di-isononyl phthalate (DINP) in F-344 rats. *Journal of applied toxicology : JAT* 22(5):293-302.
- Mead C & Handley JW (1998) Assessment of ready biodegradability CO₂ evolution test (modified Sturm test) of Amgard TBEP (Project No. 071/607). (Safepharm Laboratories Ltd, United Kingdom (Derby)).
- Meeker JD, Calafat AM & Hauser R (2009a) Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. *Journal of andrology* 30(3):287-297.
- Meeker JD, Johnson PI, Camann D & Hauser R (2009b) Polybrominated diphenyl ether (PBDE) concentrations in house dust are related to hormone levels in men. *The Science of the total environment* 407(10):3425-3429.
- Meeker JD & Stanley HM (2010) House Dust Concentrations of Organophosphate Flame Retardants in Relation to Hormone Levels and Semen Quality Parameters. *Environmental health perspectives* 118(3):318-323.
- Meinhardt A, Bacher M, Metz C, Bucala R, Wreford N, Lan H, Atkins R & Hedger M (1998) Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biology of reproduction* 59(2):371-378.
- Mendis SH, Meachem SJ, Sarraj MA & Loveland KL (2011) Activin A balances Sertoli and germ cell proliferation in the fetal mouse testis. *Biology of reproduction* 84(2):379-391.

- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N & Buehr M (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *The International journal of developmental biology* 37(3):407-415.
- Merlet J, Racine C, Moreau E, Moreno SG & Habert R (2007) Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9):3615-3620.
- Middendorff R, Davidoff M & Holstein AF (1993) Neuroendocrine marker substances in human Leydig cells--changes by disturbances of testicular function. *Andrologia* 25(5):257-262.
- Miller MF, Chernyak SM, Domino SE, Batterman SA & Loch-Carusio R (2012) Concentrations and speciation of polybrominated diphenyl ethers in human amniotic fluid. *The Science of the total environment* 417-418:294-298.
- Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL & Behringer RR (1996) Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes & development* 10(20):2577-2587.
- Miyabayashi K, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Baba T, Shima Y, Sugiyama N, Kitamura K & Morohashi K (2013) Aristaless related homeobox gene, Arx, is implicated in mouse fetal Leydig cell differentiation possibly through expressing in the progenitor cells. *PLoS one* 8(6):e68050.
- Moller R (1980) Arrangement and fine structure of lymphatic vessels in the human spermatic cord. *Andrologia* 12(6):564-576.
- Moreno SG, Attali M, Allemand I, Messiaen S, Fouchet P, Coffigny H, Romeo PH & Habert R (2010) TGFbeta signaling in male germ cells regulates gonocyte quiescence and fertility in mice. *Developmental biology* 342(1):74-84.
- Mortensen GK, Main KM, Andersson AM, Leffers H & Skakkebaek NE (2005) Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analytical and bioanalytical chemistry* 382(4):1084-1092.
- Mossadegh-Keller N, Gentek R, Gimenez G, Bigot S, Mailfert S & Sieweke MH (2017) Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. *The Journal of experimental medicine* 214(10):2829-2841.
- Müller A, Nielson E & Ladefoged O (2003) Report: Human exposure to selected phthalates in Denmark by Danish Veterinary and Food Administration. *FodevareRapport* 15.
- Mumford SL, Kim S, Chen Z, Gore-Langton RE, Boyd Barr D & Buck Louis GM (2015) Persistent organic pollutants and semen quality: The LIFE Study. *Chemosphere* 135:427-435.
- Murphy CJ, Stermer AR & Richburg JH (2014) Age- and species-dependent infiltration of macrophages into the testis of rats and mice exposed to mono-(2-Ethylhexyl) phthalate (MEHP). *Biology of reproduction* 91(1):18.
- Nakashima H, Matsunaga I & Miyano N (1993) Determination of tris (2-butoxyethyl) phosphate in textiles and household wax products by capillary gas chromatography. *Jpn J Toxicol Environ Health* 39(6):549-553.
- Nef S & Parada LF (1999) Cryptorchidism in mice mutant for Insl3. *Nature genetics* 22(3):295-299.
- Nes WD, Lukyanenko YO, Jia ZH, Quideau S, Howald WN, Pratum TK, West RR & Hutson JC (2000) Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology* 141(3):953-958.

- NICNAS (2008) *Diisononyl phthalate. Existing Chemical Hazard Assessment Report. Australian Government Department of Health and Ageing. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme.*
http://www.nicnas.gov.au/data/assets/pdf_file/0004/4972/DINP-hazard-assessment.pdf.
- O'Grady DP, Howard PH & Werner AF (1985) Activated sludge biodegradation of 12 commercial phthalate esters. *Applied and environmental microbiology* 49(2):443-445.
- O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM & Huhtaniemi I (1998) Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139(3):1141-1146.
- O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Heikkila M, Vainio S & McMahon AP (2000) Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis--androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal leydig cells. *Endocrinology* 141(7):2631-2637.
- Odeh HM, Kleinguetl C, Ge R, Zirkin BR & Chen H (2014) Regulation of the proliferation and differentiation of Leydig stem cells in the adult testis. *Biology of reproduction* 90(6):123.
- OECD (2009) *The 2007 OECD List of High Production Volume Chemicals*. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD (2010) *Workshop report on OECD countries activities regarding testing, assessment and management of endocrine disruptors*. Organisation for Economic Co-operation and Development. 239 p
- OECD (2012) *Detailed review paper on the state of the science on novel in vitro and in vivo screening and testing methods and endpoints for evaluating endocrine disruptors*. Organisation for Economic Cooperation and Development. 213 p.
- OEHHA (2013) *Evidence on the carcinogenicity of diisononyl phthalate (DINP). Reproductive and Cancer Hazard Assessment Branch. California Environmental Protection Agency. Office of Environmental Health Hazard Assessment.*
http://www.oehha.ca.gov/Prop65/hazard_ident/pdf_zip/DINP_HID100413.pdf.
- Ohta S, Ishizuka D, Nishimura H, Nakao T, Aozasa O, Shimidzu Y, Ochiai F, Kida T, Nishi M & Miyata H (2002) Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables, and meats and levels in human milk of nursing women in Japan. *Chemosphere* 46(5):689-696.
- Ormond G, Nieuwenhuijsen MJ, Nelson P, Toledano MB, Iszatt N, Geneletti S & Elliott P (2009) Endocrine disruptors in the workplace, hair spray, folate supplementation, and risk of hypospadias: case-control study. *Environmental health perspectives* 117(2):303-307.
- Orn U & Klasson-Wehler E (1998) Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in rat and mouse. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 28(2):199-211.
- Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ & Gray LE, Jr. (2000) The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 58(2):339-349.
- Patisaul HB, Roberts SC, Mabrey N, McCaffrey KA, Gear RB, Braun J, Belcher SM & Stapleton HM (2013) Accumulation and endocrine disrupting effects of the flame retardant mixture Firemaster(R) 550 in rats: an exploratory assessment. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 27(2):124-136.

- Pelletier G, Rigden M, Wang GS, Caldwell D, Siddique S, Leingartner K, Kosarac I, Cakmak S & Kubwabo C (2020) Comparison of tris(2-ethylhexyl) phosphate and di(2-ethylhexyl) phosphoric acid toxicities in a rat 28-day oral exposure study. *Journal of applied toxicology* : JAT 40(5):600-618.
- Peschansky VJ & Wahlestedt C (2014) Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 9(1):3-12.
- Phillips AL, Hammel SC, Konstantinov A & Stapleton HM (2017) Characterization of Individual Isopropylated and tert-Butylated Triarylphosphate (ITP and TBPP) Isomers in Several Commercial Flame Retardant Mixtures and House Dust Standard Reference Material SRM 2585. *Environmental science & technology* 51(22):13443-13449.
- Pierucci-Alves F, Clark AM & Russell LD (2001) A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis. *Biology of reproduction* 65(5):1392-1402.
- Plant TM, Zeleznik AJ & (Eds.). (2014) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 4th Edition*. Academic Press. 2684 p
- Pointis G & Mahoudeau JA (1977) Responsiveness of foetal mouse testis to gonadotrophins at various times during sexual differentiation. *The Journal of endocrinology* 74(1):149-150.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E, Zeitlinger J, Lewitter F, Gifford DK & Young RA (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122(4):517-527.
- Prince FP (1990) Ultrastructural evidence of mature Leydig cells and Leydig cell regression in the neonatal human testis. *The Anatomical record* 228(4):405-417.
- Pugh G, Jr., Isenberg JS, Kamendulis LM, Ackley DC, Clare LJ, Brown R, Lington AW, Smith JH & Klaunig JE (2000) Effects of di-isononyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 56(1):181-188.
- Radford EJ, Ito M, Shi H, Corish JA, Yamazawa K, Isganaitis E, Seisenberger S, Hore TA, Reik W, Erkek S, Peters A, Patti ME & Ferguson-Smith AC (2014) In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science* 345(6198):1255903.
- Rahman F, Langford KH, Scrimshaw MD & Lester JN (2001) Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *The Science of the total environment* 275(1-3):1-17.
- Rathke C, Baarends WM, Awe S & Renkawitz-Pohl R (2014) Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1839(3):155-168.
- Ravnik SE, Rhee K & Wolgemuth DJ (1995) Distinct patterns of expression of the D-type cyclins during testicular development in the mouse. *Developmental genetics* 16(2):171-178.
- Rebourcet D, Darbey A, Monteiro A, Soffientini U, Tsai YT, Handel I, Pitetti JL, Nef S, Smith LB & O'Shaughnessy PJ (2017) Sertoli Cell Number Defines and Predicts Germ and Leydig Cell Population Sizes in the Adult Mouse Testis. *Endocrinology* 158(9):2955-2969.
- Reik W, Dean W & Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293(5532):1089-1093.
- Remberger M, Andersson J, Palm-Cousins A, Kaj L, Ekheden Y, Dusan B, Brorstrom-Lunden E & IVL CI (2005) Results from the Swedish National Screening Programme 2004 — subreport 1: adipates. IVL. (Swedish Environmental Research Institute).

).

- Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N & Mornagui B (2014) Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment international* 64:83-90.
- Richburg JH & Boekelheide K (1996) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicology and applied pharmacology* 137(1):42-50.
- Rigby PJ & Goldie RG (1999) Confocal microscopy in biomedical research. *Croatian medical journal* 40(3):346-352.
- Rochester JR (2013) Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 42:132-155.
- Rodemer-Lenz E (1989) On cell contribution to gonadal soma formation in quail-chick chimeras during the indifferent stage of gonadal development. *Anatomy and embryology* 179(3):237-242.
- Rouiller-Fabre V, Lecref L, Gautier C, Saez JM & Habert R (1998) Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 139(6):2926-2934.
- Rouiller-Fabre V, Levacher C, Pairault C, Racine C, Moreau E, Olaso R, Livera G, Migrenne S, Delbes G & Habert R (2003) Development of the foetal and neonatal testis. *Andrologia* 35(1):79-83.
- Ruzicková J, Raclavská H, Raclavský K & Juchelková V (2016) Phthalates in PM2.5 airborne particles in the Moravian-Silesian Region, Czech Republic. *7 Perspectives in Science*:178-183.
- Rwigemera A, Joao F & Delbes G (2017) Fetal testis organ culture reproduces the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes. *Epigenetics & chromatin* 10:19.
- Schechter A, Papke O, Tung KC, Staskal D & Birnbaum L (2004) Polybrominated diphenyl ethers contamination of United States food. *Environmental science & technology* 38(20):5306-5311.
- Schechter A, Pavuk M, Papke O, Ryan JJ, Birnbaum L & Rosen R (2003) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers' milk. *Environmental health perspectives* 111(14):1723-1729.
- Schepers G, Wilson M, Wilhelm D & Koopman P (2003) SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *The Journal of biological chemistry* 278(30):28101-28108.
- SCHER (2008) *Opinion on phthalates in school supplies*. Brussels (BE): European Commission, Health & Consumer Protection Directorate. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_106.pdf.
- Schettler T (2006) Human exposure to phthalates via consumer products. *International journal of andrology* 29(1):134-139; discussion 181-135.
- Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL & Capel B (2000) Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* 127(1):65-73.
- Scott HM, Mason JI & Sharpe RM (2009) Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocrine reviews* 30(7):883-925.

- Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M & Matsui Y (2005) Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Developmental biology* 278(2):440-458.
- Sharpe RM & Skakkebaek NE (2008) Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertility and sterility* 89(2 Suppl):e33-38.
- Shi Z, Jiao Y, Hu Y, Sun Z, Zhou X, Feng J, Li J & Wu Y (2013) Levels of tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecanes and polybrominated diphenyl ethers in human milk from the general population in Beijing, China. *The Science of the total environment* 452-453:10-18.
- Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, Baba T, Matsuzaki S, Shishido Y, Akiyama H, Tachibana T, Tsutsui K & Morohashi K (2013) Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. *Mol Endocrinol* 27(1):63-73.
- Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ & Weinberg RA (1996) Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 384(6608):470-474.
- Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, Lafleur C, Cohen T, Xia J, Suderman M, Hallett M, Trasler J, Peters AH & Kimmins S (2015) Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science* 350(6261):aab2006.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E & Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16(5):972-978.
- Skinner MK (2008) What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reprod Toxicol* 25(1):2-6.
- Smith LB & Walker WH (2015) Hormone signaling in the testis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 4th ed*, Plant TM & Zeleznik AJ (Édit.) Academic Press, San Diego.
- Sonnenschein C, Olea N, Pasanen ME & Soto AM (1989) Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens. *Cancer research* 49(13):3474-3481.
- Specht IO, Toft G, Hougaard KS, Lindh CH, Lenters V, Jonsson BA, Heederik D, Giwercman A & Bonde JP (2014) Associations between serum phthalates and biomarkers of reproductive function in 589 adult men. *Environment international* 66:146-156.
- Stanley E, Lin CY, Jin S, Liu J, Sottas CM, Ge R, Zirkin BR & Chen H (2012) Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells. *Endocrinology* 153(10):5002-5010.
- Stapleton HM, Allen JG, Kelly SM, Konstantinov A, Klosterhaus S, Watkins D, McClean MD & Webster TF (2008) Alternate and new brominated flame retardants detected in U.S. house dust. *Environmental science & technology* 42(18):6910-6916.
- Stapleton HM, Brazil B, Holbrook RD, Mitchelmore CL, Benedict R, Konstantinov A & Potter D (2006) In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environmental science & technology* 40(15):4653-4658.
- Stapleton HM, Klosterhaus S, Keller A, Ferguson PL, van Bergen S, Cooper E, Webster TF & Blum A (2011) Identification of flame retardants in polyurethane foam collected from baby products. *Environmental science & technology* 45(12):5323-5331.

- Staskal DF, Diliberto JJ, DeVito MJ & Birnbaum LS (2005) Toxicokinetics of BDE 47 in female mice: effect of dose, route of exposure, and time. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 83(2):215-223.
- Stermer AR, Murphy CJ, Ghaffari R, Di Bona KR, Voss JJ & Richburg JH (2017) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced Sertoli cell injury stimulates the production of pro-inflammatory cytokines in Fischer 344 rats. *Reprod Toxicol* 69:150-158.
- Stringer R, Labunska I, Santillo D, Johnston P, Siddorn J & Stephenson A (2000) Concentrations of phthalate esters and identification of other additives in PVC children's toys. *Environ Sci Pollut Res Int* 7(1):27-36.
- Su DM, Feng Y, Wang L, Wu YL, Ge RS & Ma X (2018) Influence of fetal Leydig cells on the development of adult Leydig cell population in rats. *The Journal of reproduction and development* 64(3):223-231.
- Sundkvist AM, Olofsson U & Haglund P (2010) Organophosphorus flame retardants and plasticizers in marine and fresh water biota and in human milk. *Journal of environmental monitoring : JEM* 12(4):943-951.
- Svingen T, Francois M, Wilhelm D & Koopman P (2012) Three-dimensional imaging of Prox1-EGFP transgenic mouse gonads reveals divergent modes of lymphangiogenesis in the testis and ovary. *PLoS one* 7(12):e52620.
- Swan SH (2008) Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environmental research* 108(2):177-184.
- Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S & Teague JL (2005) Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental health perspectives* 113(8):1056-1061.
- Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RH & Redmon JB (2015) First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Hum Reprod* 30(4):963-972.
- Swerdlow R, Wang C & Sinha Hikim A (2000) Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in men. in *Hormones, Brain and Behavior*, Édité Pfaff DW (Elsevier, Acad. Press), p 1-36.
- Takeuchi S, Kojima H, Saito I, Jin K, Kobayashi S, Tanaka-Kagawa T & Jinno H (2014) Detection of 34 plasticizers and 25 flame retardants in indoor air from houses in Sapporo, Japan. *The Science of the total environment* 491-492:28-33.
- Tang WY, Morey LM, Cheung YY, Birch L, Prins GS & Ho SM (2012) Neonatal exposure to estradiol/bisphenol A alters promoter methylation and expression of Nsbp1 and Hpcal1 genes and transcriptional programs of Dnmt3a/b and Mbd2/4 in the rat prostate gland throughout life. *Endocrinology* 153(1):42-55.
- Themmen APN & Huhtaniemi IT (2000) Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine reviews* 21(5):551-583.
- Thisse B & Thisse C (2014) In situ hybridization on whole-mount zebrafish embryos and young larvae. *Methods Mol Biol* 1211:53-67.
- Thomas JA & Thomas MJ (1984) Biological effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and other phthalic acid esters. *Critical reviews in toxicology* 13(4):283-317.

- Thuillier R, Mazer M, Manku G, Boisvert A, Wang Y & Culty M (2010) Interdependence of platelet-derived growth factor and estrogen-signaling pathways in inducing neonatal rat testicular gonocytes proliferation. *Biology of reproduction* 82(5):825-836.
- Thurston SW, Mendiola J, Bellamy AR, Levine H, Wang C, Sparks A, Redmon JB, Drobnis EZ & Swan SH (2016) Phthalate exposure and semen quality in fertile US men. *Andrology* 4(4):632-638.
- Tomiyaama H, Hutson JM, Truong A & Agoulnik AI (2003) Transabdominal testicular descent is disrupted in mice with deletion of insulinlike factor 3 receptor. *Journal of pediatric surgery* 38(12):1793-1798.
- Trasler JM (2009) Epigenetics in spermatogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 306(1-2):33-36.
- Troisi R, Hyer M, Hatch EE, Titus-Ernstoff L, Palmer JR, Strohsnitter WC, Herbst AL, Adam E & Hoover RN (2013) Medical conditions among adult offspring prenatally exposed to diethylstilbestrol. *Epidemiology* 24(3):430-438.
- Trowell OA (1959) The culture of mature organs in a synthetic medium. *Experimental cell research* 16(1):118-147.
- Tung KS, Harakal J, Qiao H, Rival C, Li JC, Paul AG, Wheeler K, Pramoongjago P, Grafer CM, Sun W, Sampson RD, Wong EW, Reddi PP, Deshmukh US, Hardy DM, Tang H, Cheng CY & Goldberg E (2017) Egress of sperm autoantigen from seminiferous tubules maintains systemic tolerance. *The Journal of clinical investigation* 127(3):1046-1060.
- Tung PS, Skinner MK & Fritz IB (1984) Cooperativity between Sertoli cells and peritubular myoid cells in the formation of the basal lamina in the seminiferous tubule. *Annals of the New York Academy of Sciences* 438:435-446.
- Turner BM (1998) Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 54(1):21-31.
- US EPA (2004) *Tetrabromodiphenyl ether*. *Substance Registry System*. Washington, DC, Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/srs>.
- US EPA (2006) *Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Project Plan*. U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/proj-plan32906a.pdf>.
- US EPA (2008) *Supporting Documents for Initial Risk-Based Prioritization of High Production Volume Chemicals: Screening Level Hazard Characterization – Diesters Category*. Environmental Protection Agency, Washington (DC).
- US EPA (2009) *Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) - Action Plan*. U.S. Environmental Protection Agency. 16 p.
- US EPA (2012) *Phthalates Action Plan*. U.S. Environmental Protection Agency. 16 p. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/phthalates_actionplan_revised_2012-03-14.pdf?_ga=2.204344595.2002331224.1512086400-1269418524.1512086400.
- US EPA (2014) *Technical Fact Sheet. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Polybrominated Biphenyls (PBBs)*. U.S. Environmental Protection Agency.
- US EPA (2015) *Flame retardants used in flexible polyurethane foam: An alternatives assessment update*. U.S. Environmental Protection Agency.

- van den Driesche S, Kilcoyne KR, Wagner I, Rebourcet D, Boyle A, Mitchell R, McKinnell C, Macpherson S, Donat R, Shukla CJ, Jorgensen A, Meyts ER, Skakkebaek NE & Sharpe RM (2017) Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. *JCI insight* 2(6):e91204.
- Van den Steen E, Covaci A, Jaspers VL, Dauwe T, Voorspoels S, Eens M & Pinxten R (2007) Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Environ Pollut* 148(2):648-653.
- van der Veen I & de Boer J (2012) Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere* 88(10):1119-1153.
- van der Ven LT, van de Kuil T, Verhoef A, Leonards PE, Slob W, Canton RF, Germer S, Hamers T, Visser TJ, Litens S, Hakansson H, Fery Y, Schrenk D, van den Berg M, Piersma AH & Vos JG (2008) A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of a purified technical pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) mixture in Wistar rats. *Toxicology* 245(1-2):109-122.
- van Dissel-Emiliani FM, de Boer-Brouwer M, Spek ER, van der Donk JA & de Rooij DG (1993) Survival and proliferation of rat gonocytes in vitro. *Cell and tissue research* 273(1):141-147.
- van Esch GJ (2000) *Flame retardants: tris(2-butoxyethyl) phosphate, tris(2-ethylhexyl) phosphate and tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium salts*. Netherlands (Bilthoven).
- van Pee KH & Unversucht S (2003) Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere* 52(2):299-312.
- Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG & Schedl A (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature genetics* 28(3):216-217.
- Vo TT, Jung EM, Dang VH, Yoo YM, Choi KC, Yu FH & Jeung EB (2009) Di-(2 ethylhexyl) phthalate and flutamide alter gene expression in the testis of immature male rats. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 7:104.
- Wade MG, Kawata A, Rigden M, Caldwell D & Holloway AC (2019) Toxicity of Flame Retardant Isopropylated Triphenyl Phosphate: Liver, Adrenal, and Metabolic Effects. *International journal of toxicology* 38(4):279-290.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W & Scherer G (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79(6):1111-1120.
- Waszak I, Dabrowska H & Gora A (2012) Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in flounder (*Platichthys flesus*) in the southern Baltic Sea. *Marine environmental research* 79:132-141.
- Waterman SJ, Keller LH, Trimmer GW, Freeman JJ, Nikiforov AI, Harris SB, Nicolich MJ & McKee RH (2000) Two-generation reproduction study in rats given di-isononyl phthalate in the diet. *Reprod Toxicol* 14(1):21-36.
- Welsh M, Saunders PT, Atanassova N, Sharpe RM & Smith LB (2009) Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(12):4218-4230.

- Welsh M, Saunders PTK, Fisker M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB & Sharpe RM (2008) Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *Journal of Clinical Investigation* 118(4):1479-1490.
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM & vom Saal FS (2003) Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental health perspectives* 111(8):994-1006.
- Weschler CJ (1984) Indoor-outdoor relationships for nonpolar constituents of aerosol particle. *Environmental science & technology* 18(9):648-652.
- WHO (1994) *Brominated Diphenyl Ethers*.
- WHO (2013) *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals*. United Nations Environment Programme and the World Health Organization. 289 p.
- WHO/IPCS (2002) *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. Geneva, World Health Organisation and International Programme on Chemical Safety. 133 p. www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en.
- Wieslander G, Norback D, Bjornsson E, Janson C & Boman G (1997) Asthma and the indoor environment: the significance of emission of formaldehyde and volatile organic compounds from newly painted indoor surfaces. *International archives of occupational and environmental health* 69(2):115-124.
- Wilhelm D, Palmer S & Koopman P (2007) Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological reviews* 87(1):1-28.
- Williams DT & Blanchfield BJ (1975) The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate-7-14 C in the rat. *Journal of agricultural and food chemistry* 23(5):854-858.
- Wilson VS, Lambright C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G & Gray LE, Jr. (2004) Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. *Toxicology letters* 146(3):207-215.
- Winnall WR & Hedger MP (2013) Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: a new regulatory model. *Journal of reproductive immunology* 97(2):147-158.
- Wittassek M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Schafer SD, Klockenbusch W, Dobler L, Günsel AK, Müller A & Wiesmüller GA (2009) Fetal exposure to phthalates--a pilot study. *International journal of hygiene and environmental health* 212(5):492-498.
- 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 analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis* 26(3):803-824.
- Wu S, Zhu J, Li Y, Lin T, Gan L, Yuan X, Xiong J, Liu X, Xu M, Zhao D, Ma C, Li X & Wei G (2010) Dynamic epigenetic changes involved in testicular toxicity induced by di-2-(ethylhexyl) phthalate in mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 106(2):118-123.
- Xue C, Pollock J, Schmidt HH, Ward SM & Sanders KM (1994) Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *Journal of the autonomic nervous system* 49(1):1-14.
- Yang C, Harris SA, Jantunen LM, Siddique S, Kubwabo C, Tsirlin D, Latifovic L, Fraser B, St-Jean M, De La Campa R, You H, Kulka R & Diamond ML (2019) Are cell phones an

- indicator of personal exposure to organophosphate flame retardants and plasticizers? *Environment international* 122:104-116.
- Yao H, Whoriskey W & Capel B (2002) Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes & development* 16:1433-1440.
- Yao HH, Aardema J & Holthusen K (2006) Sexually dimorphic regulation of inhibin beta B in establishing gonadal vasculature in mice. *Biology of reproduction* 74(5):978-983.
- Yasuda H (1980) Concentration of organic phosphorus pesticides in the atmosphere above the Dogo and Ozun Basin. *J Chem Soc Jpn* 4:645-653.
- Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA & Zhao GQ (2000) Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14(7):1053-1063.
- Ying Y & Zhao GQ (2001) Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Developmental biology* 232(2):484-492.
- Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J & Huhtaniemi I (2001) Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 15(1):172-183.
- Zhang Z, Zhang X, Sun Z, Dong H, Qiu L, Gu J, Zhou J, Wang X & Wang SL (2013) Cytochrome P450 3A1 mediates 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether-induced reduction of spermatogenesis in adult rats. *PloS one* 8(6):e66301.
- Zhao GQ & Garbers DL (2002) Male germ cell specification and differentiation. *Developmental cell* 2(5):537-547.
- Zhao Y, Ruan X, Li Y, Yan M & Qin Z (2013) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in aborted human fetuses and placental transfer during the first trimester of pregnancy. *Environmental science & technology* 47(11):5939-5946.
- Zheng X, Qiao L, Covaci A, Sun R, Guo H, Zheng J, Luo X, Xie Q & Mai B (2017) Brominated and phosphate flame retardants (FRs) in indoor dust from different microenvironments: Implications for human exposure via dust ingestion and dermal contact. *Chemosphere* 184:185-191.
- Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, Engel W & Adham IM (1999) Targeted disruption of the Insl3 gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol* 13(5):681-691.
- Zota AR, Linderholm L, Park JS, Petreas M, Guo T, Privalsky ML, Zoeller RT & Woodruff TJ (2013) Temporal comparison of PBDEs, OH-PBDEs, PCBs, and OH-PCBs in the serum of second trimester pregnant women recruited from San Francisco General Hospital, California. *Environmental science & technology* 47(20):11776-11784.