

# Effets d'une exposition à la Vinclozoline et à la Génistéine de la gestation à l'âge adulte sur la fonction de reproduction du rat *Wistar* mâle : protocole et résultats préliminaires

Florence EUSTACHE<sup>1</sup>, Corinne LESAFFRE<sup>1</sup>, Marie Chantal CANNIVENC<sup>2</sup>, Pierre JOUANNET<sup>1</sup>, Jean Pierre CRAVEDI<sup>3</sup>, Jacques AUGER<sup>1</sup>

1 Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction, Groupe d'Etude de la Fertilité Humaine (GREFH), Université Paris V et Hôpital Cochin, Paris ;

2 INRA, UMR de Toxicologie Alimentaire, Dijon ; 3 INRA, UMR 1089 Xénobiotiques, Toulouse

## RESUME

Les perturbateurs endocriniens (EDs) présents dans l'environnement sont de plus en plus mis en cause pour expliquer les modifications de la fonction de reproduction mâle, y compris chez l'homme. Cependant, leurs mécanismes d'action sur la fonction de reproduction sont peu connus et le lien de causalité chez l'homme n'est pas démontré. Parmi les nombreuses études expérimentales rapportées, les conditions d'exposition sont le plus souvent très éloignées de la situation environnementale (doses élevées, courtes périodes d'exposition, une seule molécule). Le but de ce projet est d'étudier les effets d'une exposition à deux EDs isolés et associés : la génistéine, phyto-oestrogène et la vinclozoline, fongicide à activité antiandrogénique sur la fonction de reproduction du rat *Wistar* mâle. Pour chaque molécule, 2 doses ont été choisies : une dose élevée et une dose faible compatible avec des expositions environnementales, avec une administration par gavage de la conception à l'âge adulte. Le protocole prévoyait le sacrifice d'une partie des rats au sevrage et des rats adultes après accouplement, et les examens suivants : pesée des animaux et des organes, réserves spermatiques, histologie des organes de la reproduction et dosage des hormones sexuelles. De plus, une identification plus fine des effets reposera sur la morphométrie testiculaire, l'évaluation de la qualité nucléaire, du mouvement et du degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. A la

recherche des mécanismes possiblement en cause, il est prévu d'analyser les récepteurs hormonaux aux oestrogènes, androgènes, progestérogène et FSH et d'étudier des modifications de l'apoptose des cellules germinales.

L'élevage des animaux a pu être mené à bien et les premiers résultats ont été :

1. la mise en évidence d'anomalies du développement testiculaire, des vésicules séminales, des épидидymes et du pénis observées après exposition à de faible dose pour les composés testés et/ou leur combinaison ;

2. une diminution de la mobilité progressive et d'autres paramètres cinétiques observée dès les faibles doses pour les molécules isolées ou associées ;

3. une diminution des capacités de reproduction, surtout pour les mâles exposés à la faible dose de vinclozoline et à la combinaison avec la génistéine.

Ces résultats originaux nous incitent maintenant à préciser les effets au niveau tissulaire et cellulaire et à étudier certains des mécanismes possiblement en cause.

Correspondance :

Dr Florence Eustache - CECOS Necker, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris - Tel 01.44.49.46.52 - Fax 01.44.49.25.50 - Email [florence.eustache@nck.ap-hop-paris.fr](mailto:florence.eustache@nck.ap-hop-paris.fr)

**Mots clés :** *perturbateurs endocriniens, faible dose, association, appareil génital mâle, fertilité, spermatozoïdes*

## I. CONTEXTE

Au cours des dernières décennies, la détérioration croissante de la fonction de reproduction mâle a été rapportée dans de nombreuses espèces mammifères ou non (ambiguïté sexuelle, perturbations du sex-ratio, anomalies congénitales de la sphère génitale, retard pubertaire, déséquilibre hormonal, ...) [38, 11]. Chez l'homme et dans la plupart des pays industrialisés, on observe une incidence élevée du cancer du testicule, qui n'a fait que croître au cours des 20 dernières années [1] ainsi qu'une augmentation de l'incidence de l'hypospadias [26] et une possible augmentation de l'incidence de la cryptorchidie [39]. De plus, une baisse significative de la production spermatique a été rapportée [9, 4, 36]. On ne connaît pas les causes précises et probablement multiples de ces différentes observations qui évoquent le rôle probable de facteurs environnementaux. En effet, chez le mâle et pour de nombreuses espèces, la fonction de reproduction est très vulnérable aux facteurs environnementaux, qu'ils soient physiques ou chimiques. Parmi tous les composés chimiques susceptibles d'avoir une toxicité sur la fonction de reproduction, un certain nombre d'entre eux, qualifiés de xénohormones ou de perturbateurs endocriniens (EDs, selon la terminologie anglo-saxonne) car ils sont capables de simuler, favoriser ou inhiber l'action des hormones, sont plus suspects que d'autres car ils peuvent en théorie modifier les processus physiologiques soumis à une régulation endocrinienne et, en particulier, les fonctions de reproduction [3]. En réalité, il existe deux grandes catégories d'EDs : des composés synthétiques issus de l'industrie ou de l'agriculture présents dans l'environnement, comme certains agents plastifiants ou de nombreux pesticides, et, des molécules d'origine naturelle présentes dans les plantes (phyto-oestrogènes) ou les espèces fongiques (myco-estrogènes).

Après une exposition, généralement à des doses élevées d'EDs, au cours de la gestation et/ou en période néonatale, essentiellement chez le rat et la souris, des effets délétères variés sur l'appareil génital et la fonction de reproduction des petits, mâles et femelles sont objectivés [10]. Chez l'homme, à l'exception de rares études, par exemple les anomalies de la reproduction observées après exposition *in utero* au diethylstilbestrol, DES [15, 22], un lien causal entre une exposition environnementale à un composé chimique spécifique agissant *via* une perturbation endocrinienne et des effets pathologiques n'est pas clairement établi [32].

Les modalités et les mécanismes précis des effets délétères

des EDs sur la fonction de reproduction mâle ne sont que partiellement connus. Les EDs agiraient: 1) pendant la vie fœtale [17], 2) à la fin de la vie fœtale et en période néonatale sur la mise en place et la multiplication des cellules de Sertoli [31], 3) pendant la période néonatale et péripubertaire [37] et, 4) pendant la vie adulte avec une altération de la production, de la morphologie et de la mobilité spermatique [7, 25, 16]. De plus, à tous les stades du développement, des modifications hormonales ont pu être observées [31, 24, 41].

Les altérations hormonales induites par les EDs peuvent concerner des modifications des taux d'hormones tissulaires, des modifications de l'expression des récepteurs et des actions diverses au niveau des récepteurs (agoniste, antagoniste,...). La littérature récente indique que le niveau d'expression des récepteurs aux oestrogènes (ERa) aux androgènes (AR), et à la progestérone (PR) peut être modulé en fonction de la présence ou non d'EDs [20, 43].

L'altération de la mise en place et de la multiplication des cellules de Sertoli pourrait être responsable d'une baisse de la production spermatique à l'âge adulte [31], mais cette dernière pourrait aussi dépendre d'autres phénomènes. En effet, plusieurs études expérimentales récentes chez la souris et chez le rat adulte ont montré que des modifications hormonales comme l'inhibition de la GnRH ou de la testostérone, l'immuno-neutralisation de la FSH et de la LH ou encore l'exposition à des EDs provoquaient une augmentation de l'apoptose des cellules germinales testiculaires [6, 33, 35, 13]. Finalement, des travaux récents ont indiqué que certains EDs pouvaient exercer des effets délétères par de nombreux autres mécanismes n'impliquant pas les récepteurs hormonaux [2, 29, 23].

Pour une majorité d'études, les conditions d'exposition aux EDs sont très éloignées de la situation environnementale et ne permettent pas une évaluation objective du risque : périodes courtes d'exposition, principalement pendant la période de gestation et/ou néonatale, administration d'EDs souvent par injection, doses élevées, et très rares études faisant état de l'effet d'un mélange d'EDs.

C'est pourquoi, les directives les plus récentes des institutions nationales et intergouvernementales (EPA, OMS, OCDE, Communauté Européenne,...) ont recommandé de s'attacher à étudier, maintenant et de manière urgente par des approches diversifiées, les effets potentiels des EDs dans des situations plus proches des situations d'exposition environnementale.

Nous avons initié la présente étude dans cette perspective. Ses objectifs principaux étaient :

1. le développement d'un modèle animal d'exposition à des EDs en adéquation avec les expositions environnementales humaines (voie orale, faibles niveaux d'expo-

sition, périodes d'exposition touchant tous les stades du développement, combinaisons d'EDs) :

2. l'étude des effets produits sur la fonction de reproduction des animaux exposés ainsi que celle des mécanismes cellulaires et moléculaires possiblement en cause.

Le présent article résume le protocole d'exposition mis en œuvre, les axes de recherche envisagés et rapporte les premiers résultats obtenus.

## II. PROTOCOLE

### 1. Choix des molécules et doses

Le choix des deux molécules étudiées a été fait notamment en fonction des données scientifiques déjà acquises, de la pertinence par rapport aux données d'exposition naturelle et environnementale ainsi que des priorités d'études recommandées par les institutions intergouvernementales. C'est ainsi que notre choix s'est porté sur la vinclozoline et la génistéine. La vinclozoline est un fongicide ayant des propriétés antiandrogéniques, c'est à dire un «potentiel démasculinisant» [19, 20]. Récemment, ce composé a été retrouvé à des concentrations allant de 0,5% jusqu'à 75% dans 92 produits alimentaires en Italie [28]. L'effet antiandrogénique de la vinclozoline est dû principalement à la formation de deux métabolites actifs capables de se lier au récepteur aux androgènes. Certains stades du développement embryonnaire des organes hormono-dépendants sont particulièrement sensibles aux effets de la vinclozoline, comme l'ont bien montré les travaux de Gray et collaborateurs [18] et le récent article de Wolf et al. [42]. La génistéine est un isoflavonoïde notablement oestrogénique [8] et donc «potentiellement féminisant». Cette molécule est surtout abondante dans les légumineuses (soja, pois, lentilles, fève,...). En Europe, l'homme y est plus fortement exposé lors d'une alimentation à base de produits dérivés du soja (0,1-3mg/kg/jour). Les laits de soja de plus en plus employés dans l'alimentation des nourrissons représentent des expositions plus élevées encore (2-5mg/kg/jour) [5]. Si les effets de la génistéine sur l'appareil endocrinien et la protection qu'elle assure dans le cas de cancers hormonaux-dépendants ont été très étudiés, seuls de rares travaux ont indiqué un effet délétère sur la fonction de reproduction mâle [40, 30, 12]. Il est à noter : 1) que la génistéine est métabolisée en equol, puissant composé oestrogénique, et 2) que l'exposition néonatale à la génistéine diminue l'expression des récepteurs ER $\alpha$  et AR dans les testicules de souris adultes [34]. Ainsi, la présence d'une telle substance dans l'alimentation pourrait interagir avec d'autres EDs.

S'inspirant de la littérature, une dose faible et une dose forte ont été déterminées pour les 2 molécules. Ces doses ont été appliquées soit de manière isolée soit en association

de faibles doses et de fortes doses avec un témoin négatif (véhicule seul) et un témoin positif pour la génistéine (ethynyl œstradiol à 0,1 $\mu$ g/kg/j). Les doses élevées étaient 30 mg/kg/jour et 10 mg/kg/jour, pour la vinclozoline (V) et la génistéine (G) respectivement, et les doses faibles étaient 1mg/kg/jour pour la vinclozoline (v) et la génistéine (g).

### 2. Animaux et protocole d'exposition

L'élevage et l'exposition par gavage ont été faits chez le rat *Wistar* à l'INRA de Dijon et le protocole développé (Figure 1) s'inspirait des directives les plus récentes de l'OCDE en matière de nombre d'animaux étudiés, de méthodologie de suivi et de tests de toxicologie de la reproduction à faire. Il est à noter que l'alimentation était dépourvue de tout EDs.

### 3. Etude des effets produits et axes de recherche

Les examens et les gestes au moment des sacrifices étaient ceux habituellement employés en toxicologie de la reproduction : pesée des animaux, inspection générale et de la sphère génitale, pesée des organes tels que testicules, épididymes, vésicules séminales, prostate et d'un organe de référence comme le foie, fixation d'une partie d'entre eux dans du formaldéhyde à 1% et congélation du reste à -80°C.

Concernant l'exploration des effets produits, l'étude prévoyait tout d'abord des tests classiques en toxicologie de la reproduction, essentiellement la mesure des réserves spermatiques, l'histologie conventionnelle des organes de la reproduction et le dosage des hormones sexuelles. L'évaluation des réserves spermatiques testiculaires et épididymaires est réalisée à partir de prélèvements conservés à -80°C, après broyat cellulaire, sonication, comptage des spermatozoïdes par hémocytométrie et mesure par CASA (computer assisted sperm analysis, coloration des noyaux par le bisbenzimidazole). L'examen histologique des testicules, des épididymes, des vésicules séminales et de la prostate est fait en microscopie conventionnelle après coloration à l'Hemalun Eosine Safran (HES). La mesure des concentrations plasmatiques des hormones régulant la fonction de reproduction mâle (FSH, LH, testostérone) et de l'inhibine B, marqueur de la fonction sertolienne, est faite à partir de prélèvements sanguins au niveau de l'aorte intra-abdominale sur chaque animal au moment du sacrifice (à J25 et J80).

Les autres examens prévus pour juger des effets des expositions sur la sphère génitale des rats mâles sont l'analyse de la morphométrie du testicule, de la qualité nucléaire et du mouvement des spermatozoïdes. La morphométrie testiculaire par analyse d'image semi-automatique sur système SAMBA doit permettre de quantifier par exemple le nombre de cellules de Sertoli ou encore le diamètre des tubules.

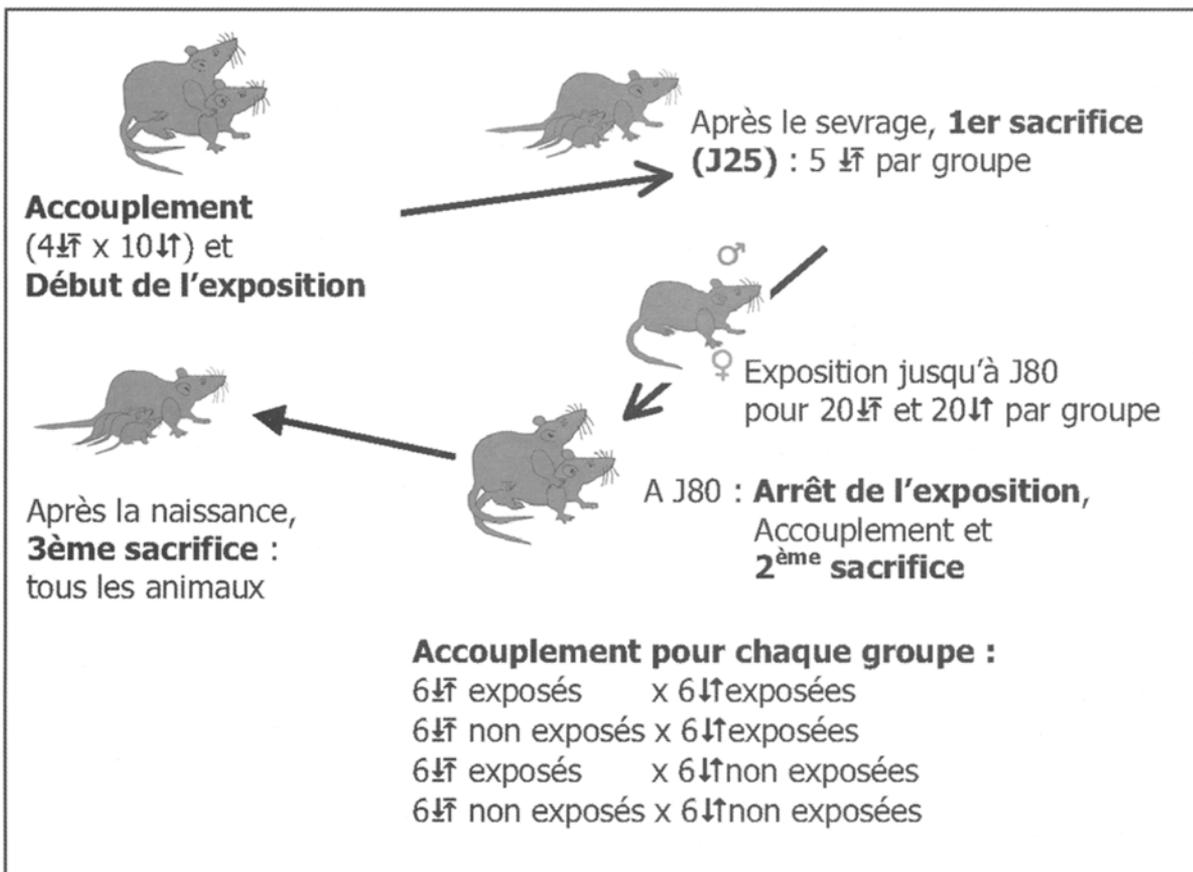


Figure 1 : Protocole d'exposition.

Elle peut aussi permettre le comptage des différents types de cellules germinales en fonction de la ploïdie, également par analyse d'image sur coupes en paraffine après coloration de Feulgen [21]. Nous avons développé une méthode d'analyse morphométrique et texturale des têtes des spermatozoïdes de rat par analyse d'image sur système SAMBA (publication en cours). Cette méthode est donc applicable pour étudier les spermatozoïdes dans la présente étude (frottis faits à partir de spermatozoïdes prélevés au niveau du canal déférent et colorés par le bisbenzimidazole). Enfin, il était prévu d'étudier la mobilité et les paramètres du mouvement des spermatozoïdes par CASA immédiatement après le sacrifice et la dissection des canaux déférents. Il était de plus envisagé d'étudier si les expositions ont une incidence sur le degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par la technique TUNEL.

Selon les hypothèses de travail fondées sur les données rapportées dans la littérature (voir Contexte), nous nous sommes proposés d'étudier certains mécanismes cellulaires pouvant contribuer aux effets observés. Ainsi, nous avons prévu de mettre en évidence et de quantifier les récepteurs hormonaux aux oestrogènes, ERa et ERb aux androgènes, AR, à la progestérone, PR, et à la FSH, RFSH, grâce à des techniques d'immunohistochimie sur coupe en

paraffine ou congelée. Les anticorps spécifiques utilisés seront des anticorps de lapin dirigés contre ERa ou ERb ou AR ou PR ou encore RFSH. La fixation sera révélée par un deuxième anticorps anti-IgG de lapin dans un système avidin-biotin-peroxydase [27]. Les testicules, épидидymes, vésicules séminales et la prostate seront analysés. La quantification des récepteurs se fera à l'aide d'une méthode d'analyse d'image [14].

Une seconde piste dans ce travail concerne des modifications de l'apoptose physiologique des cellules germinales et certaines de ses voies. L'évaluation de la fragmentation de l'ADN des cellules germinales sera faite en utilisant la technique TUNEL sur coupe en paraffine. Le nombre de cellules marquées sera quantifié par unité de surface à l'aide de l'analyseur d'image. La caspase 3 activée, deuxième marqueur de l'apoptose, sera mise en évidence à l'aide d'une technique d'immunohistochimie en utilisant un anticorps anti-caspase 3 activée. La fixation sera révélée par un deuxième anticorps anti-IgG de lapin dans un système avidin-biotin-peroxydase. Le nombre de cellules marquées sera quantifié par unité de surface à l'aide de l'analyseur d'image. La détection des protéines Fas et FasL sur coupes testiculaires se fera en utilisant des techniques d'immunohistochimie à l'aide d'anticorps anti-Fas et anti-FasL. La

fixation sera révélée par un deuxième anticorps anti-IgG de lapin dans un système avidin-biotin-peroxydase. Le nombre de cellules marquées sera quantifié par unité de surface à l'aide de l'analyseur d'image.

#### IV. PREMIERS RESULTATS

(Abbréviations utilisées : g : génistéine faible dose, G : génistéine forte dose, v : vinclozoline faible dose, V : vinclozoline forte dose, gv : association à faible dose, GV : association à forte dose, C : témoin négatif, EE : ethynyl œstradiol ; différents effets ont été notés chez les femelles mais nous ne rapportons dans le présent article que les résultats relatifs aux effets observés chez les mâles ou médiés par les mâles).

Tout d'abord, la faisabilité du modèle a été démontrée. Les différentes modalités d'exposition n'ont pas eu de conséquences importantes sur l'état général des animaux permettant de mener le protocole jusqu'à son terme (mise bas des petits de deuxième génération) avec un nombre d'animaux compatible avec des analyses statistiques.

##### 1. Effets des expositions *in utero* sur la fertilité et la descendance (premier accouplement)

Les taux de femelles gestantes étaient comparables parmi les témoins et les groupes exposés à un seul composé chimique (de 60 à 100%) ; par contre, ces taux étaient inférieurs lorsque les composés étaient associés à faible dose (gv : 1 femelle sur 2 non gestante). La taille de la portée était similaire dans tous les cas de figure (9 à 11 petits en moyenne). Le nombre de petits morts à la naissance était significativement augmenté par rapport au contrôle (< 1% pour les groupes g, 14,1% (p < 0,01) et V, 5,4% (p < 0,10).

##### 2. Anomalies du développement sexuel et génital observées à J25 et à J80

A J25, un hypospadias et une ectopie testiculaire n'ont été observés que dans le groupe V (2/5 et 1/5, respectivement) ; dans les groupes v et gv, des kystes épидидymaires ont été objectivés (1/5 dans les 2 cas). Concernant le développement des organes génitaux externes, un pénis très peu développé et une ambiguïté sexuelle ont été observés respectivement dans les groupes v et GV; le stade de développement du pénis à J25 était moins avancé pour les groupes v, gv, G et EE. A J80, un hypospadias a été observé dans les seuls groupes V, GV et EE (respectivement, 20,8%, 13,3% et 11,1%) et une ectopie testiculaire a été trouvée dans deux groupes, G et V (15,8% et 8,3%) ; les kystes épидидymaires ont été objectivés pour le groupe gv (18,8%) ; les autres anomalies observées concernaient uniquement le groupe V ; il s'agissait d'agénésies déférentiel-

les, de vésicules séminales et d'épididymes malformés et d'un aspect ambigu des organes génitaux externes (anomalie observée dans 2/24 cas).

##### 3. Poids des animaux et poids relatifs des organes reproducteurs et du foie à J25

Par rapport au groupe C, les animaux exposés *in utero* à EE étaient significativement plus lourds (p < 0,01) et ceux exposés *in utero* à v et gv, significativement moins lourds (p < 0,05 dans les deux cas) ; les animaux des groupes g, G, gv et GV avaient un poids significativement plus faible (p < 0,01) que ceux exposés à EE; pour la vinclozoline, les animaux exposés à la faible dose avaient un poids significativement plus faible (p < 0,05) que ceux exposés à la forte dose. Les résultats concernant les poids relatifs des testicules épидидymes, vésicules séminales et foie sont présentés dans la Figure 2.

##### 4. Poids des animaux et poids relatifs des organes reproducteurs et du foie à J80

Les animaux exposés à g, G, GV et EE avaient un poids significativement plus élevé par rapport à ceux du groupe C (p < 0,001, p < 0,05, p < 0,01, p < 0,05, respectivement).

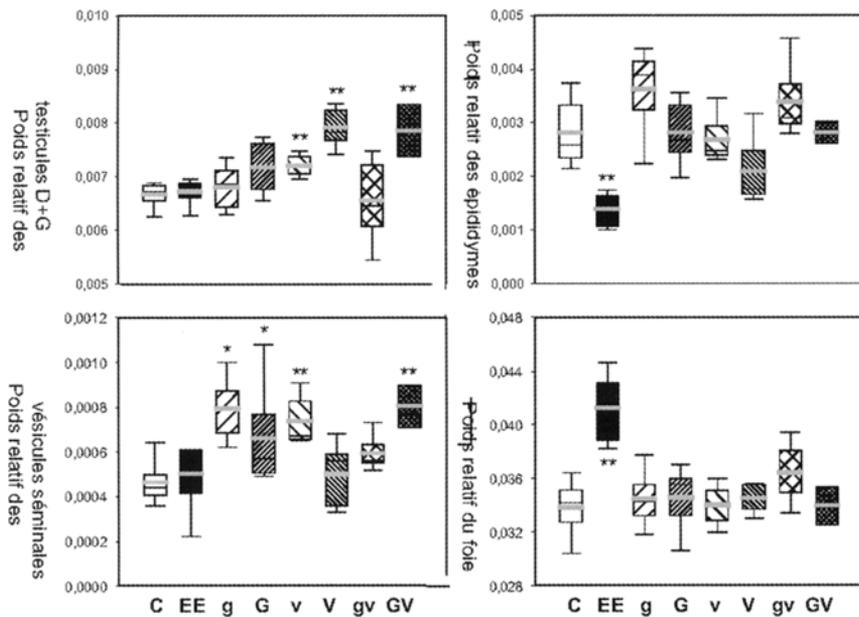
En comparaison au groupe C, le poids relatif des testicules était significativement plus élevé pour le groupe GV (p < 0,01) uniquement et les poids relatifs des épидидymes étaient similaires dans tous les groupes. Par contre, le poids relatif des vésicules séminales était significativement plus bas pour les groupes V (p < 0,01), gv (p < 0,05) et GV (p < 0,05) et le poids relatif de la prostate était significativement diminué pour les groupes V (p < 0,05) et GV (p < 0,05). Enfin, le poids relatif du foie n'était modifié (augmentation) que pour le groupe G (p < 0,05).

##### 5. Effets sur la mobilité et le mouvement des spermatozoïdes prélevés à J80

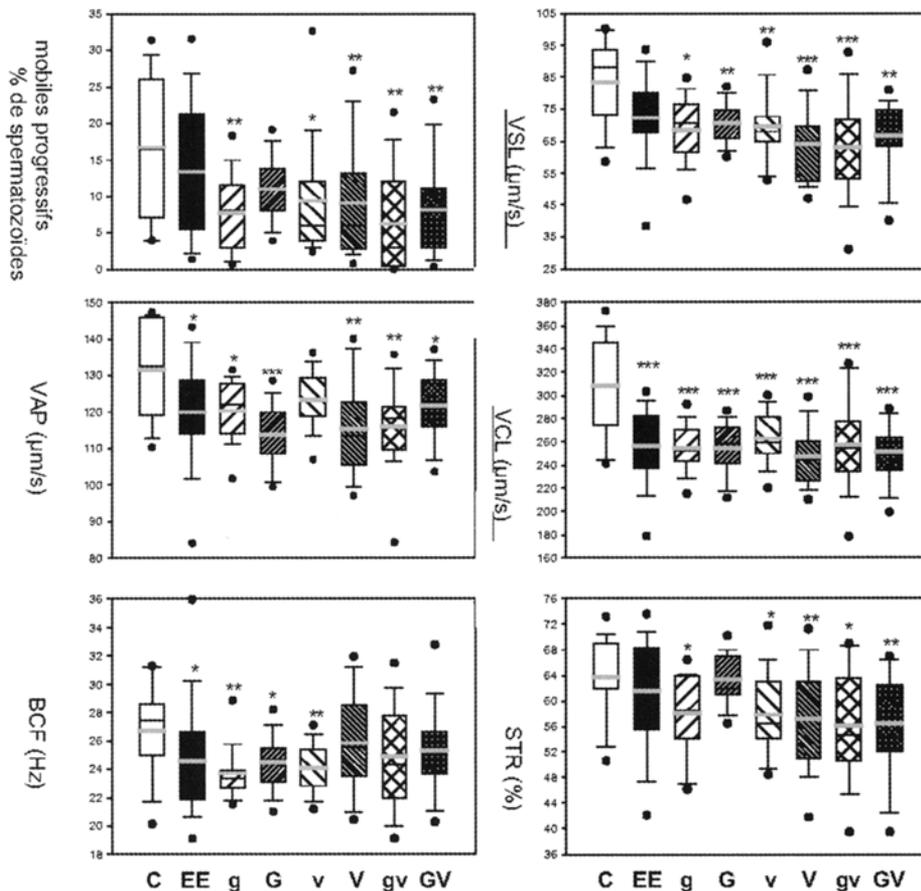
Des baisses significatives du pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs et des anomalies de certains paramètres du mouvement ont été trouvées (Figure 3).

##### 6. Effets sur la fertilité et la descendance des animaux mâles exposés *in utero* jusqu'à J80 (2ème accouplement)

Le mating index (nombre de mâles ayant fécondé/ nombre de mâles accouplés) était diminué pour les groupes v et gv, la taille des portées étaient significativement plus petite pour les groupes g et G et gv et GV et les pertes post-implantatoires, [(nombre total d'implantations - nombre d'implantations ayant donné des petits) / nombre total d'implantations], étaient augmentées dans tous les groupes traités (Figure 4).



**Figure 2 :** Distribution du poids relatif des organes à J25 dans les différents groupes. Moyenne ; \* :  $p < 0,05$  et \*\* :  $p < 0,01$  par rapport au groupe témoin. g : génistéine faible dose ; G : génistéine forte dose ; v : vinclozoline faible dose ; V : vinclozoline forte dose ; gv : association à faible dose ; GV : association à forte dose ; C : témoin négatif ; EE : ethynyl œstradiol.



**Figure 3 :** Distribution de la mobilité et des caractéristiques du mouvement à J80 dans les différents groupes. Moyenne ; \* :  $p < 0,05$  et \*\* :  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe témoin. g : génistéine faible dose ; G : génistéine forte dose ; v : vinclozoline faible dose ; V : vinclozoline forte dose ; gv : association à faible dose ; GV : association à forte dose ; C : témoin négatif ; EE : ethynyl œstradiol ; VSL : vitesse de progression linéaire ; VAP : vitesse moyenne ; VCL : vitesse curvilinéaire ; BCF : fréquence de croisement ; STR : rectitude de la trajectoire.

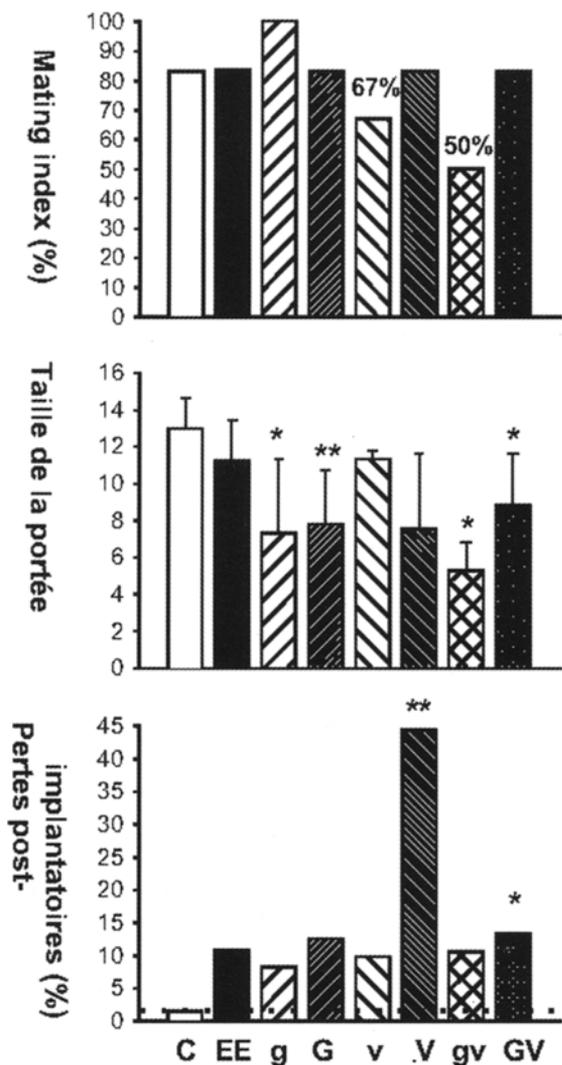


Figure 4 : Fertilité après croisement mâle exposé x femelle non exposée (6x6 par groupe).

\* :  $p < 0,05$  et \*\* :  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe témoin.

g : génistéine faible dose ; G : génistéine forte dose ; v : vinclozoline faible dose ; V : vinclozoline forte dose ; gv : association à faible dose ; GV : association à forte dose ; C : témoin négatif ; EE : ethynyl œstradiol ; matin index : nombre de mâles ayant fécondé/nombre de mâles accouplés ; pourcentage de perte post-implantatoire : nombre total d'implantations – nombre d'implantations ayant donné des petits / nombre total d'implantations.

## V. CONCLUSION

Ces résultats originaux nous incitent maintenant à préciser les effets au niveau tissulaire et cellulaire dans les différents organes prélevés et à étudier certains des mécanismes possiblement en cause.

## Remerciements :

Nous remercions la SALF de son intérêt pour cette étude et de son soutien financier au responsable du projet (FE).

## REFERENCES

- ADAMI H., BERGSTROM R., MOHNER M., et al. : Testicular cancer in nine northern european countries. *Int. J. Cancer*, 1994, 59 : 33-38.
- ADLERCREUTZ H., BANNWART C., WAHALA K., et al. : Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and iso-flavonoid phytoestrogens. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 1993, 44 : 147-153.
- AMARAL MENDES J.J. : The endocrine disrupters : a major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.*, 2002, 40 : 781-788.
- AUGER J., KUNSTMANN J.M., CZYGLIK F., JOUANNET P. : Decline in semen quality among fertile men in Paris during the last 20 years. *New Engl. J. Med.*, 1995, 332 : 281-285.
- BENNETAU-PELISSERO C. : Les phytoestrogènes dans l'alimentation et la thérapie: discussion. *Cah. Nutr. Diét.*, 2001, 36 : 25-38.
- BILLIG H., FURUTA I., RIVIER C., et al. : Apoptosis in testis germ cells : developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology*, 1995, 136, 1 : 5-12.
- BOOCKFOR FR., BLAKE C.A. : Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes of male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. *Biol. Reprod.*, 1997, 57 : 267-277.
- BREINHOLT V., HOSSAINI A., SVENDSEN G.W., et al. : Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor distribution, metabolism and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38 : 555-564.
- CARLSEN E., GIWERCMAN A., KEIDING N., SKAKKEBAEK N.E. : Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.*, 1992, 305 : 609-613.
- DAMGAARD I.N., MAIN K.M., TOPPARI J., SKAKKEBAEK N.E. : Impact of exposure to endocrine disrupters in utero and in childhood on adult reproduction. *Baillière's Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002, 16 : 289-309.
- DASTON G.P., GOOCH J.W., BRESLIN W.J. et al. : Environmental estrogens and reproductive health : a discussion of the human and environmental data. *Reprod. Toxicol.*, 1997, 11 : 465-481.
- DELLOS K.B., BUCCI J.C., LOMAX L.G., et al. : Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD [Sprague-Dawley] rats. *Reprod. Toxicol.*, 2001, 15 : 647-663.
- EUSTACHE F., AUGER J., JOUANNET P. : Effets de deux perturbateurs endocriniens, la *p,p'*-DDE et le BBP, sur la fonction testiculaire et l'ADN des cellules germinales chez la souris. *Hypothèses*, 2002, 5 : 19-22.

14. FURUKAWA Y., KIMIJIMA I., ABE R. : Immunohistochemical image analysis of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer*, 1998, 25 : 375-380.
15. GILL G.W., SCHUMACHER G.F.B., BIBBO M., et al. : Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *J. Urol.*, 1979, 122 : 36-39.
16. GOYAL H.O., BRADEN T.D., MANSOUR M., et al. : Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biol. Reprod.*, 2001, 64 : 927-934.
17. GRAY L.E. Jr. : Xenoendocrine disrupters : laboratory studies on male reproductive effects. *Toxicol. Lett.*, 1998, 102-103 : 331-335.
18. GRAY L.E. Jr, OSTBY J., MONOSSON E., KELCE W.R. : Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Ind. Health*, 1999, 15 : 48-64.
19. KELCE W.R., STONE C.R., LAWS S.C., GRAY L.E., KEMPAINEN J.A., WILSON E.M. : Persistent DDT metabolite *p,p'*-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 1995, 375 [6532] : 581-585.
20. KELCE W.R., LAMBRIGHT C.R., GRAY L.E. Jr, ROBERTS K.P. : Vinclozolin and *p,p'*-DDE alter androgen-dependent gene expression : *in vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, 142 : 192-200.
21. KIM E.D., LIN W.W., ABRAMS J., LIPSHULTZ L.I. : Testis biopsy image analysis effectively quantifies spermatogenic cell types. *J. Urol.*, 1997, 157 : 147-150.
22. KLIP H., VERLOOP J., VAN GOOL J.D., KOSTER M.E.T.A., BURGER C.W., VAN LEEUWEN F.E. : Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol *in utero*: a cohort study. *Lancet*, 2002, 359 : 1102-1107.
23. LUCONI M., FORTI G., BALDI E. : Genomic and nongenomic effects of estrogens : molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2002, 80 : 369-381.
24. MONOSSON E., KELCE W.R., LAMBRIGHT C., et al. : Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol. Ind. Health*, 1999, 15 : 65-79.
25. OKAHARA A., NOMURA A., TANIOKA H., et al. : Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats: effects of repeated doses of flutamide for 2 and 4 weeks. *J. Toxicol. Science*, 2000, 25 : 63-70.
26. PAULOZZI L.J., ERICKSON D., JACKSON R.J. : Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics*, 1997, 100 : 831-834.
27. PELLETIER G. : Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol. Histopathol.*, 2000, 15 : 1261-1270.
28. PETRELLI G., MANTOVANI A. : Environmental risk factors and male fertility and reproduction. *Contraception*, 2002, 65 : 297-300.
29. SANDERSON J.T., BOERMA J., GIDEON W. A. et al. : Induction and inhibition of aromatase [CYP19] activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2002, 182 : 44-54.
30. SANTTI R., MÄKELÄ S., STRAUSS L., et al. : Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. *Toxicol. Ind. Health*, 1998, 14 : 223-237.
31. SHARPE R.M. : Environmental oestrogens and male infertility. *Pure Appl. Chem.*, 1998, 70 : 1685-1701.
32. SHARPE R.M. : The 'oestrogen hypothesis' – where do we stand now ? *Int. J. Androl.*, 2003, 26 : 2-15.
33. SHETTY J., MARATHE G.K., DIGHE R.R. : Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology*, 1996, 137 : 2179-2182.
34. SHIBAYAMA T., FUKATA H., SAKURAI K. et al. : Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. *Endoc. J.*, 2001, 48 : 655-663.
35. SINHA HIKIM A.P., RAJAVASHISTH T.B., SINHA HIKIM I. et al. : Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotrophin deprivation. *Biol. Reprod.*, 1997, 57 : 1193-1201.
36. SWANN S.H., ELKIN E.P., FENSTER L. : Have sperm densities declined ? A reanalysis of global trend data. *Environ. Health Perspec.*, 1997, 105 : 1228-1232.
37. TEILMANN G., JUUL A., SKAKKEBAEK N.E., TOPPARI J. : Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human. *Best Practice Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 16, 105-121.
38. TOPPARI J., LARSEN J.C., CHRISTIANSEN P. et al. : Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104, Suppl 4, 741.
39. TOPPARI J., KAVELA M., VIRTAINEN H.E. : Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias and methodological limitations of registry-based data. *Hum. Reprod. Update*, 2001, 7 : 282-286.
40. VERDEAL K., RYAN R.S. : Naturally occurring estrogens in plant foodstuffs. A review. *J. Food Protect.*, 1979, 42 : 577-583.
41. WEBER K.B., SETCHELL K.D.R., STOCCO D.M., LEPHART E.D. : Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 $\alpha$ -reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J. Endocrinol.*, 2001, 170 : 591-599.
42. WOLF C.J., LEBLANC G.A., OSTBY J.S., GRAY, L.E., Jr. : Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. *Toxicol. Sciences*, 2000, 55 : 152-161.
43. WILLIAMS K., FISHER J.S., TURNER K.J., et al. : Relationship between expression of sex steroid receptors and structure of the seminal vesicles after neonatal treatment of rats with potent or weak estrogens. *Environ. Health Perspect.*, 2001, 109 : 1227-1235.

## ABSTRACT

**Reproductive effects of chronic exposure (from conception to adulthood) to low concentrations of genistein and vinclozolin in male Wistar rats: protocol and preliminary results**

**Florence EUSTACHE, Corinne LESAFFRE, Marie Chantal CANNIVENC, Pierre JOUANNET, Jean Pierre CRAVEDI, Jacques AUGER**

Current evidence indicates that endocrine disrupters (EDs) can induce adverse effects on the male reproductive tract in various mammalian species. Recent reports indicate deterioration in male reproductive health in several human populations, but the evidence for a causal link with endocrine disruption is still weak. In addition, the experimental conditions of most of the reported *in vivo* studies are not representative of environmental exposures (for example, high doses, short-term exposure, a single ED) and the mechanisms by which EDs disrupt the reproductive system are poorly understood. The objective of the present study is to develop an animal model to assess the reproductive effects and study the putative cellular and molecular mechanisms involved after exposure to genistein (phytoestrogen) and vinclozolin (fungicide with a known antiandrogenic potential) alone or in combination. The study will be performed in male Wistar rats, with administration of low and high doses of the compounds from conception to adulthood and a subset of the males in each treatment group will be mated with unexposed females. We plan to assess the level of sperm production, histology of the reproductive organs, motility and morphometry of spermatozoa and hormone levels, as well as DNA fragmentation of spermatozoa and determination of the number of germ cells, Sertoli cells and the diameters of seminiferous tubules. Estrogen, androgen, progesterone and FSH receptors will be detected and quantified and the level of testicular apoptosis and several apoptosis pathways will be studied to determine the putative cellular and molecular mechanisms involved. The preliminary results confirmed the developmental effects previously reported for high doses of vinclozolin. More interestingly, they indicated a number of deleterious effects for male rats exposed to low dosages alone or mixtures of low and high dosages compared to controls and rats exposed to high dosages alone. For example, a number of developmental anomalies of the genitalia were observed and a significant decrease of sperm motility and motion and fertilizing ability were observed. These preliminary results provide evidence that chronic exposure to

environmental levels of EDs or mixtures of EDs have a detrimental impact on the male reproductive tract. The next step involves assessment of the anatomical disorders and the study of some of the cellular and molecular mechanisms possibly involved.

**Key-Words:** *endocrine disrupters, low dosage, mixtures, male fertility, reproductive tract, spermatozoa*