

35

Études chez les animaux mâles

De nombreuses études de toxicologie ont été publiées sur les phtalates, notamment le DEHP et le DBP. Des études de référence ont permis la définition de la dose journalière tolérable (DJT) pour ces substances. La plupart des études ont été menées avec des doses élevées, sur des périodes d'exposition variables et par voie orale (gavage) chez le rat. Des effets ont été recherchés pour de nombreux paramètres phénotypiques. Quelques études ont été réalisées chez des primates non humains.

Études de références pour détermination de la DJT

Quatre études de références ont servi pour les évaluations de risques liés au DBP et au DEHP par la CPSC et l'EFSA (David et coll., 2000 ; Wolfe et Layton, 2003 ; Lee et coll., 2004 ; Mahood et coll., 2007). Pour le DBP, l'étude de Lee et coll. (2004) et celle de Mahood et coll. (2007) ont adressé les effets d'une exposition *in utero* et/ou postnatale respectivement chez le rat Sprague-Dawley et Wistar. Pour le DEHP, l'étude de David et coll. (2000) a utilisé des rats Fisher âgés de 4 semaines et exposés pendant 2 ans, et celle de Wolfe et Layton (2003) a documenté les effets du DEHP sur plusieurs générations chez le rat Sprague-Dawley.

Dans l'étude de David et coll. (2000), les rats sont exposés à des doses de DEHP de 100 à 12 500 mg/kg de nourriture à partir de la puberté et pendant 104 semaines. Seule la dose la plus forte diminue le poids testiculaire et induit une aspermatogenèse bilatérale (dès 78 semaines). La dose de 500 mg/kg augmente la survenue d'aspermatogenèse chez les animaux âgés (104 semaines). La dose de 500 mg/kg (29-36 mg/kg/j) est considérée comme NOAEL.

L'étude multigénérationnelle de Wolfe et Layton (2003) identifie une toxicité testiculaire dès la dose de 300 mg/kg (23 mg/kg/j pour F0 et 14 mg/kg/j pour F1 et F2) de DEHP dans la nourriture. À cette dose, une atteinte testiculaire est notée chez les animaux des générations F1 et F2. Une pathologie des organes sexuels mâles accessoires (vésicules séminales, prostate, épидидyme) est également associée à cette dose. Une baisse de la fertilité n'est rapportée que pour les doses de 7 500 mg/kg (F1, F2 et F3) et 10 000 mg/kg (F0 et F1) selon les paramètres analysés (spermatogenèse, sex ratio des descendants,

nombre de petits par portée...). La dose sans effet pour la toxicité testiculaire proposée est de 100 mg/kg (8 mg/kg/j en F0 et 5 mg/kg/j en F1 et F2).

L'étude de Lee et coll. (2004) concerne les effets d'une exposition au DBP de 20 à 10 000 mg/kg de nourriture pendant la période périnatale du 15^e jour de gestation au sevrage, au 21^e jour postnatal. À la dose de 2 000 mg/kg, une agrégation des cellules de Leydig et une perte de cellules germinales sont notées respectivement au 21^e jour et à 11 semaines (adulte). Une atteinte épидидymaire est également rapportée. Ces effets se retrouvent chez quelques animaux dès la dose de 200 mg/kg. Un retard de développement des spermatoctes est évident au 21^e jour dès la dose de 20 mg/kg. À 11 semaines, le poids du testicule, de l'épididyme, de la prostate ou des vésicules séminales ne semble pas affecté.

L'étude du groupe de Sharpe (Mahood et coll., 2007) recense différents paramètres précédemment quantifiés dans les travaux de ce groupe et affectés par une exposition strictement foetale (du jour 13 à 21) tout au long de l'organogenèse testiculaire en réponse à différentes doses de DBP de 4 à 500 mg/kg/j administrées par gavage. Les paramètres précoces tels que la formation d'agrégat de cellules de Leydig, l'apparition de gonocytes multinucléés et la sécrétion de testostérone analysés en fin de vie foetale (jour 21) sont altérés significativement dès la dose de 100 mg/kg/j. Des paramètres mesurés plus tardivement (adulte) tels que les mesures de fertilité et le taux de cryptorchidisme ne sont affectés qu'à la dose de 500 mg/kg/j. Cette étude révèle également que la disparition de l'épithélium germinale dans certains tubules et l'apparition de foyer dysgénésique (agrégat mal ordonné de plusieurs types cellulaires différents) est retrouvée dans des testicules scrotaux dès la dose de 100 mg/kg/j. Pour plusieurs paramètres, une tendance (non significative) est observée à la dose de 20 mg/kg/j peut-être du fait du nombre modéré de portées analysées (5 à 9). Cette étude est très détaillée et axée spécifiquement autour du développement testiculaire. Les auteurs proposent que les paramètres mesurés en fin de vie foetale soient les meilleurs indices reflétant une exposition aux phtalates.

Études chez les rongeurs et lagomorphes

La plupart des études chez les rongeurs ont été menées avec des doses élevées. De nombreux effets ont été recherchés sur des périodes d'exposition variables et avec différents phtalates. Les tableaux 35.I et 35.II résument les principaux paramètres phénotypiques affectés avec les deux phtalates DEHP et DBP.

La très grande majorité des études chez l'animal ont été réalisées par gavage par voie orale durant la gestation et rapportent des effets sur les trois principaux types cellulaires du testicule : cellules de Leydig, cellules de Sertoli et cellules germinales.

Tableau 35.I : Paramètres phénotypiques affectés dans les études pour le DEHP

Paramètres phénotypiques	Espèces/Lignée	Doses (mg/kg/j)/Périodes	Références
Modifications des paramètres morphologiques	Rat	10-900	Gray et coll., 2000
Poids testicules, épididymes, prostate, vésicules séminales	Sprague-Dawley	Gestation/postnatal	Higuchi et coll., 2003
	Lapin Dutch-belted		Botelho et coll., 2009
	Rat Wistar		Gray et coll., 2009
	Rat Long-Evans		Noriega et coll., 2009
	Rat Sprague-Dawley castré + testostérone		Vo et coll., 2009b
			Lee et Koo, 2007
Modification des paramètres spermatiques	Rat	10-900	Higuchi et coll., 2003
Concentration	Sprague-Dawley	Gestation/postnatal	Vo et coll., 2009a
Rendement	Lapin Dutch-belted		Noriega et coll., 2009
Mobilité %			
Anomalies	Rat	10-1 250	Gray et coll., 2000
Distance anogénitale	Sprague-Dawley	Gestation/postnatal	Howdeshell et coll., 2007
Cryptorchidie	Rat Long-Evans		Lin et coll., 2008
Hypospadias			Culty et coll., 2008
Âge à la séparation du prépuce			Vo et coll., 2009a
			Gray et coll., 2009
			Noriega et coll., 2009
			Vo et coll., 2009b
Altérations des taux hormonaux	Rat	10-1 250	Akingbemi et coll., 2001
Testostérone	Sprague-Dawley	Gestation/postnatal	Higuchi et coll., 2003
LH, FSH, E2, Insl3	Rat Long-Evans		Borch et coll., 2004
	Rat Wistar		Akingbemi et coll., 2004
	Lapin Dutch-belted		Howdeshell et coll., 2007
			Lin et coll., 2008
			Culty et coll., 2008
			Vo et coll., 2009a
			Vo et coll., 2009b
			Noriega et coll., 2009

Tableau 35.II : Paramètres phénotypiques affectés dans les études pour le DBP

Paramètres phénotypiques	Espèces/Lignée	Doses (mg/kg/j)/Périodes	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids testicules, épididymes, prostate, vésicules séminales	Rat Long-Evans (ORL) Rat Wistar Rat Sprague-Dawley Rat Sprague-Dawley (hypothyroïdien/PTU) Rat Sprague-Dawley castré + testostérone	50-750 Gestation/postnatal	Johnson et coll., 2008 Zhu et coll., 2009 Drake et coll., 2009 Martino-Andrade et coll., 2009 Welsh et coll., 2009 MacLeod et coll., 2010 Saillenfait et coll., 2008 Lee et coll., 2008 Lee et Koo, 2007 Boekelheide et coll., 2009
Modification des paramètres spermatiques Concentration Rendement Mobilité %	Rat Wistar	500-1 500 Adulte	Nair et coll., 2008
Anomalies Distance anogénitale Cryptorchidie Hypospadias Âge à la séparation du prépuce	Rat Wistar Rat Sprague-Dawley	100-750 Gestation	Fisher et coll., 2003 Howdeshell et coll., 2007 Saillenfait et coll., 2008 Scott et coll., 2008 Martino-Andrade et coll., 2009 Welsh et coll., 2009 Struve et coll., 2009 Zhu et coll., 2009 Scarano et coll., 2009 Drake et coll., 2009 MacLeod et coll., 2010
Altérations des taux hormonaux Testostérone LH, FSH, Insl3	Rat Wistar Rat Sprague-Dawley	100-500-1 500 Gestation/postnatal Adulte	Fisher et coll., 2003 Howdeshell et coll., 2007 Scott et coll., 2008 Nair et coll., 2008 Johnson et coll., 2008 Drake et coll., 2009 Struve et coll., 2009 Martino-Andrade et coll., 2009 Alam et coll., 2010 MacLeod et coll., 2010

Effets *in utero* sur le testicule fœtal

De nombreux travaux signalent de manière cohérente : une agrégation des cellules de Leydig et la diminution de la production de testostérone et d'Insl3 de ces cellules ; une augmentation du diamètre des cordons testiculaires ; l'apparition de gonocytes (cellules germinales fœtales) multinucléés. Notons immédiatement que le mode typique d'administration des phtalates, sous forme de bolus quotidiens par gavage par voie orale ou intubation gastrique, produit à peu près les mêmes effets que l'exposition via la nourriture à dose équivalente, au moins pour le DBP (Struve et coll., 2009). Par ailleurs, il a été démontré que le DEHP passe efficacement la barrière placentaire et atteint les gonades chez le rat en administrant du DEHP radioactif par voie orale aux rates gestantes (Stroheker et coll., 2006). On estime que de 2 à 5 % de la radioactivité totale du fœtus se retrouvent au niveau des gonades.

Effets sur les cellules de Leydig

Concernant les cellules de Leydig, une diminution de la production de testostérone testiculaire en fin de vie fœtale est rapportée de manière quasi-systématique chez le rat. Ainsi, chez le rat de lignée Wistar, l'administration de 500 mg/kg/j de DBP à la femelle gestante diminue la testostérone intra-testiculaire du fœtus de manière drastique (Fisher et coll., 2003 ; Scott et coll., 2008 ; Drake et coll., 2009 ; Martino-Andrade et coll., 2009 ; MacLeod et coll., 2010). L'exposition *in utero* au DINP (750 mg/kg/j), au DEHP (750 mg/kg/j), ou au DIBP (600 mg/kg/j) induit un effet semblable (Borch et coll., 2004 ; Boberg et coll., 2008). Des doses moindres de DBP (<100 mg/kg/j) ou de DEHP (150 mg/kg/j) n'inhibent pas de manière visible la production de testostérone durant la vie fœtale (Drake et coll., 2009 ; Martino-Andrade et coll., 2009). Cependant, l'administration simultanée de DBP (100 mg/kg/j) et de DEHP (150 mg/kg/j) induit des effets semblables à une forte dose de DBP (Martino-Andrade et coll., 2009). Chez le rat de lignée Long-Evans, le DEHP (750 mg/kg/j) administré du 2^e au 20^e jour de la gestation inhibe également la sécrétion de testostérone fœtale au jour 21 (Lin et coll., 2008). Vo et coll. (2009a) indiquent un effet semblable chez le rat de lignée Sprague-Dawley lors d'un gavage au DEHP (500 mg/kg/j) du 11^e au 20^e jour de la gestation. Des doses plus faibles de DEHP (dès 117 mg/kg/j) diminuent également la sécrétion de testostérone et de DHT chez le rat Sprague-Dawley. De même, Struve et coll. (2009) démontrent que le DBP mélangé à l'alimentation des femelles gestante du 12^e au 19^e jour de la gestation diminue la testostérone intra-testiculaire dès les doses équivalentes à 100 mg/kg/j chez le rat Sprague-Dawley. Toujours dans cette lignée, le DBP ou le DEHP à la dose de 500 mg/kg/j chacun diminuent la sécrétion de testostérone et leurs effets peuvent se cumuler lorsqu'ils sont administrés du 14^e au 18^e jour de gestation (Howdeshell et coll., 2007). Il semble donc largement prouvé que le DBP et/ou le DEHP administré aux rates gestantes inhibe l'activité stéroïdogène du testicule fœtal dans diverses lignées de rats. La lignée Sprague-Dawley apparaît comme plus sensible que la lignée Wistar.

Le groupe de Richard Sharpe a longuement étudié le modèle du rat Wistar gavé avec 500 mg/kg/j de DBP pendant la gestation. Ces auteurs ont ainsi précisé la fenêtre pendant laquelle le DBP réduit la production de testostérone fœtale. Ainsi, la testostéronémie chute fortement à partir du 17^e jour de gestation et cette diminution se maintient jusqu'au 21^e jour de gestation lors d'une exposition du 13^e au 21^e jour (MacLeod et coll., 2010). Ils ont également montré qu'une courte exposition du 19^e au 20^e jour est suffisante pour inhiber la sécrétion de testostérone au jour 21 (Scott et coll., 2008). Cependant, lors d'une exposition de du 13^e au 15^e ou du 15^e au 17^e, on n'observe pas de diminution de la testostéronémie au jour 21. Il apparaît donc que les effets sur la production de testostérone fœtale disparaissent rapidement après l'arrêt du gavage. D'autres auteurs (Akingbemi et coll., 2001) ont gavé des rates de lignée Long Evans pendant la gestation (du 12^e au 21^e jour) avec 100 mg/kg/j de DEHP et observent une diminution de testostéronémie des mâles nés de ces animaux pendant la puberté (21-35 jours) mais cet effet est transitoire puisqu'à l'âge adulte (90 jours) le taux de testostérone est restauré. La plupart des études ayant suivi la production de testostérone pendant la vie postnatale semble s'accorder sur ce dernier point : à l'âge adulte, les taux plasmatique de testostérone des mâles traités *in utero* sont comparables à ceux d'animaux non exposés (Gray et coll., 2000 ; Fisher et coll., 2003 ; Borch et coll., 2004 ; Gray et coll., 2009 ; Scarano et coll., 2009). Une baisse de la testostéronémie pendant la période pubertaire a également été rapportée par Lin et coll. (2009) chez le rat pour une exposition à des doses relativement faibles de DEHP (10 mg/kg/j) pendant la gestation. Cependant, cet effet inhibiteur pendant la période pubertaire n'est pas retrouvé systématiquement (Borch et coll., 2005).

Les mécanismes responsables de la diminution de la synthèse de testostérone suivant immédiatement une exposition *in utero* aux phtalates chez le rat ont été décrits dans plusieurs études et des résultats concordants décrivent une diminution de l'expression des enzymes de transport du cholestérol et de biosynthèse des hormones stéroïdes. Les gènes dont l'expression est diminuée de manière cohérente avec les effets rapportés et indépendamment de la nature du phtalate ou de la lignée sont : *P450sc* (*Cyp11a1*), *StAR*, *Cyp17a1* et *Srb1* (Boberg et coll., 2008 ; Johnson et coll., 2008 ; Drake et coll., 2009 ; Lin et coll., 2009 ; Struve et coll., 2009 ; Vo et coll., 2009a). Notons que la diminution de l'expression de la 17 β HSD, de SF1 ou du récepteur à LH a également été notée dans certaines études (Boberg et coll., 2008 ; Lin et coll., 2008 et 2009). Ce blocage des différentes étapes clefs de la stéroïdogenèse du testicule fœtal explique probablement l'effet net sur la production de testostérone fœtale mais il n'a pas été démontré que les phtalates ou leurs dérivés agissaient directement sur l'expression de ces gènes.

Les conséquences d'une inhibition de la synthèse de testostérone fœtale sont clairement visibles et encore plus fréquemment rapportées chez les rats traités durant la gestation. Ainsi, différents défauts de masculinisation sont décrits :

une diminution de la distance anogénitale, la rétention d'aréoles mammaires ou de mamelons chez le mâle, la diminution de la longueur du pénis, une baisse du poids de la prostate, une augmentation des hypospadias et du taux de cryptorchidie. Une diminution marquée de la distance anogénitale est décrite dans les jours qui suivent la naissance (Gray et coll., 2000 ; Ema et Miyaki., 2001 ; Borch et coll., 2004 ; Howdeschell et coll., 2007 ; Lin et coll., 2008 ; Saillenfait et coll., 2008 ; Scott et coll., 2008 ; Drake et coll., 2009 ; Gray et coll., 2009 ; Lin et coll., 2009 ; Mac Leod et coll., 2009 ; Martino-Andrade et coll., 2009 ; Saillenfait et coll., 2009 ; Vo et coll., 2009a ; Yamasaki et coll., 2009 ; Zhu et coll., 2009). De très nombreuses études ont utilisé ce paramètre qui représente un marqueur fiable de l'imprégnation androgénique du fœtus et ne nécessite pas le sacrifice de l'animal. Il a ainsi été montré que ce paramètre est diminué par divers phthalates, DEHP, DBP, MBP, BBP, DIBP, DnHP (di-n-hexyl-phthalate) et DCHP (dicyclohexyl-phthalate) et à des doses qui concordent généralement avec les effets observés sur la sécrétion de testostérone (de 250 à 750 mg/kg/j) chez les trois lignées de rats précédemment citées. Notons ici que si les doses de l'ordre de 10 mg/kg/j semblent clairement inefficaces, certains auteurs rapportent un effet du DEHP dès 100 mg/kg/j (Vo et coll., 2009a) et d'autres auteurs n'indiquent pas d'effet à une dose proche (Martino-Andrade et coll., 2009). Une explication plausible serait que les premiers auteurs utilisent la lignée de rat Sprague-Dawley et les seconds, la lignée Wistar, lignée qui semble moins sensible aux effets des phthalates sur la stéroïdogenèse. D'autres phthalates (DEP, DMP et dioctyl terephthalate (DEHT ou DOTP)) à la dose de 750 mg/kg/j chez le rat Sprague-Dawley semblent inefficaces sur ce paramètre (Gray et coll., 2000). De manière très intéressante, deux études ont délimité finement la période d'exposition minimale induisant une diminution de la distance anogénitale (Ema et coll., 2001 ; Scott et coll., 2008) ; cette période du 15^e au 17^e jour de gestation correspond à la « fenêtre de programmation mâle », un concept proposé par R. Sharpe. Ainsi chez le rat Wistar, une exposition au DBP (150-500 mg/kg/j) durant toute la fin de la vie fœtale (du 13^e au 21^e jour) ou uniquement pendant la fenêtre du 15 au 17^e jour diminue sensiblement également la distance anogénitale bien que dans le second cas la chute de la sécrétion de testostérone ait été très transitoire. La différenciation et le développement de nombreux organes du tractus reproducteur mâle sont androgéno-dépendants. Ainsi, une diminution à la puberté ou à l'âge adulte du poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale et du muscle levator ani-bulbocaverneux sont couramment signalés dans ces études. Un retard de l'âge de la séparation du prépuce, un indice de la puberté chez le mâle, est parfois rapporté. Une diminution du poids testiculaire ou épидидymaire est également fréquemment décrite mais il est peu clair si celle-ci fait suite à une atteinte directe du testicule ou est secondaire à la cryptorchidie.

Une autre hormone produite par les cellules de Leydig durant la vie fœtale, l'InsL3 (*relaxin/insulin like 3*) apparaît comme inhibée lors d'une exposition *in utero* aux phthalates. La diminution de l'expression de ce gène pendant la vie

foetale ou néonatale a été décrite pour des doses de 200 à 750 mg/kg/j chez les trois lignées de rats en réponse à une exposition *in utero* au DIBP, au DEHP ou au DBP (Howdeshell et coll., 2007 ; Boberg et coll., 2008 ; Culty et coll., 2008 ; Johnson et coll., 2008 ; Lin et coll., 2008 et 2009). Rappelons que cette hormone permet entre autre la croissance du gubernaculum, un ligament responsable de la descente des testicules. Il semble donc logique d'attribuer au moins en partie la cryptorchidie induite par une exposition *in utero* aux phtalates à l'inhibition de la sécrétion de cette hormone leydigienne. Notons ici que pour des doses voisines de l'ordre de 500 mg/kg/j (13-21^e jour de gestation), des taux de presque 100 % de cryptorchidie sont décrits chez le rat de lignée Wistar alors que seuls 7 à 8 % des rats de lignées Sprague-Dawley sont atteints (Howdeshell et coll., 2008). Une explication possible à cette différence serait le taux basal d'Insl3 qui est plus important chez les rats Sprague-Dawley en comparaison aux animaux de lignée Wistar.

Enfin, des cas drastiques d'agénésie épидидymaire sont rapportés en réponse aux phtalates *in utero*. Ici, c'est au contraire les rats de lignées Sprague-Dawley qui semblent plus atteints que les lignées Wistar, respectivement 82 % contre 12 % en réponse à 500 mg/kg/j de DBP (Howdeshell et coll., 2008). Ceci peut également être expliqué par une sécrétion de testostérone basale plus importante chez les animaux de lignées Wistar. Il est intéressant de noter ici que l'épididyme dérive des canaux de Wolf, structure embryonnaire dont le maintien et la croissance dépend du taux d'androgènes pendant la vie foetale. Les groupes de P. Saunders et R. Sharpe (Welsh et coll., 2009) se sont intéressés à la croissance de ces canaux en traitant des rats Wistar avec une dose de flutamide, un anti-androgène (100 mg/kg) et de DPB (500 mg/kg) à partir du 14^e jour de gestation. Les auteurs rapportent que la combinaison de ces deux anti-androgènes induit la régression complète de ces canaux alors que la flutamide seule n'a que peu d'effet. L'effet décrit est comparable à celui de souris déficientes pour le récepteur aux androgènes. Il semble donc que le DBP en combinaison avec la flutamide puisse totalement bloquer la signalisation androgénique.

La question de la dose sans effet de phtalates a été abordée par la plupart des études décrivant une exposition *in utero* et comme décrit ci-dessus, très peu rapportent un effet à des doses inférieures à 150 mg/kg/j. Notons cependant que des effets cumulatifs de différents phtalates ont été rapportés. Ainsi Howdeshell et coll. (2007) montrent des effets du DBP et du DEHP seuls à la dose de 500 mg/kg/j chez le rat Sprague-Dawley pendant la gestation (14-18^e jour de gestation). Ces effets apparaissent amplifiés lorsque ces deux phtalates sont administrés simultanément, une augmentation du taux d'hypospadias et des effets persistant chez l'adulte étant alors notée de manière significative. Martino-Andrade et coll. (2009) ont adressé une question similaire en utilisant cette fois des doses plus faibles de DBP (100 mg/kg/j) et de DEHP (150 mg/kg/j) chez le rat Wistar. Les auteurs rapportent que seuls ces phtalates n'ont pas d'effet sur la sécrétion de testostérone ou la distance anogénitale

mais qu'en combinaison, ils ont des effets similaires à une dose de 500 mg/kg/j de DBP, diminuant ces deux paramètres. Cependant, aucun effet persistant chez l'adulte n'est décrit dans cette dernière expérience. Enfin, citons l'étude très détaillée de Gray et coll. (2009). Dans leurs travaux, les auteurs ont exposé au cours de la gestation et au début de la vie postnatale, des rats Sprague-Dawley à des doses allant de 11 à 300 mg/kg/j de DEHP et ont analysé l'âge de la séparation du prépuce, la persistance d'aréoles mammaires, les anomalies testiculaires (lésions), les anomalies de l'épididyme, des vésicules séminales du ligament du gubernaculum et rassemblé toutes ces lésions de l'appareil reproducteur mâle sous l'appellation de « syndrome des phtalates ». Les auteurs ont également analysé tous les animaux issus de toutes les portées (en général un effectif de plus 70 rats issus d'au moins 10 portées) alors que dans la plupart des autres études seuls quelques animaux par portée sont analysés (en moyenne 10 au total). Gray et coll. (2009) rapportent alors un effet statistiquement significatif du DEHP sur ce syndrome dès la dose de 11 mg/kg/j. À cette dose, environ 10 % des animaux présentent des malformations du tractus reproducteur mâle (8/71) et près de 50 % des rats à la dose de 300 mg/kg (38/74) mais aucun des animaux témoins (0/83) n'est atteint. Dans ces travaux, les auteurs ont dosé le MEHP, un métabolite du DEHP, dans le fluide amniotique et observent des taux de 7,2, 68 et 2 324 ng/ml respectivement chez les animaux témoins et les animaux exposés à 11 et 300 mg/kg/j de DEHP. Il semble donc que chez le rat, une partie des animaux soit affectée par des doses relativement faibles correspondant à un équivalent de 68 ng/ml de MEHP circulant. Cette étude pousse à l'extrême la notion d'analyse statistique mais dans plusieurs autres travaux une exposition *in utero* à des doses de 10 à 100 mg/kg/j de phtalates ne modifie pas significativement un paramètre mais augmente sa dispersion spécifiquement chez les animaux traités. Bien qu'il soit difficilement concevable de réaliser régulièrement des études aussi détaillées, il semble que certaines sous-populations puissent être plus sensibles.

De manière intéressante, le groupe de R. Sharpe a identifié un paramètre pouvant accroître la sensibilité *in utero* aux phtalates (Drake et coll., 2009). Dans cette étude, les auteurs ont gavé des rates gestantes (lignée Wistar, 13-21^e jour de gestation) avec 100 ou 500 mg/kg/j de DBP et/ou 0,1 mg/kg/j de dexaméthasone. La dexaméthasone seule n'a aucun effet en elle-même sur les paramètres étudiés mais amplifie ou révèle les effets du DBP notamment sur la distance anogénitale et le poids testiculaire. Les effets de ce glucocorticoïde suggèrent que le stress pourrait sensibiliser à l'action des phtalates. Une autre étude propose que des facteurs génétiques puissent accroître la sensibilité aux phtalates (Johnson et coll., 2008). Les auteurs ont utilisé une sous-lignée de rat dérivée des rats Long-Evans, la lignée ORL. Cette sous-lignée présente à l'état basal un taux de 60 % de cryptorchidie due à un défaut polygénétique, mal caractérisé, et affectant la croissance du gubernaculum. Dans cette sous-lignée, une exposition *in utero* au DBP réduit l'expression des enzymes de synthèse des androgènes (P450scc et StAR) et de l'InsL3 et diminue le poids testiculaire

dès la dose de 50 mg/kg/j alors que cette dose n'a pas ou peu d'effet chez des rats Long-Evans normaux. Les auteurs proposent donc ce modèle comme un exemple d'interaction gène-environnement ; le fond génétique ORL sensibiliserait aux effets des phtalates favorisant la survenue de malformations des organes reproducteurs en réponse à des doses plus faibles.

Notons enfin qu'en plus de la fonction endocrine, l'aspect histologique des cellules de Leydig fœtales est altéré par une exposition *in utero* aux phtalates chez le rat. Ainsi plusieurs groupes rapportent l'agrégation des cellules de Leydig et la formation de clusters hétérogènes chez les mâles exposés (Gray et coll., 2000 ; Fisher et coll., 2003 ; Borch et coll., 2005 ; Culty et coll., 2008 ; Lin et coll., 2008 et 2009). Cette hyperplasie leydigienne sous forme de clusters ne semble pas être due à une augmentation de la prolifération des cellules de Leydig différenciées. L'apparition de foyers hyperplasiques est rapportée pour de fortes doses (500 à 938 mg/kg/j) mais une hausse du volume leydigien global est détectée dès 234 mg/kg/j (Culty et coll., 2008). Ces foyers hyperplasiques sont détectables dès la vie fœtale (17^e jour de gestation) et semblent se maintenir chez l'adulte (90 jours) tout au moins pour les fortes doses (Fisher et coll., 2003). En réalisant une étude fine du nombre de cellules de Leydig par cluster, Lin et coll. (2008 et 2009) ont détecté une augmentation des clusters contenant de 6 à 30 cellules pour des doses de l'ordre de 10 mg/kg/j de DEHP alors que les agrégats contenant plus de 30 cellules n'apparaissent que pour de fortes doses (750 mg/kg/j) en fin de vie fœtale. Enfin, les foyers de cellules de Leydig ont été décrits comme très hétérogènes contenant également des cellules de Sertoli ou des gonocytes mal localisés. Les cellules de Leydig apparaissent elles-mêmes parfois mal localisées puisque Fisher et coll. (2003) rapportent la présence de cellules positives pour 3bHSD au sein même des cordons testiculaires (alors qu'elles se situent normalement entre les cordons) en réponse aux phtalates. Le LIF (*Leukemia Inhibiting Factor*) a été identifié comme une cytokine qui peut induire l'agrégation des cellules de Leydig *in vitro* et l'expression de cette cytokine est augmentée dans le testicule fœtal en réponse au DEHP (Lin et coll., 2008) ; il est ainsi possible que cette cytokine soit un des médiateurs des effets des phtalates sur les cellules de Leydig fœtales. Il semble donc que la différenciation des cellules de Leydig fœtales soit globalement affectée chez le rat sur le plan cellulaire et fonctionnel.

En comparaison de la bibliographie abondante chez le rat, très peu d'études ont abordé les effets des phtalates *in utero* dans d'autres modèles animaux. Higuchi et coll. (2003) ont évalué les effets du DEHP administré par voie orale à la dose de 400 mg/kg/j chez le lapin Dutch-belted pendant la gestation (15-29^e jour de gestation). Les effets présentés par les auteurs sont alors très semblables à ceux décrits chez le rat. La testostéronémie chute en période prépubère (6 semaines) puis revient à la normale chez l'adulte et une diminution du poids testiculaire et du poids des glandes annexes des animaux exposés *in utero* est observée. Gaido et coll. (2007) ont étudié en détail les effets des phtalates chez la souris. Trois lignées de souris différentes, CD1, C57Bl/6J et

C3H/HeJ, ainsi que trois phtalates ont été utilisés, DBP, MBP et MEHP. Les gavages ont été réalisés pendant la gestation (18^e jour, 15-16^e jour, 15-17^e jour et 14-17^e jour) avec des doses de 250 à 1 500 mg/kg/j. Les protocoles utilisés sont semblables à ceux décrits chez le rat. Cependant, aucune diminution de la testostérone testiculaire fœtale n'a pu être observée par ces auteurs, quelle que soit la dose, la nature du phtalate ou la lignée de souris. Par exemple, une exposition à 1 500 mg/kg/j de DBP (14-16^e jour) ne diminue pas la production de testostérone dans la lignée C57Bl/6J. Par ailleurs, aucune diminution des ARNm de StAR, P450scc, Cyp17a1 ou Srb1 n'est observée. Les auteurs ont également mesuré le taux de MBP, lors d'une exposition au DBP, dans le plasma fœtal et maternel et observent des doses similaires à celles décrites chez le rat. Ce point indique donc que la métabolisation du phtalate ne semble pas être différente chez ces deux espèces. Il apparaît donc que chez la souris, les gènes impliqués dans le transport du cholestérol et la biosynthèse de la testostérone, ne sont pas affectés par une exposition *in utero* aux phtalates. Ce travail pose la question de savoir si les effets observés chez le rat sont spécifiques de cette dernière espèce.

En résumé, de très nombreux travaux ont démontré qu'une exposition *in utero* à des fortes doses d'un phtalate altère de manière importante la morphologie et la fonction des cellules de Leydig de rat. Celle-ci inhibe la sécrétion des deux principales hormones, InsL3 et testostérone, pendant la vie fœtale chez le rat et donc la masculinisation ou le développement des organes reproducteurs androgéno-dépendant. Cet effet semble, au moins en partie, conservé chez le lapin mais est absent chez la souris, posant ainsi la question de savoir quel est le modèle animal le mieux adapté pour prédire les effets chez l'homme. Chez le rat, d'importantes différences ont été observées en fonction de la lignée ou sous-lignée suggérant une composante importante du fond génétique. Enfin, il est encore incertain si ces effets anti-androgéniques sont uniquement dépendants d'une exposition à de fortes doses ou si ces effets peuvent se manifester à des doses beaucoup plus faibles chez certains animaux ou lors d'une exposition à un mélange de divers phtalates ou/et de facteurs anti-androgéniques. Quelques travaux suggèrent que tel pourrait être le cas mais ceux-ci sont encore à confirmer.

Effets sur les cellules de Sertoli

Concernant les cellules de Sertoli, plusieurs études du groupe de R. Sharpe ont décrit des effets sur ce type cellulaire lors d'une exposition *in utero*. Le modèle utilisé par ce groupe est essentiellement le rat Wistar gavé au DBP (500 mg/kg/j) pendant la gestation (Fisher et coll., 2003 ; Scott et coll., 2008 ; Auharek et coll., 2010). Dans ce modèle, un gavage pendant toute l'organogenèse testiculaire (13^e au 21^e jour de gestation) induit une chute importante, de l'ordre de 50 %, du nombre de cellules de Sertoli en fin de gestation mais dès la puberté (25 jours) et à l'âge adulte (90 jours) ce nombre est restauré (Fisher et coll., 2003). Les cellules de Sertoli apparaissent donc comme un second type testiculaire sensible aux effets des phtalates *in utero*. Le

même groupe a démontré que la prolifération des cellules de Sertoli est réduite en réponse à une exposition aux phtalates *in utero* (Scott et coll., 2008). En faisant jouer la fenêtre d'exposition, les auteurs indiquent qu'une exposition en toute fin de vie fœtale (19^e-20^e jour de gestation) suffit pour diminuer le nombre de cellules de Sertoli alors qu'une exposition plus précoce (15^e à 17^e jour de gestation) est sans effet sur ce paramètre. Il semble donc que la fenêtre de sensibilité des cellules de Sertoli se situe un peu après celle décrite pour la distance anogénitale. De plus, l'inhibition de la prolifération des cellules de Sertoli apparaît corrélée à l'inhibition de la synthèse de testostérone induite par le DBP. Récemment, ce groupe a démontré que pendant la période postnatale, la prolifération des cellules de Sertoli est accrue chez les animaux exposés *in utero* expliquant ainsi la compensation observée du nombre de ces cellules dès la puberté. Cette compensation postnatale semble être due à l'action des androgènes puisqu'elle peut être bloquée par l'administration de flutamide après la naissance (Auharek et coll., 2010). Notons ici que dans la même étude les auteurs décrivent également une diminution du nombre de cellules de Sertoli persistant à la puberté si l'exposition aux phtalates *in utero* est poursuivie par une exposition via la lactation jusqu'au 15^e jour postnatal. L'ensemble de ces données apparaît globalement cohérent puisque l'on sait qu'en fin de vie fœtale les cellules de Sertoli acquièrent le récepteur aux androgènes et que ceux-ci stimulent la prolifération de ces cellules. Rappelons que les cellules de Sertoli sont les cellules de soutien des cellules germinales et que leur prolifération s'arrête avant la puberté. Cette diminution de la prolifération des cellules de Sertoli semble être la cause de la diminution du poids testiculaire à la naissance lors d'une exposition aux phtalates pendant la gestation rapportée par de nombreux auteurs (Fisher et coll., 2003 ; Jonhson et coll., 2008 ; Boekelheide et coll., 2009) et également retrouvée chez le lapin (Higushi et coll., 2003). En effet, les cellules de Sertoli sont le type cellulaire majoritaire dans le testicule en fin de vie fœtale. D'autres auteurs ont également rapporté une atteinte sertolienne avec notamment l'existence de foyers dysplasiques contenant des cellules positives pour l'AMH, un marqueur sertolien, mélangées avec des cellules de Leydig et des cellules péritubulaires (Borch et coll., 2005). Ces cellules de Sertoli sont décrites par les auteurs comme des cellules ayant échoué à former des cordons testiculaires. Cette hypothèse d'une malformation des cordons induite par une exposition *in utero* induisant des foyers dysgénésiques dans le testicule apparaît logique mais n'a pas formellement été prouvée. Cependant, Fisher et coll. (2003) rapportent également l'existence de foyers de cellules de Sertoli immatures qui persistent à l'âge adulte (90 jours). Les auteurs identifient ces cellules immatures de par leur absence d'expression de P27, un inhibiteur du cycle cellulaire. Enfin chez le rat et le lapin, il a également été rapporté l'induction de foyers dits « *Sertoli Cell Only* » (SCO) qui correspondent à des zones contenant des tubules dépourvus de cellules germinales (Fisher et coll., 2003 ; Higuchi et coll., 2003). Fisher et coll. (2003) rapportent de surcroît une diminution du nombre de spermatocytes par cellule de Sertoli à la puberté (25 jours), interprétée

par les auteurs comme une diminution de la capacité des cellules de Sertoli à soutenir les cellules germinales.

En résumé, le nombre et la prolifération des cellules de Sertoli peuvent être inhibés transitoirement lors d'une exposition *in utero* aux phtalates chez le rat. Il est encore incertain si cet effet des phtalates résulte d'une atteinte directe de ces cellules mais un effet indirect via l'inhibition de la synthèse d'androgènes est probable. Le modèle murin, qui ne présente pas d'inhibition de la production de testostérone, n'a que peu été étudié vis-à-vis des cellules de Sertoli lors d'une exposition gestationnelle aux phtalates. Seule une augmentation du diamètre des cordons testiculaires est rapportée en fin de vie fœtale (Gaido et coll., 2007). Cet effet a également été décrit chez le rat mais bien qu'attribué aux cellules de Sertoli, cet effet pourrait également être le fait d'une atteinte germinale (l'autre composante des cordons).

Effets sur les cellules germinales

Concernant les cellules germinales, le phénomène le plus visible immédiatement après une exposition *in utero* aux phtalates est l'apparition de cellules germinales anormales, multinucléées. Ces cellules ont été décrites chez le rat et la souris dans toutes les lignées précédemment citées et principalement en réponse au DBP et au DEHP (Fisher et coll., 2003 ; Borch et coll., 2005 ; Gaido et coll., 2007 ; Jonhson et coll., 2008 ; Boekelheide et coll., 2009 ; Martino-Andrade et coll., 2009). Il semble que des doses supérieures ou égales à 100 mg/kg/j soient nécessaires pour induire l'apparition de ces gonocytes multinucléés. Ces cellules sont observées en fin de vie fœtale et disparaissent peu après la naissance vers 10 jours (Fisher et coll., 2003). À cet âge, une diminution du nombre des cellules germinales est observée. Les mécanismes moléculaires impliqués sont totalement inconnus mais un lien avec la chute du taux de testostérone peut clairement être exclu puisque cet effet est retrouvé chez la souris. Notons ici que peu d'études ont détaillé la prolifération ou l'apoptose des cellules germinales fœtales. Dans ce cadre, l'étude de Ferrara et coll. (2006) revêt un intérêt particulier car elle décrit un retard de la différenciation mâle des cellules germinales fœtales chez le rat en réponse à une exposition au DBP. Une étape importante du développement de la lignée germinale mâle chez les rongeurs est l'apparition d'une phase de quiescence caractéristique en fin de vie fœtale. C'est durant cette phase que l'empreinte parentale se met en place. Les auteurs ont gavé des rates Wistar avec 500 mg/kg/j de DBP à partir du 13^e jour de gestation et rapportent alors une augmentation de l'expression d'OCT4, de pRb, de Ki67 dans les cellules germinales, des marqueurs de « multipotence » et de prolifération qui disparaissent en temps normal lors de l'entrée en quiescence. Ce maintien de cellules indifférenciées s'accompagne également d'une hausse de l'apoptose (d'un facteur 2 à 4) des cellules germinales dès le 15^e et 17^e jour de gestation. Les auteurs rapportent que l'apparition de gonocytes multinucléés (augmentation d'un facteur 10) est plus tardive, dès le 21^e jour de gestation, et dissociable du phénomène du retard de différenciation. En effet, une exposition au DBP,

pendant la phase de quiescence, (19-20^e jour de gestation) suffit à induire l'apparition de cellules multinucléées. Les auteurs identifient également que seul l'effet précoce du DBP (13-20^e jour de gestation) retardant l'entrée en quiescence réduit le nombre de cellules germinales de manière conséquente : 37 % au jour 21 de gestation, 53 % au 4^e jour postnatal et 80 % entre le 8 et 15^e jour postnatal mais de manière transitoire puisque ce nombre est restauré entre 25 et 80 jours postnataux du fait d'une augmentation de la prolifération des cellules germinales postnatales. Cet effet précoce d'une exposition aux phtalates est particulièrement intéressant car il est actuellement admis qu'une non-différenciation de certains gonocytes pourrait être à l'origine des carcinomes *in situ* (CIS) testiculaires avec lesquels ils partagent de nombreux marqueurs communs. Notons cependant qu'aucun CIS n'a été décrit chez le rat adulte après une exposition *in utero* aux phtalates. À long terme, quelques rares études rapportent une augmentation de cellules germinales dégénérantes ou l'apparition de SCO sans qu'il soit certain qu'une atteinte des cellules germinales soit en cause (Yamasaki et coll., 2009). Chez le lapin (Higuchi et coll., 2003), une diminution du nombre de spermatozoïdes éjaculés sans changement du nombre de spermatozoïdes épидидymaires a été rapportée. Une augmentation des formes anormales (anomalies acrosomiques et nucléaires) est également décrite dans cette espèce. Enfin, notons que très peu d'études ont analysé la fertilité, une fois adulte, des mâles exposés *in utero*. Fisher et coll. (2003) rapportent que seuls 2 rats sur 10 sont fertiles après une exposition *in utero* au DBP (500 mg/kg/j) mais dans cette même étude presque tous les animaux présentent une cryptorchidie uni- ou bilatérale. Il est donc probable que cette stérilité soit secondaire à la cryptorchidie. De manière plus intéressante, le poids du testicule à l'âge adulte n'est pas diminué dans les testicules non-cryptorchides dans cette étude. Globalement, la spermatogenèse semble donc prendre place après une exposition *in utero* mais quelques altérations subtiles ont été décrites.

Effets lors d'une exposition périnatale

Plusieurs auteurs ont adressé la question de savoir si les phtalates pouvaient également agir comme des anti-androgènes en inhibant la croissance des organes androgéno-dépendants à travers une exposition par voie orale pendant la gestation et pendant la lactation. En effet, les androgènes sont également importants pour la croissance postnatale des organes reproducteurs mâles. Tous ces travaux ont été menés chez le rat. En règle générale, les effets d'une exposition *in utero* et pendant la lactation sont supérieurs à ceux induits uniquement pendant la gestation. Ainsi, Gray et coll. (2009) ont exposé des rats Sprague-Dawley du 8^e jour de gestation au 17^e jour de vie postnatale à 300 mg/kg/j de DEHP et analysé les effets chez l'adulte (65 jours). Les auteurs décrivent alors une diminution du poids des testicules de la prostate ventrale et des vésicules séminales qui s'accompagne d'une diminution du nombre de spermatozoïdes. Un protocole similaire chez le rat Long-Evans a permis de

mettre en évidence un effet inhibiteur sur la testostérone plasmatique et sur l'expression des enzymes de biosynthèse de cette hormone pendant la puberté (21 jours) avec des doses de 10 mg/kg/j de DEHP (Lin et coll., 2009). Cet effet est transitoire disparaissant à 49 jours mais persiste pour des doses plus fortes (750 mg/kg/j). Ainsi aux faibles doses, l'effet du DEHP disparaît peu après l'arrêt du traitement, et aux fortes doses de DEHP un effet inhibiteur à long terme de la stéroïdogénèse peut persister au moins 4 semaines après l'arrêt du traitement. Notons ici que cet effet s'accompagne d'une diminution de l'expression du récepteur à la LH. Mac Leod et coll. (2010) ont comparé les effets d'une exposition *in utero* et/ou postnatale chez le rat Wistar exposé à 500 mg/kg/j de DBP. L'exposition *in utero* et lactationnelle diminue, de manière plus importante que l'exposition *in utero* seule, la distance anogénitale et la longueur du pénis mesurés à la puberté (25 jours). De manière intéressante, les auteurs ont comparé ces effets à ceux d'une exposition uniquement lactationnelle/postnatale ; ces deux paramètres ne sont alors pas affectés bien que l'administration de testostérone pendant la même période augmente la distance anogénitale et la longueur du pénis. D'autres études similaires décrivent également un retard de la puberté se traduisant par un retard de l'âge de la séparation du prépuce, et la persistance de structure mammaire chez le mâle ou une diminution du poids du muscle levator-bulbo-caverneux lors d'une exposition continue de la vie fœtale à la puberté (Yamasaki et coll., 2009). Rappelons ici qu'une diminution durable du nombre de cellules de Sertoli est aussi observée dans ces conditions alors que celle-ci n'est que transitoire lors d'une exposition fœtale (cf. précédemment, Auharek et coll., 2010). Borch et coll. (2004) décrivent également une diminution transitoire de la sécrétion d'inhibine B au moment de la puberté lors d'une exposition continue depuis la vie fœtale.

En résumé, les effets d'une exposition pendant la vie fœtale et postnatale semblent similaires à ceux décrits lors d'une exposition *in utero*, mais ces effets sont plus prononcés et certains plus durables. Il n'est pourtant pas évident que les mécanismes mis en jeu durant ces deux périodes soient identiques. La démonstration d'effets importants chez une espèce autre que le rat n'a pas été documentée.

Effets lors d'une exposition postnatale

Les effets d'une exposition aux phtalates pendant la période pubertaire (à partir de 21 jours) ont été étudiés chez le rat. Une exposition à 500 mg/kg de DBP induit rapidement chez le rat Sprague-Dawley la diminution de l'expression des enzymes de biosynthèse de la testostérone et de la testostéronémie dans les heures qui suivent le traitement (Alam et coll., 2010). Après 7 jours d'exposition quotidienne, le taux de testostérone des rats exposés est redevenu semblable à celui des rats témoins. Cet effet inhibiteur sur la stéroïdogénèse apparaît donc très temporaire. Dans la même étude, les auteurs observent

une augmentation de l'apoptose des spermatocytes au sein des tubes séminifères à la fois dans les heures suivant le début du traitement et après 7 jours. Cet effet sur la spermatogenèse semble donc plus durable. De manière intéressante, seul l'effet sur la spermatogenèse est bloqué par un antagoniste des œstrogènes. Les effets des phtalates sur la gamétogenèse et la stéroïdogenèse peuvent donc être dissociés. Une exposition sur une période plus longue de un à trois mois, augmente au contraire la synthèse de testostérone et les taux de LH (Akingbemi et coll., 2004). Cependant, la sécrétion de testostérone de chaque cellule de Leydig issue des animaux exposés et cultivée *in vitro* est diminuée que ce soit en condition basale ou stimulée par la LH. L'augmentation du taux de testostérone *in vivo* pourrait en fait être liée à une augmentation de la prolifération des cellules de Leydig adultes. Ces effets variables sur la stéroïdogenèse peuvent expliquer que certains auteurs n'observent aucun changement significatif des taux d'androgènes sur des périodes proches (Botelho et coll., 2009) tout en rapportant cependant une diminution du poids des vésicules séminales ou du muscle levator bulbo-caverneux, deux tissus androgéno-dépendants. La réduction du poids de ces organes s'accompagne fréquemment d'une diminution du poids de la prostate ventrale, des épидидymes et des testicules durant la même période (Lee et coll., 2008 ; Noriega et coll., 2009). À partir de la puberté, les cellules de Sertoli ont définitivement cessé de proliférer et les variations de poids testiculaires reflètent essentiellement une atteinte germinale sans pour autant que celle-ci ait été recherchée par tous les auteurs.

Une étude menée par Noriega et coll. (2009) a comparé la sensibilité de deux lignées de rats, Sprague-Dawley et Long-Evans, au DEHP pendant la période pubertaire (22 à 98 jours). Très peu d'effets ont été observés aux doses de 10 ou 100 mg/kg/j. Dans ces travaux, à l'inverse de l'étude d'Akingbemi et coll. (2004), et pourtant bien qu'utilisant un protocole presque identique, à aucun moment la sécrétion de testostérone n'est apparue supérieure à celle des rats témoins. De 300 à 900 mg/kg/j les auteurs rapportent une diminution des taux de testostérone et une augmentation des taux de LH plasmatiques. Ces variations hormonales s'accompagnent d'une réduction du poids de tous les organes androgéno-dépendants. Chez le rat Long-Evans, l'âge de la séparation du prépuce, indicateur de la puberté, est nettement retardé. Chez le rat Sprague-Dawley spécifiquement, une diminution de poids testiculaire et épидidymaire ainsi qu'une diminution du nombre de spermatozoïdes sont notées. D'autres auteurs rapportent également une diminution du taux testostérone (Vo et coll., 2009b) et du poids des organes reproducteurs mâles.

En résumé, il semble que les effets de phtalates chez le rat pubère sur la sécrétion d'androgènes apparaissent très variables. À forte dose, il est probable qu'ils réduisent celle-ci diminuant de ce fait la croissance des organes reproducteurs mâles. Des différences liées à la lignée de rat employée existent : la lignée Sprague-Dawley semble plus sensible aux lésions testiculaires affectant la spermatogenèse.

Chez le lapin, Higuchi et coll. (2003) ont comparé les effets du DEHP pendant la période foétale et la période pubertaire. Pendant cette seconde période, les effets néfastes apparaissent moindres bien que quelques tubules vides soient observés et qu'une augmentation des formes anormales de spermatozoïdes soit également décrite.

Chez l'adulte (plus de 60 jours), les effets des phtalates sur le testicule semblent peu prononcés à moins d'une exposition à de très fortes doses. Ainsi, Nair et coll. (2008) relatent que 1 000 mg/kg/j de DBP administrés durant 7 jours à des rats adultes diminuent le taux de testostérone plasmatique et la densité et la viabilité des spermatozoïdes. Dans cette étude, les protocoles sont peu détaillés rendant difficile l'appréciation de la méthodologie. Akingbemi et coll. (2001) n'observent aucun effet de doses allant de 1 à 200 mg/kg/j de DEHP sur les taux de testostérone du rat adulte. Chez le lapin adulte, des doses de 400 mg/kg/j de DEHP administrées pendant 12 semaines n'augmentent que très peu l'apparition de SCO et n'ont pas d'effet sur le nombre de spermatozoïdes (Higuchi et coll., 2003). En résumé, il semble donc que le testicule adulte de rat ou de lapin soit beaucoup moins sensible aux effets d'une exposition aux phtalates que le testicule foetal ou postnatal.

Chez l'adulte, une étude intéressante a été menée avec des rats Sprague-Dawley castrés et supplémentés en testostérone artificiellement (Lee et Koo, 2007). Chez ces animaux, le DBP, le DEHP, le DINP, le DIDP et le MEHP diminuent le poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale et des autres organes reproducteurs mâles. Des effets sont observés dès la dose de 20 mg/kg/j. En revanche le di-n-heptyl-phtalate (DnHP) et le BBP semblent inefficaces dans ce modèle. Cette étude est remarquable car elle décrit un effet anti-androgénique des phtalates indépendant de l'inhibition de la synthèse de testostérone testiculaire. Les phtalates pourraient donc agir directement sur le tractus reproducteur mâle indépendamment de leur effet sur la stéroïdogenèse testiculaire et inhiber la croissance androgéno-dépendante de celui-ci.

Une étude propose que l'hypothyroïdisme puisse protéger en partie des effets du DBP (Lee et coll., 2008). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des rats adultes rendus hypothyroïdiens par l'injection de propylthiouracyle (PTU) puis exposés à 500 mg/kg/j de DBP. Chez les rats PTU, une forte diminution de la métabolisation du DBP en MBP est observée (de près de la moitié). Notons cependant qu'une réduction de poids testiculaire est observée aussi bien chez les rats normaux et hypothyroïdiens (PTU) en réponse au DBP. Il est donc difficile d'être certain que l'hypothyroïdisme protège le testicule des effets néfastes du DBP mais l'effet sur le métabolisme de ce phtalate apparaît clair.

Enfin, Voss et coll. (2005) ont exposé des rats adultes à des doses allant de 30 à 300 mg/kg/j de DEHP depuis l'âge de 110 jours jusqu'à leur mort. La mort de la plupart des rats se produit entre 750 et 1 200 jours. Le DEHP (300 mg/kg/j) ne modifie pas la durée de vie des animaux mais augmente subtilement l'apparition de tumeurs de cellules de Leydig. Le testicule pourrait donc être

une cible de la carcinogénicité du DEHP au même titre que le foie. Les effets décrits apparaissent cependant modestes et sont rapportés uniquement chez les animaux moribonds du fait du protocole choisi.

Études chez les primates non humains

Quelques études, ayant pour objectif la recherche des effets des phtalates, ont été réalisées chez des primates non humains (tableau 35.III). Le singe marmouset (*Callithrix jacchus*) est un bon modèle en termes de période du développement (Kelnar et coll., 2002), de la différenciation périnatale des cellules germinales (Mitchell et coll., 2008), de l'organisation et de l'efficacité de la spermatogenèse (Millar et coll., 2000 ; Sharpe et coll., 2000).

En 1998, Kurata et coll. ont étudié l'effet d'une exposition de marmousets âgés de 12-15 mois au DEHP à des doses de 100, 500, 2 500 mg/kg/j durant 13 semaines. Une observation macroscopique et microscopique de très nombreux organes et des dosages sanguins (cholecystokinine, testostérone et œstradiol) sont réalisés, ainsi que l'analyse du zinc testiculaire, la morphométrie des peroxyosomes hépatiques et leur activité enzymatique.

Une réduction du poids de la rate est observée chez les mâles sous DEHP avec un effet dose mais cela ne s'accompagnant pas de modification histologique, les auteurs ne la considèrent pas comme pathologique et ce d'autant que le poids des rates du groupe témoin semble plus élevé qu'habituellement. Une augmentation de 1,3 à 1,4 fois est notée pour le volume moyen des peroxyosomes chez les animaux traités par du DEHP comparé aux témoins. Par ailleurs, l'activité cytochrome P450 semble augmenter dans les groupes DEHP. Il n'y a pas de modification des organes génitaux, du taux de testostérone ou d'œstradiol ni du zinc testiculaire.

Les auteurs concluent à l'absence d'effet toxique du DEHP chez le singe marmouset contrairement aux effets mis en évidence chez les rongeurs et soulignent que l'induction de certains enzymes participerait au métabolisme du DEHP chez le singe.

Ito et coll. (2005) ont analysé les différences dans le métabolisme des phtalates entre la souris, le rat et le marmouset en étudiant l'activité de la lipase, de l'UDP-glucuronyltransférase, de l'alcool déshydrogénase et de l'aldéhyde déshydrogénase dans plusieurs organes.

La lipase qui forme le MEHP à partir du DEHP présente l'activité la plus forte chez la souris (150 à 350 fois plus chez la souris que chez le marmouset et la plus basse chez le marmouset). L'activité de l'alcool et de l'aldéhyde déshydrogénase semble plus élevée chez le marmouset que chez la souris ou le rat. Ces différences dans le métabolisme du DEHP entre les espèces pourraient expliquer l'effet plus important du DEHP chez les rongeurs.

L'étude de Ito et coll. (2007) met en évidence après administration de DEHP une concentration hépatique de MEHP significativement plus élevée chez le

rat et la souris comparé au marmouset. L'administration du DEHP induit l'expression d'enzyme des peroxyssomes hépatiques chez la souris, le rat, mais pas chez le marmouset. Ces différences témoignent d'un métabolisme différent suivant l'espèce.

Concernant les effets des phtalates sur l'appareil reproducteur des primates non humains, les études ne montrent pas d'effets ou des effets moins importants que ceux retrouvés chez les rongeurs.

Tomonari et coll. (2006) ont administré à des marmousets juvéniles mâles et femelles (environ 18 mois, sexuellement matures) 100, 500, 2 500 mg/kg/j de DEHP durant 3 mois. Les concentrations plasmatiques de testostérone, d'œstradiol et de zinc testiculaire ont été évaluées. Par ailleurs, les analyses macroscopiques et microscopiques ont été effectuées sur les organes de l'appareil reproducteur comprenant également la concentration de spermatozoïdes chez le mâle et l'activité de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase. Aucune conséquence significative de l'administration de DEHP durant 3 mois n'a été mise en évidence chez les mâles, à l'exception d'une diminution du zinc testiculaire et de la glutathion-transférase testiculaire aux doses de 100 et 500 mg/kg/j mais non à 2 500 mg/kg/j.

Hallmark et coll. (2007) ont étudié l'effet du DBP et du MBP sur la production de testostérone et les cellules de Leydig *in vitro* dans le testicule de rat et d'homme, et *in vivo* chez le rat fœtal et le nouveau-né marmouset. Ils retrouvent un effet du DBP et MBP administré chez le marmouset nouveau-né se traduisant par une altération de la stéroïdogenèse leydigienne (hyperplasie/hypertrophie des cellules de Leydig) compensée probablement par la LH. Cet effet va dans le même sens que les effets obtenus sur le testicule fœtal lorsque la rate gestante est traitée par le DBP.

Le même groupe (Mc Kinell et coll., 2009) a exposé des femelles marmouset gestantes à 500 mg/kg/j de MBP entre la 7^e et la 15^e semaine de gestation, période durant laquelle se mettent en place les tubes séminifères et débute la sécrétion de testostérone ; 6 mâles sont autopsiés à la naissance, 5 durant la vie adulte (18-21 mois). Par ailleurs dans un deuxième protocole, ils exposent des nouveau-nés (4^e jour) à 500 mg/kg/j durant 14 jours. Les testicules sont examinés macroscopiquement mais également par immunohistochimie afin d'apprécier l'index de maturation des cellules germinales. L'exposition *in utero* n'a pas de conséquence notable sur les différents paramètres analysés à la naissance ou à l'âge adulte. Le taux de testostérone plasmatique est similaire entre exposés et témoins. L'analyse immunohistochimique met en évidence à la naissance chez les animaux traités des groupements inhabituels de cellules germinales chez les exposés, cellules germinales marquées principalement par OCT4, AP2 δ et c-KIT indiquant des gonocytes non différenciés. De telles agrégations cellulaires ont pu être retrouvées dans les tubes séminifères fœtaux de rat exposés au DBP. L'exposition des marmousets nouveau-nés au MBP se traduit par une réponse relativement hétérogène au niveau des

cellules germinales. Enfin, les résultats des animaux exposés *in utero* ne mettent pas en évidence de changement à l'âge adulte.

Les auteurs concluent à une absence d'effet de l'exposition au MBP *in utero* sur le développement et la fonction testiculaire. Les effets notés sur les cellules germinales n'apparaissent pas significatifs étant donné l'hétérogénéité des réponses.

Enfin, chez les singes *Cynomolgus* l'étude de l'exposition d'animaux adultes au DEHP ou au DINP durant 14 jours à la dose de 500 mg/kg/j ne met pas en évidence d'effets sur les différents organes étudiés dont le testicule (Pugh et coll., 2000). Dans cette étude, aucun marqueur de la prolifération des peroxy-somes n'est modifié par les phtalates administrés.

Tableau 35.III : Études chez le primate non humain

Référence	Primate non humain	Période d'exposition et durée	Phtalates/ Exposition mg/kg/j	Critères étudiés	Effets significatifs
Kurata et coll., 1998	Marmouset mâle et femelle	Âge 12-15 mois 13 semaines	DEHP : 100, 500, 2 500	Constantes hépatique et du métabolisme Cholecystokinine Testostérone Œstradiol Zinc testiculaire Évaluation macroscopie et microscopie de plusieurs organes Activité des peroxy-somes cytochrome P450	Surface moyenne peroxy-some hépa-tique x1,3
Tomonari et coll., 2006	Marmouset mâle et femelle	Adulte juvénile (18 mois) 3 mois	DEHP : 100, 500, 2 500	Testostérone Œstradiol Zinc testiculaire Activités enzymatiques Évaluation macroscopie et microscopie des tes-ticules et ovaires	Mâle : ↓ zinc tes-ticulaire et de la glutathion transfé-rase à 100 et 500 mg/kg/j Femelle : ↑ volume ovaire et utérus, ↑ œstradiol
Hallmark et coll., 2007	Marmouset 4 paires de jumeaux	4 ^e jour postnatal 14 jours	MBP 500	Testostérone plasmatique Microscopie cellules Leydig	↑ du volume des cellules de Leydig
	Marmouset n=4	4-6 jours postnatal 14 jours	DBP 500		↑ du volume des cellules de Leydig (non significative)
	Marmouset n=9	2-7 jours post-natal	MBP 500	Testostérone plasmatique 5 h après traitement	↓ testostérone plas-matique

Référence	Primate non humain	Période d'exposition et durée	Phtalates/ Exposition mg/kg/j	Critères étudiés	Effets significatifs
McKinnel et coll., 2009	Marmouset femelle gravide	7-15 jours de gravidité 7 semaines	MBP 500	Organes génitaux Évaluation macroscopique et microscopique des testicules Testostérone plasmatique	Groupes de gonocytes indifférenciés chez le nouveau-né
	Marmouset nouveau-né	4 ^e jour 14 jours	MBP 500	Cellules germinales Immunohistochimie	Pas d'effet Réponse hétérogène
Pugh et coll., 2000	Cynomolgus (<i>macaca fascicularis</i>)	2 ans 14 jours	DINP MBP : 500	Observations plusieurs organes	Pas d'effet sur testicule
			DEHP MBP : 500	Paramètres métaboliques et hématologiques Peroxyosome Bêta-oxydation Synthèse ADN	↑ des neutrophiles et ↓ des lymphocytes sanguins

Comparaison des effets testiculaires chez le rat et le primate non humain

La figure 35.1 résume les effets testiculaires rapportés dans ce chapitre chez le rat et le primate non humain. Les protocoles des études mises en place chez le rat et les primates sont sensiblement différents et peu de points de concordance ont été rapportés. Chez le primate nouveau-né, une seule étude retrouve un effet des phtalates sur les cellules de Leydig (Hallmark et coll., 2007), principale altération décrite chez le rat, hyperplasie leydigienne et inhibition de la stéroïdogénèse mais cette réponse apparaît très hétérogène et n'est pas retrouvée dans d'autres études (Mc Kinnel et coll., 2009). De même que chez le rat, un retard de différenciation des cellules germinales fœtales a également été rapporté chez le marmouset, cependant cet effet apparaît également peu significatif. Il n'y a pas d'effet notable sur le tractus reproducteur mâle décrit chez le marmouset alors que la croissance de nombreux organes de celui-ci est altérée chez le rat. Aucun effet notable sur la prolifération des cellules de Sertoli n'est décrit chez les primates, sans qu'il soit évident que ce paramètre ait été étudié dans le détail, comme il l'a été chez le rat. Chez le primate juvénile et adulte, il n'est pas rapporté d'effet testiculaire mais les observations se limitent souvent au niveau macroscopique. De plus, cette période apparaît également comme moins sensible chez le rat. Dans l'ensemble, il est probable que la meilleure connaissance du développement testiculaire du rat facilite la mise en évidence de manière détaillée des effets des phtalates car ceux-ci sont étroitement dépendants du stade de développement. Les deux études qui ont abordé cette question chez les primates ne rapportent que peu d'effets

similaires à ceux décrits chez le rat mais apparaissent insuffisantes pour pouvoir conclure définitivement à l'absence d'effet identique.

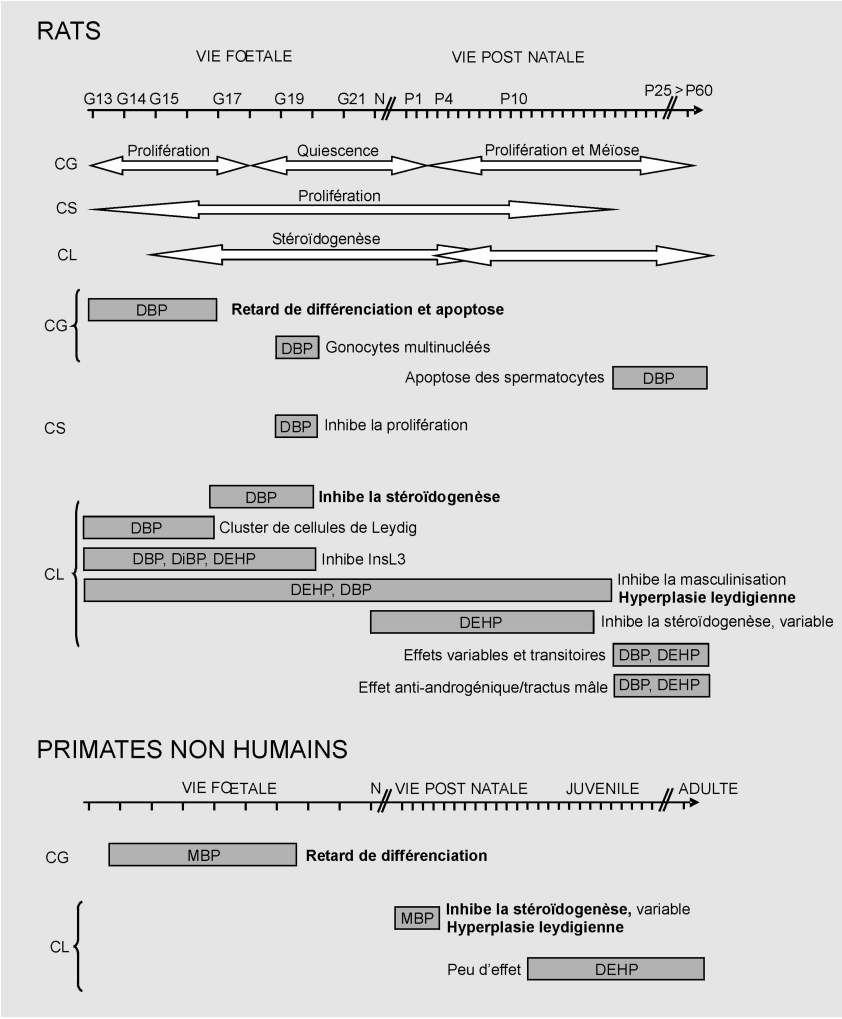


Figure 35.1 : Comparaison des effets chez le rat et le primate

Les périodes minimales d'exposition sont proposées en grisé lorsque les données étaient disponibles. Les principaux phtalates impliqués sont indiqués dans les rectangles gris. Les effets retrouvés chez différentes espèces sont indiqués en gras. Les effets sont décomposés selon les types cellulaires affectés : CG, cellules germinales ; CS, cellules de Sertoli ; CL, cellules de Leydig. Deux populations distinctes de CL foétales et adultes vont se succéder au cours du développement testiculaires (indiquées par deux doubles flèches chevauchantes).

En conclusion, deux périodes apparaissent présenter une sensibilité particulière aux phtalates : la période fœtale, la plus sensible, et la période postnatale et pubertaire. Durant ces périodes, les phtalates inhibent la fonction de gamétogenèse et de stéroïdogénèse mâle chez le rat. Des effets sont rapportés pour des expositions de l'ordre de la dizaine ou centaine de mg/kg/j, selon les études. L'inhibition de la synthèse de testostérone est bien décrite chez le rat mais ne semble pas exister chez la souris. Les conséquences de celle-ci sont des malformations ou un défaut de développement de l'appareil reproducteur mâle (cryptorchidisme, hypospadias, diminution marquée de la distance anogénitale...). Il est probable que les phtalates puissent exercer également un effet anti-androgénique directement au niveau des organes reproducteurs et indépendamment du testicule. Plusieurs atteintes ont été décrites sur la fonction de gamétogenèse et les cellules germinales. Ces lésions testiculaires sont indépendantes de l'effet sur la stéroïdogénèse. Des études additionnelles seront nécessaires pour définir si les phtalates agissent directement sur les cellules germinales ou via les cellules de Sertoli. Enfin, l'altération du nombre ou de la viabilité des spermatozoïdes parfois rapportée pourrait avoir des conséquences plus drastiques dans l'espèce humaine chez laquelle ces gamètes sont moins robustes que chez les rongeurs. Un paramètre important à prendre en compte dans de futures études sera l'identification de facteurs génétiques de susceptibilité. Cela nécessitera sans nul doute une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu, notamment par le biais d'animaux transgéniques.

Les études chez les primates non humains ne semblent pas montrer d'effet net de l'exposition à certains phtalates sur l'appareil de reproduction contrairement aux effets retrouvés chez les rongeurs. Cependant, deux études montrent des effets semblables à ceux observés chez les rongeurs lorsque la période d'exposition concerne la période *in utero* ou les premiers jours de vie.

La question se pose de savoir si les rongeurs sont de bons modèles animaux pour l'étude des effets chez l'homme. Il y a indubitablement des différences de métabolisme et de physiologie à prendre en compte pour les différentes espèces mais sans connaître les effets sur les cellules humaines correspondant aux types et stades les plus sensibles chez rongeurs, il est difficile de se prononcer.

BIBLIOGRAPHIE

AKINGBEMI BT, YOUKER RT, SOTTAS CM, GE R, KATZ E, et coll. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod* 2001, **65** : 1252-1259

AKINGBEMI BT, GE R, KLINEFELTER GR, ZIRKIN BR, HARDY MP. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101** : 775-780

ALAM MS, OHSAKO S, MATSUWAKI T, ZHU XB, TSUNEKAWA N, et coll. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis : a possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction* 2010, **139** : 427-437

AUHAREK SA, DE FRANCA LR, MCKINNELL C, JOBLING MS, SCOTT HM, SHARPE RM. Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology* 2010, **151** : 2868-2875

BOBERG J, METZDORFF S, WORTZIGER R, AXELSTAD M, BROKKEN L, et coll. Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology* 2008, **250** : 75-81

BOEKELHEIDE K, KLEYMENOVA E, LIU K, SWANSON C, GAIDO KW. Dose-dependent effects on cell proliferation, seminiferous tubules, and male germ cells in the fetal rat testis following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Microsc Res Tech* 2009, **72** : 629-638

BORCH J, LADEFOGED O, HASS U, VINGGAARD AM Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod Toxicol* 2004, **18** : 53-61

BORCH J, DALGAARD M, LADEFOGED O. Early testicular effects in rats perinatally exposed to DEHP in combination with DEHA-apoptosis assessment and immunohistochemical studies. *Reprod Toxicol* 2005, **19** : 517-525

BOTELHO GG, GOLIN M, BUFALO AC, MORAIS RN, DALSENTER PR, MARTINO-ANDRADE AJ. Reproductive effects of di(2-ethylhexyl)phthalate in immature male rats and its relation to cholesterol, testosterone, and thyroxin levels. *Arch Environ Contam Toxicol* 2009, **57** : 777-784

CULTY M, THUILLIER R, LI W, WANG Y, MARTINEZ-ARGUELLES DB, et coll. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biol Reprod* 2008, **78** : 1018-1028

DAVID RM, MOORE MR, FINNEYDC, GUEST D. Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol Sci* 2000, **55** : 433-443

DRAKE AJ, VAN DEN DRIESCHE S, SCOTT HM, HUTCHISON GR, SECKL JR, et coll. Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology* 2009, **150** : 5055-5064

EMA M, MIYAWAKI E. Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. *Reprod Toxicol* 2001, **15** : 189-194

FERRARA D, HALLMARK N, SCOTT H, BROWN R, MCKINNELL C, et coll. Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 2006, **147** : 5352-5362

FISHER JS, MACPHERSON S, MARCHETTI N, SHARPE RM. Human testicular dysgenesis syndrome : a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003, **18** : 1383-1394

GAIDO KW, HENSLEY JB, LIU D, WALLACE DG, BORGHOFF S, et coll. Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 2007, **97** : 491-503

GRAY LE, JR., OSTBY J, FURR J, PRICE M, VEERAMACHANENI DN, et coll. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* 2000, **58** : 350-365

GRAY LE, JR., BARLOW NJ, HOWDESHELL KL, OSTBY JS, FURR JR, et coll. Transgenerational effects of di (2-ethylhexyl) phthalate in the male crl : cd(sd) rat : added value of assessing multiple offspring per litter. *Toxicol Sci* 2009, **110** : 411-425

HALLMARK N, WALKER M, MCKINNELL C, MAHOOD IK, SCOTT H, et coll. Effects of monobutyl and di(n-butyl) phthalate in vitro on steroidogenesis and Leydig cell aggregation in fetal testis explants from the rat : comparison with effects in vivo in the fetal rat and neonatal marmoset and in vitro in the human. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 390-396

HIGUCHI TT, PALMER JS, GRAY LE, JR., VEERAMACHANENI DN. Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicol Sci* 2003, **72** : 301-313

HOWDESHELL KL, FURR J, LAMBRIGHT CR, RIDER CV, WILSON VS, et coll. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development : altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicol Sci* 2007, **99** : 190-202

HOWDESHELL KL, RIDER CV, WILSON VS, GRAY LE JR. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res* 2008, **108** : 168-76

ITO Y, YOKOTA H, WANG R, YAMANOSHITA O, ICHIHARA G, et coll. Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch Toxicol* 2005, **79** : 147-154

ITO Y, YAMANOSHITA O, KURATA Y, KAMIJIMA M, AOYAMA T, et coll. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-related enzymes by di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) treatment in mice and rats, but not marmosets. *Arch Toxicol* 2007, **81** : 219-226

JOHNSON KJ, MCCAHAN SM, SI X, CAMPION L, HERRMANN R, et coll. The orl rat with inherited cryptorchidism has increased susceptibility to the testicular effects of in utero dibutyl phthalate exposure. *Toxicol Sci* 2008, **105** : 360-367

KELNAR CJ, MCKINNELL C, WALKER M, MORRIS KD, WALLACE WH, et coll. Testicular changes during infantile 'quiescence' in the marmoset and their gonadotrophin dependence : a model for investigating susceptibility of the prepubertal human testis to cancer therapy? *Hum Reprod* 2002, **17** : 1367-1378

KURATA Y, KIDACHI F, YOKOYAMA M, TOYOTA N, TSUCHITANI M, et coll. Subchronic toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate in common marmosets : lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia. *Toxicol Sci* 1998, **42** : 49-56

LEE BM, KOO HJ. Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates. *J Toxicol Environ Health A* 2007, **70** : 1365-1370

LEE KY, SHIBUTANI M, TAKAGI H, KATO N, TAKIGAMI S, et coll. Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology* 2004, **203** : 221-238

LEE E, KIM HJ, IM JY, KIM J, PARK H, et coll. Hypothyroidism protects di(n-butyl) phthalate-induced reproductive organs damage in Sprague-Dawley male rats. *J Toxicol Sci* 2008, **33** : 299-306

LIN H, GE RS, CHEN GR, HU GX, DONG L, et coll. Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105** : 7218-7222

LIN H, LIAN QQ, HU GX, JIN Y, ZHANG Y, et coll. In utero and lactational exposures to diethylhexyl-phthalate affect two populations of Leydig cells in male Long-Evans rats. *Biol Reprod* 2009, **80** : 882-888

MACLEOD DJ, SHARPE RM, WELSH M, FISKEN M, SCOTT HM, et coll. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl* 2010, **33** : 279-287

MAHOOD IK, SCOTT HM, BROWN R, HALLMARK N, WALKER M, SHARPERM. In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis : comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 55-61

MARTINO-ANDRADE AJ, MORAIS RN, BOTELHO GG, MULLER G, GRANDE SW, et coll. Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. *Int J Androl* 2009, **32** : 704-712

MCKINNELL C, MITCHELL RT, WALKER M, MORRIS K, KELNAR CJ, et coll. Effect of fetal or neonatal exposure to monobutyl phthalate (MBP) on testicular development and function in the marmoset. *Hum Reprod* 2009, **24** : 2244-2254

MILLAR MR, SHARPE RM, WEINBAUER GF, FRASER HM, SAUNDERS PT. Marmoset spermatogenesis : organizational similarities to the human. *Int J Androl* 2000, **23** : 266-277

MITCHELL RT, COWAN G, MORRIS KD, ANDERSON RA, FRASER HM, et coll. Germ cell differentiation in the marmoset (*Callithrix jacchus*) during fetal and neonatal life closely parallels that in the human. *Hum Reprod* 2008, **23** : 2755-2765

NAIR N, BEDWAL S, KUMARI D, BEDWAL S, BEDWAL RS. Effect on histological and sperm kinetics in DBP exposed Wistar rats. *J Environ Biol* 2008, **29** : 769-772

NORIEGA NC, HOWDESHELL KL, FURR J, LAMBRIGHT CR, WILSON VS, GRAY LE JR. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats. *Toxicol Sci* 2009, **111** : 163-178

PUGH G, JR., ISENBERG JS, KAMENDULIS LM, ACKLEY DC, CLARE LJ, et coll. Effects of di-isobutyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 2000, **56** : 181-188

SAILLENFAIT AM, SABATE JP, GALLISSOT F. Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat. *Reprod Toxicol* 2008, **26** : 107-115

SAILLENFAIT AM, SABATE JP, GALLISSOT F. Effects of in utero exposure to di-n-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. *Reprod Toxicol* 2009, **28** : 468-476

SCARANO WR, TOLEDO FC, GUERRA MT, DE CAMPOS SG, JUNIOR LA, et coll. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate :

proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicology* 2009, **262** : 215-223

SCOTT HM, HUTCHISON GR, JOBLING MS, MCKINNELL C, DRAKE AJ, et coll. Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology* 2008, **149** : 5280-5287

SHARPE RM, WALKER M, MILLAR MR, ATANASSOVA N, MORRIS K, et coll. Effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist administration on sertoli cell number and testicular development in the marmoset : comparison with the rat. *Biol Repro* 2000, **62** : 1685-1693

STROHEKER T, REGNIER JE, LASSURGUERE J, CHAGNON MC. Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate : distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture. *Food Chem Toxicol* 2006, **44** : 2064-2069

STRUVE MF, GAIDO KW, HENSLEY JB, LEHMANN KP, ROSS SM, et coll. Reproductive toxicity and pharmacokinetics of di-n-butyl phthalate (DBP) following dietary exposure of pregnant rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2009, **86** : 345-354

TOMONARI Y, KURATA Y, DAVID RM, GANS G, KAWASUSO T, et coll. Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on genital organs from juvenile common marmosets : I. Morphological and biochemical investigation in 65-week toxicity study. *J Toxicol Environ Health A* 2006, **69** : 1651-1672

VO TT, JUNG EM, DANG VH, JUNG K, BAEK J, et coll. Differential Effects of Flutamide and Di-(2-ethylhexyl) phthalate on Male Reproductive Organs in a Rat Model. *J Reprod Dev* 2009a, **55** : 400-411

VO TT, JUNG EM, DANG VH, YOO YM, CHOI KC, et coll. Di-(2 ethylhexyl) phthalate and flutamide alter gene expression in the testis of immature male rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2009b, **7** : 104

VOSS C, ZERBAN H, BANNASCH P, BERGER MR. Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 2005, **206** : 359-371

WANG X, SHANG L, WANG J, WU N, WANG S. Effect of phthalate esters on the secretion of prostaglandins (F2alpha and E2) and oxytocin in cultured bovine ovarian and endometrial cells. *Domest Anim Endocrinol* 2010, **39** : 131-136

WELSH M, SHARPE RM, WALKER M, SMITH LB, SAUNDERS PT. New insights into the role of androgens in wolffian duct stabilization in male and female rodents. *Endocrinology* 2009, **150** : 2472-2480

WOLFE, GW, LAYTONKA. Multigeneration reproduction toxicity study in rats : multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. TRC Study No. 7244-200. 2003. TherImmune Research Corporation, Gaithersbury, Maryland

YAMASAKI K, OKUDA H, TAKEUCHI T, MINOBE Y. Effects of in utero through lactational exposure to dicyclohexyl phthalate and p,p'-DDE in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett* 2009, **189** : 14-20

ZHU YJ, JIANG JT, MA L, ZHANG J, HONG Y, et coll. Molecular and toxicologic research in newborn hypospadiac male rats following in utero exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). *Toxicology* 2009, **260** : 120-125