

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Sciences de la Santé

Ecole doctorale Vie, Agro, Santé

présentée par

Charline Warembourg

Préparée à l'unité de recherche INSERM U1085 Irset
(Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail)

**Perturbation
endocrinienne
pendant la grossesse
et anomalies précoces
du système
reproducteur :
Analyses à partir de
cohortes mère-enfant**

**Thèse soutenue à Rennes
le 14 décembre 2016**

devant le jury composé de :

Véronique BACH

PU, Université d'Amiens / *rapporteur*

Virginie MIGEOT

PU-PH, Université de Poitiers / *rapporteur*

Régis HANKARD

PU-PH, Université de Tours / *examineur*

Bernard JEGOU

Directeur de recherche INSERM, UMR 1085 Irset /
examineur

Sylvaine CORDIER

Directrice de recherche INSERM émérite, UMR
1085 Irset / *directeur de thèse*

Ronan GARLANTEZEC

MCU-PH, Université de Rennes 1 / *co-directeur de
thèse*

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes directeurs de thèse, Sylvaine Cordier et Ronan Garlandézec, pour leur disponibilité tout au long de ce travail, leurs qualités pédagogiques et scientifiques, et leur sympathie. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude pour tout ce qu'ils m'ont appris et la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je remercie également Bernard Jégou, directeur de l'Institut de recherche en Santé, Environnement et Travail (Irset), de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire depuis maintenant près de 6 ans.

Merci à Véronique Bach et Virginie Migeot, d'avoir accepté de consacrer du temps à la lecture critique de ce manuscrit et d'en être les rapporteurs. Merci à Régis Hankard, et une nouvelle fois à Bernard Jégou, d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je souhaite également adresser mes remerciements aux membres de mon comité de thèse, Nicole Le Moual et Marie-Josèphe Saurel-Cubizolles, et à mon tuteur de thèse, Denis Bard, pour les conseils qu'ils m'ont apportés.

Je remercie les membres de l'équipe 9 de l'Irset pour leurs différentes contributions mais aussi pour leur disponibilité, leur soutien et toutes ces choses qui font qu'il est particulièrement agréable de travailler à leurs côtés : Christine Monfort, Nathalie Costet, Mélanie Bertin, Rémi Béranger, Luc Multigner, Nathalie Bonvallot, Tania Serrano, Fabienne Pelé, Florence Rouget. Un grand merci tout particulier à Cécile Chevrier, qui m'a fait découvrir l'épidémiologie environnementale et qui participe, depuis le master, au développement de mon projet professionnel.

Je remercie l'ensemble des familles des cohortes PELAGIE et EDEN ainsi que les professionnels de santé ayant contribué à leur recrutement. Je remercie mes co-auteurs pour leur contribution et leurs conseils avisés.

Je remercie également le Réseau doctoral en Santé Publique animé par l'Ecole des hautes études en Santé Publique (EHESP) pour m'avoir offert l'accès à ses formations.

Enfin, je remercie mes proches, et particulièrement Romain et mes parents, pour leur soutien et Cécile pour sa relecture attentive de ce manuscrit.

Valorisation des travaux de thèse

Articles

Warembourg C, Debost-Legrand A, Bonvallet N, Massart C, Garlantézec R, Monfort C, Gaudreau E, Chevrier C, Cordier S. Exposure of pregnant women to persistent organic pollutants and cord sex hormone levels. *Hum Reprod*. 2016 Jan;31(1):190-8

Warembourg C, Botton J, Lelong N, Rouget F, Khoshnood B, Le Gléau F, Monfort C, Labat L, Pierre F, Heude B, Slama R, Multigner L, Charles MA, Cordier S, Garlantézec R. Prenatal exposure to glycol ethers and cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. [En révision dans *Hum Reprod*]

Warembourg C, Binter AC, Cordier S, Giton F, Fiet J, Monfort C, Chevrier C, Multigner R, Garlantézec R. Prenatal exposure to glycol ethers and cord sex hormone levels. [En preparation]

Communications orales

Warembourg C, Cordier S, Giton F, et al. Prenatal Exposure To Glycol Ethers And Sex Hormone Levels In Cord Blood. *International Society of Environmental Epidemiology Conference*, São Paulo, Brésil, Août 2015.

Warembourg C, Debost-Legrand A, Massart C, et al. Prenatal Exposure to Persistent Organic Pollutants and Sex Hormone Levels in Cord Blood. *International Society of Environmental Epidemiology Conference*, Seattle, Etats-Unis, Août 2014.

Warembourg C, Botton J, Lelong N, et al. Prenatal exposure to glycol ethers and male genital anomalies. 7^e *Rencontres Scientifiques du Réseau Doctoral en Santé Publique*, Paris, France, Mars 2016.

Warembourg C, Cordier S, Giton F, et al. Prenatal exposure to glycol ethers and risk of congenital anomalies. 4th *day of young researcher of Irset*, Rennes, France, Décembre 2015.

Communications affichées

Warembourg C, Botton J, Lelong N, et al. Prenatal exposure to glycol ethers and cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *International Society of Environmental Epidemiology Conference*, Rome, Italie, Août 2016.

Warembourg C, Cordier S, Giton F, et al. Prenatal Exposure To Glycol Ethers And Sex Hormone Levels In Cord Blood. *International Society of Environmental Epidemiology Conference - Young Researcher Europe*, Utrecht, Pays-Bas, Novembre 2015.

Autres contributions

Articles

Warembourg C, Cordier S, Garlantézec R. An Update Systematic Review of Fetal Death, Congenital Anomalies, and Fertility Disorders among Health Care Workers. [En révision dans *Am J Ind Med*]

Glorennec P, Serrano T, Fravallo M, **Warembourg C**, et al. Determinants of children's exposure to pyrethroid insecticides in urban and rural areas in France [En révision dans *Env Int*]

Viel JF, Rouget F, **Warembourg C**, et al. Behavioral disorders in 6-year-old children and pyrethroid insecticide exposure: the PELAGIE mother-child cohort. [En révision dans *Occup Environ Med*]

Beranger R, Garlantézec R, (...), **Warembourg C**, et al. Prenatal exposure to glycol ethers and neurocognitive abilities in 6-year-old children: the PELAGIE cohort study. *Environ Health Perspect*.

Accepté en septembre 2016

Chevrier C, **Warembourg C**, Maner-Idrissi GL, et al. Childhood exposure to polybrominated diphenyl ethers and neurodevelopment at six years of age. *Neurotoxicology*. 2016 May;54:81-8.

Cartier C, **Warembourg C**, Le Maner-Idrissi G, et al. Organophosphate Insecticide Metabolites in Prenatal and Childhood Urine Samples and Intelligence Scores at 6 Years of Age: Results from the Mother-Child PELAGIE Cohort (France). *Environ Health Perspect*. 2016 May ;124(5) :674-80.

Debost-Legrand A, **Warembourg C**, Massart C, et al. Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth. *Environ Res*. 2016 Apr;146:207-17.

Viel JF, **Warembourg C**, Le Maner-Idrissi G, et al. Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. *Environ Int*. 2015 Sep;82:69-75.

Cordier S, Bouquet E, **Warembourg C**, et al. Perinatal exposure to chlordecone, thyroid hormone status and neurodevelopment in infants: the Timoun cohort study in Guadeloupe (French West Indies). *Environ Res*. 2015 Apr;138:271-8.

Garlantézec R, **Warembourg C**, Monfort C, et al. Urinary glycol ether metabolites in women and time to pregnancy: the PELAGIE cohort. *Environ Health Perspect*. 2013 Oct;121(10):1167-73.

Bonvallot N, Tremblay-Franco M, (...), **Warembourg C**, et al. Metabolomics tools for describing complex pesticide exposure in pregnant women in Brittany (France). *PLoS One*. 2013 May 21;8(5).

Chevrier C*, **Warembourg C***, Gaudreau E, et al. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, seafood consumption, and time-to-pregnancy. *Epidemiology*. 2013 Mar;24(2):251-60. [*: co-premières auteures]

Communications orales

Warembourg C, Chevrier C, Gaudreau E, et al. Persistent organic pollutant, seafood consumption and fertility. 2nd day of young researcher of Irset, Rennes, France, Février 2014.

Communications affichées

Warembourg C, Dananché B, Cordier S et al. Occupational exposures in health care sector, stillbirth and congenital malformations. 6th scientific meeting of the Doctoral network on Public Health, Rennes, France, Avril 2015

Warembourg C, Dananché B, Cordier S et al. Occupational exposures in health care sector, stillbirth and congenital malformations. 5th scientific meeting of the Pharmacist University, Rennes, France, Janvier 2015

Warembourg C, Dananché B, Cordier S et al. Occupational exposures in health care sector, stillbirth and congenital malformations. 3rd day of young researcher of Irset, Rennes, France, Décembre 2014

SOMMAIRE

Remerciements	1
Valorisation des travaux de these	3
Autres contributions	4
Table des figures	9
Table des tableaux	9
Liste des abreviations	11
Introduction	13

Chapitre 1. Contexte

1.1. Le système endocrinien et le système reproducteur	17
1.1.1. Généralités sur le système endocrinien	17
1.1.2. Les stéroïdes sexuels	19
1.1.3. Le développement du système reproducteur	22
1.1.4. La stéroïdogénèse pendant la grossesse	26
1.2. Les perturbateurs endocriniens	33
1.2.1. Historique	33
1.2.2. Définitions	34
1.2.3. Exemples et sources d'exposition aux perturbateurs endocriniens	35
1.2.4. Les effets toxiques des perturbateurs endocriniens	36
1.2.5. Méthodes d'évaluation des perturbateurs endocriniens	41
1.3. Indicateurs d'altération du développement du système reproducteur à la naissance	47
1.3.1. Généralités	47
1.3.2. Les hormones sexuelles fœtales	48
1.3.3. Les malformations génitales du garçon : l'hypospade et la cryptorchidie	54
1.4. Les polluants organiques persistants : des perturbateurs endocriniens reconnus	71
1.4.1. Définition et propriétés	71
1.4.2. Structure chimique	71
1.4.3. Utilisations passées	73
1.4.1. Sources d'exposition de la population générale	73
1.4.2. Toxicocinétique	74
1.4.3. Facteurs de variation des niveaux de POP	74
1.4.4. Réglementation passée et actuelle	75
1.4.5. Toxicité des PCB, pesticides organochlorés et PBDE sur les fonctions reproductives	76
1.5. Les éthers de glycol : des perturbateurs endocriniens potentiels ?	84
1.5.1. Définition, propriétés	84
1.5.2. Structure chimique	84
1.5.3. Source d'exposition et consommation en France	84
1.5.4. Réglementation	86
1.5.1. Toxicocinétique	87
1.5.2. Toxicité des éthers de glycol sur les fonctions reproductives	88
1.6. Objectifs	93

Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.1. Population d'étude	97
2.1.1. La cohorte PELAGIE	97
2.1.2. La cohorte EDEN	98
2.2. Mesure des expositions prénatales	99
2.2.1. Mesure de l'exposition aux PCB, pesticides organochlorés et PBDE	99
2.2.1. Mesure de l'exposition aux éthers de glycol	100
2.3. Evaluation des évènements de santé d'intérêt	103
2.3.1. Mesure des niveaux de stéroïdes dans le sang de cordon ombilical	103
2.3.2. Evaluation des malformations congénitales de l'appareil génital du garçon	104
2.4. Analyse statistique	105
2.4.1. Sélection des groupes d'études	105
2.4.2. Traitement des données de biomarqueurs d'exposition	106
2.4.3. Modélisation multivariée	107
2.4.4. Evaluation de la forme de la relation	107
2.4.5. Comparaisons multiples	108

Chapitre 3. Résultats

3.1. Article 1: Expositions prénatales aux polluants organiques persistants et niveaux d'hormones sexuelles dans le sang de cordon ombilical	113
3.1.1. Résumé en français	113
3.1.2. Exposure of pregnant women to persistent organic pollutants and cord sex hormone levels.	115
3.2. Article 2 : Expositions prénatales aux éthers de glycol et risques de cryptorchidies et d'hypospades	149
3.2.1. Résumé en français	149
3.2.2. Prenatal exposure to glycol ethers and cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study	151
3.3. Article 3 : Expositions prénatales aux éthers de glycol et niveaux d'hormones sexuelles dans le sang de cordon ombilical	173
3.3.1. Résumé en français	173
3.3.2. Prenatal exposure to glycol ethers and cord sex hormone levels	175

Chapitre 4. Discussion générale

4.1. Synthèse des résultats	205
4.2. Considérations méthodologiques	208
4.2.1. Schéma d'étude	208
4.2.2. Evaluation des expositions	209
4.2.3. Evaluation des anomalies du développement du système reproducteur	211
4.3. Réglementation des perturbateurs endocriniens	213
4.3.1. La position actuelle de la Commission Européenne	213
4.3.2. La substitution des perturbateurs endocriniens	213
4.3.3. Les difficultés liées à l'extrapolation animal-humain	214
4.4. Implication en Santé Publique	215
4.4.1. La perception du risque chimique	215
4.4.2. Mesure de prévention auprès des femmes enceintes	215
4.4.3. Impact sur la santé	216
4.5. Perspectives de recherches	217
4.5.1. Evaluer les niveaux d'exposition aux éthers de glycol dans la population générale et confirmer leurs effets sur la santé	217
4.5.2. Améliorer les connaissances sur les mécanismes de perturbation endocrinienne pendant la grossesse : le rôle du placenta	217
4.5.3. Evaluer les effets de l'exposition prénatale aux POP et aux EG, et des modifications des niveaux d'hormones à la naissance, sur la puberté	218
4.6. Conclusion	218
Références	221
Annexe 1. Protocoles d'étude des cohortes PELAGIE et EDEN	247
Annexe 2. Exposition aux éthers de glycol et malformation génitale dans la cohorte EDEN	249

Table des figures

Figure 1 : Anatomie simplifiée du système endocrinien	17
Figure 2 : Schéma de la stéroïdogénèse.....	19
Figure 3 : Evolution des concentrations de testostérone et d'œstradiol chez l'homme et la femme au cours de la vie.	22
Figure 4 : Phases de développement des différents organes composant le système reproducteur masculin.	24
Figure 5 : Stéroïdogénèse au sein de l'unité foeto-placentaire	27
Figure 6 : Toxicocinétique des xénobiotiques.....	36
Figure 7 : Schématisation des différents types d'effets définissant les perturbateurs endocriniens	41
Figure 8 : Représentation des différentes formes d'hypospade	54
Figure 9 : Représentation des différentes formes de cryptorchidies	60
Figure 10 : Structure chimique des PCB, pesticides organochlorés et PBDE.....	72

Table des tableaux

Tableau 1 : Rôles principaux des hormones et fonctions associées.....	18
Tableau 2 : Exemples de familles de molécules à effet perturbateur endocrinien et leurs sources potentielles	35
Tableau 3 : Facteurs de risque d'hypospade et de cryptorchidie.....	66
Tableau 4. Exposition prénatale aux PCB, pesticides organochlorés ou PBDE et effets sur les fonctions de reproduction	81
Tableau 5 : Sources d'exposition aux éthers de glycol (Afsset 2008)	85
Tableau 6 : Réglementation actuelle des éthers de glycol en France et en Europe.....	86
Tableau 7 : Métabolites d'éthers de glycol dosés et leurs éthers de glycols sources	87
Tableau 8 : Synthèse des effets reprotoxiques des éthers de glycol chez l'homme et l'animal	90
Tableau 9 : Liste des polluants organiques persistants recherchés dans les échantillons de sang de cordon ombilical	99
Tableau 10 : Principaux produits contenant des éthers de glycol en 2000-2006 en France et leurs métabolites associés....	101
Tableau 11 : Méthodes analytiques utilisées pour mesurer les niveaux de stéroïdes ainsi que de SHBG et d'AMH dans le sang de cordon.....	103
Tableau 12. Différence entre les protocoles d'étude des cohortes PELAGIE et EDEN	247
Tableau 13. Estimation du risque de malformation génitale en association avec l'exposition aux EG dans la cohorte EDEN249	

Liste des abréviations

1PG2ME/A: 1-propylène glycol 2-méthyl éther et son acétate
2-MPA: Acide 2-méthoxypropionique
A4 : Androstènedione
A5 : Androstènediol
ABP : Androgen binding protein
AI : Androgen index
AMH : Hormone Antimüllérienne
AMP : Aide médicale à la procréation
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
AR : Récepteur aux androgènes
BAA: Acide 2-butoxyacétique
CEFIC : Conseil Européen de l'Industrie Chimique
CLP : Classification, étiquetage et emballage
CYP : Cytochrome P450
DDE : Dichlorodiphényldichloroéthylène
DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEGBE: Diéthylène glycol butyl éther
DEGDME: Diéthylène glycol diméthyl éther
DEGEE: Diéthylène glycol éthyl éther
DEGME: Diéthylène glycol méthyl éther
DES : Diéthylstilbestrol
DHEA(S) : Déhydroépiandrostérone (sulfate)
DHT : Dihydrotestostérone
DNC : Délai nécessaire à concevoir
E1 : Œstrone
E2 : Œstradiol
E3 : Œstriol
E4 : Œstérol
EAA: Acide éthoxyacétique
EEAA: Acide éthoxyéthoxyacétique
EG : Ether de glycol
EGBE: Ethylène glycol n-butyl éther
EGDEE: Ethylène glycol diéthyl éther
EGDME: Ethylène glycol diméthyl éther
EGEE/A: Ethylène glycol éthyl éther et son acétate
EGME/A: Ethylène glycol méthyl éther et son acétate

EGPhE: Ethylène glycol phényl éther
EPA : Agence de protection de l'environnement des USA
ER : Récepteur aux œstrogènes
FIV : Fécondation *in vitro*
FSH : Follicle Stimulating Hormone
fT : Testostérone libre
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
HCB : hexachlorobenzène
HCE : Heptachlor époxyde
HCG : Hormone chorionique gonadotrope
HCH : Hexachlorocyclohexane
HSD : Hydroxystéroïde déshydrogénase
ICSI : Injection intracytoplasmique
IGF-1 : Insulin-Like Growth Factor-1
IMC : Indice de masse corporelle
INSL3 : Insulin-like peptide 3
LD : Limite de détection
LH : Luteinizing hormone
MAA: Acide méthoxyacétique
MEAA: Acide methoxyethoxyacétique
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économiques
PBDE : Polybromodiphényléthers
PCB : Polychlorobiphényles
PCB-DL : Polychlorobiphényles dioxine-like
PCB-NDL : Polychlorobiphényles non dioxine-like
PGME : Propylène glycol méthyl éther
PhAA: Acide phénoxyacétique
POP : Polluant organique persistant
PrAA: Acide n-propoxyacétique
SA : Semaine d'aménorrhée
SHBG : Sex Hormone-Binding Globulin
SRY : Sex determining region of Y chromosome
SUMER : Surveillance médicale des expositions aux risques professionnels
T : Testostérone
TEGDME: Triéthylène glycol diméthyl éther
TBT : Tributylétains

Introduction

Depuis plusieurs décennies, le rôle des expositions environnementales dans l'apparition de diverses pathologies (reproductives, neurologiques, métaboliques, cancers) suscite l'intérêt de la communauté scientifique. En effet, des craintes sont apparues suite à l'observation d'anomalies de la reproduction chez certains mammifères, poissons et amphibiens, vivant dans des zones particulièrement contaminées par des substances chimiques. En parallèle, une augmentation générale des pathologies hormono-dépendantes a été observée chez l'homme, simultanément à une utilisation de plus en plus massive de molécules chimiques d'origine anthropique. C'est au début des années 90 que le terme de *perturbateurs endocriniens* a fait son apparition, pour désigner les substances capables d'exercer leurs effets en interagissant avec le système hormonal des êtres vivants.

D'après le concept de l'origine développementale des maladies (DOHaD), la période prénatale et les premières années de vie sont des phases critiques de développement au cours desquelles s'établit une susceptibilité à diverses pathologies chroniques. L'exposition intra-utérine à des molécules chimiques capables d'interagir avec le système endocrinien pourrait ainsi altérer le développement du fœtus et influencer la santé de l'enfant et de l'adulte. Les études présentées dans cette thèse visent à améliorer les connaissances concernant l'effet de l'exposition prénatale à certains polluants chimiques sur le développement du système reproducteur de l'enfant, en s'intéressant à deux indicateurs d'effet : les niveaux d'hormones sexuelles à la naissance et les malformations congénitales de l'appareil génital du garçon. Ce travail s'appuie sur les données issues de cohortes mère-enfant françaises ayant recruté des femmes enceintes au cours de leur grossesse et pour lesquelles des prélèvements biologiques ont permis la mesure de l'exposition. Les classes chimiques plus spécifiquement étudiées dans cette thèse comprennent les polluants organiques persistants (polychlorobiphényles, pesticides organochlorés et retardateurs de flamme bromés) et les éthers de glycol.

Le premier chapitre de cette thèse fournit les notions nécessaires à la bonne compréhension de la recherche menée incluant des éléments de base sur le système endocrinien et le développement du système reproducteur, une introduction au concept de perturbation endocrinienne, puis une description des indicateurs d'altération du développement à la naissance et des deux familles de polluants chimiques d'intérêt. Le second chapitre reprend quelques éléments de méthodes communs aux trois études réalisées. Les études sont présentées sous forme d'article scientifique dans le troisième chapitre. Enfin, le dernier chapitre de cette thèse présente une discussion générale du travail mené et les perspectives de recherche qui en découlent.

CHAPITRE 1

CONTEXTE

1.1. LE SYSTEME ENDOCRINIEN ET LE SYSTEME REPRODUCTEUR

1.1.1. Généralités sur le système endocrinien

Le système endocrinien est l'un des plus importants systèmes de communication de l'organisme, indispensable au maintien des équilibres biologiques [1,2]. C'est un système complexe, impliqué dans la plupart des processus physiologiques, et qui régule l'activité de nombreux organes. Le système endocrinien est composé de l'ensemble des glandes qui sécrètent des hormones dont l'hypophyse, l'hypothalamus, la thyroïde et la parathyroïde, le thymus, les surrénales, le pancréas, les ovaires et les testicules (Figure 1).

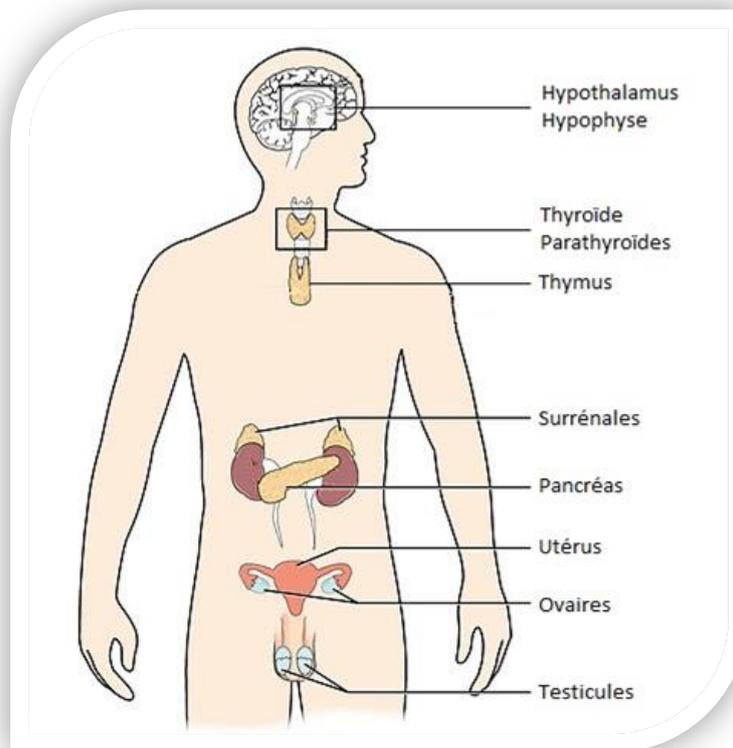


Figure 1 : Anatomie simplifiée du système endocrinien

Les glandes endocrines, par l'intermédiaire des hormones et sous le contrôle du système nerveux central, régulent de nombreuses fonctions essentielles comme la reproduction, le développement, la croissance ou le métabolisme énergétique (Tableau 1). Le complexe hypothalamo-hypophysaire est le siège du lien étroit qui existe entre le système nerveux et le système endocrinien. Par la sécrétion de neurohormones, l'hypothalamus agit, via l'hypophyse, sur la sécrétion d'hormones des principales glandes endocrines du corps. Les hormones peuvent être classées en trois catégories : les hormones

peptidiques (e.g., gonadotrophines, insuline) qui sont hydrosolubles et circulent librement dans le sang, les stéroïdes (i.e., corticostéroïdes et stéroïdes sexuels) qui sont lipophiles et transportées dans le sang par des protéines plasmatiques, et les amines (e.g., adrénaline, dopamine) dont la solubilité est variable selon le degré de polarité. Les fonctions de reproduction sont dirigées par l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique : la sécrétion de *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) par l'hypothalamus va stimuler la sécrétion de *Luteinizing Hormone* (LH) et de *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) par l'hypophyse qui vont à leur tour stimuler la sécrétion de stéroïdes sexuelles par les gonades [1,2].

Tableau 1 : Rôles principaux des hormones et fonctions associées

Fonctions	Hormones	Réponses
Reproduction	Androgènes, œstrogènes, progestérone, hormones hypophysaires (LH, FSH, prolactine)	Développement des organes reproducteurs, production de gamètes, lactation, gestation, comportement sexuel
Croissance et Développement	Hormones de croissance, hormones thyroïdiennes, insuline, glucocorticoïdes, androgènes, œstrogènes, progestérone	Croissance, métabolisme, homéostasie
Maintien de l'environnement interne (homéostasie)	Aldostérone, vasopressine, hormones parathyroïdiennes, prostaglandines	Contrôle du volume et de la pression
Disponibilité énergétique	Insuline, glucagon, hormones thyroïdiennes	Régulation du métabolisme

Les hormones agissent comme des messagers chimiques et sont transportées par le sang vers leurs cellules cibles (dont celles d'autres glandes endocriniennes) [1]. Ces cellules cibles possèdent des sites de liaisons spécifiques, appelés récepteurs, qui peuvent être membranaires (e.g., récepteurs des hormones peptiques) ou intracellulaires (e.g. récepteurs des hormones lipophiles) et sur lesquels l'hormone correspondante va venir se fixer et transmettre le signal à la cellule. La liaison de l'hormone va modifier la structure du récepteur : dans le cas de récepteurs homodimériques (récepteurs sans affinité avec l'ADN en l'absence d'hormone, comme ceux des ligands stéroïdiens), l'interaction des récepteurs avec un ou plusieurs éléments de réponse à l'hormone, présents dans la séquence d'un gène cible, va conduire à la modulation de la transcription de ce gène. Les récepteurs des hormones lipophiles ont une haute affinité pour un ou plusieurs ligands spécifiques et sont dotés d'un site de liaison saturable, permettant ainsi la compétition entre ligands d'un même récepteur.

1.1.2. Les stéroïdes sexuels

Les hormones stéroïdiennes sont communément divisées en 3 familles : les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes et les stéroïdes sexuels [1]. Les stéroïdes sexuels sont eux-mêmes divisés en 3 sous-types d'hormones : les androgènes, les œstrogènes et les progestagènes. Les stéroïdes sont synthétisés essentiellement dans les glandes endocrines (surrénales et gonades) et ont pour précurseur commun le cholestérol. La synthèse des hormones stéroïdiennes, ou stéroïdogénèse, implique une cascade de réactions enzymatiques dont la voie empruntée dépend du type d'enzymes exprimées dans le tissu considéré et de leur séquence d'intervention (Figure 2).

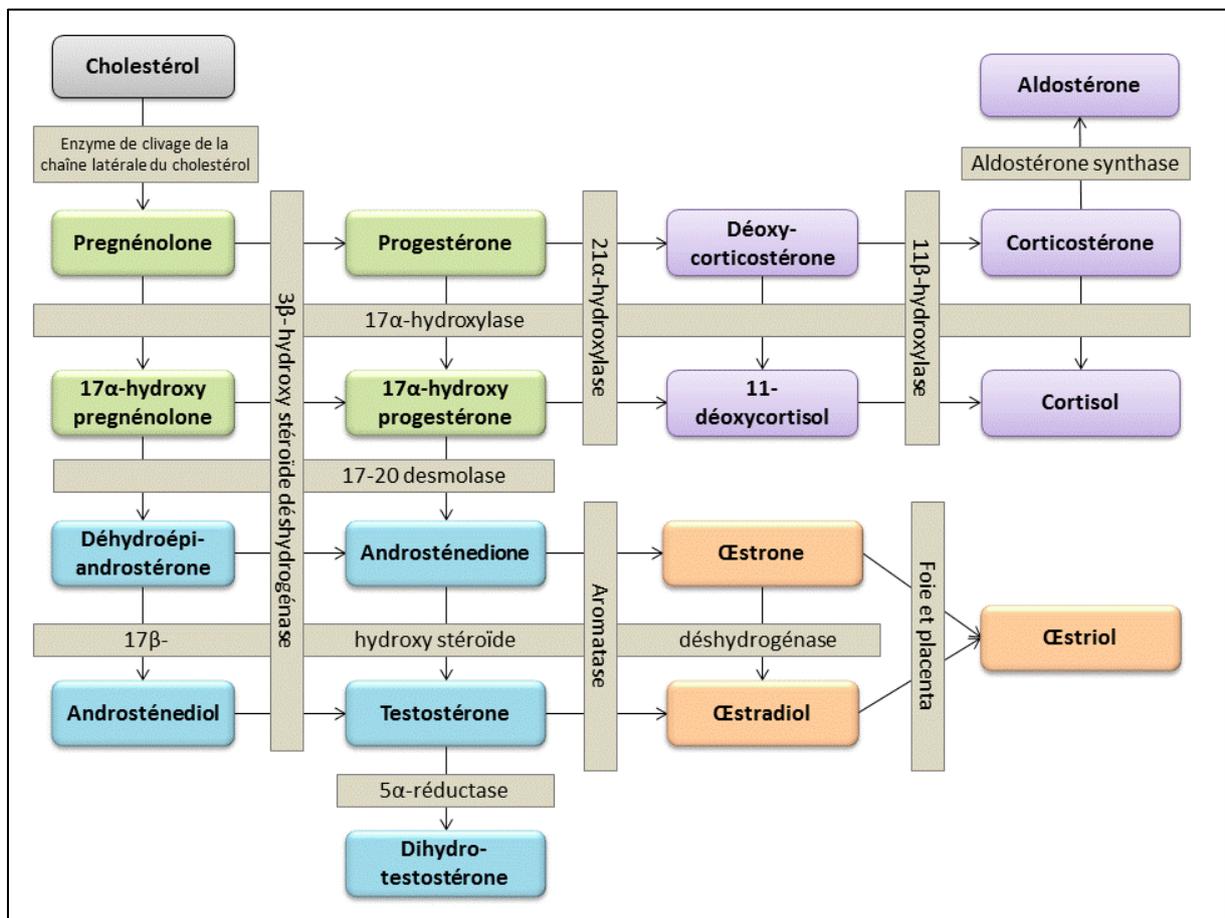


Figure 2 : Schéma de la stéroïdogénèse.

1.1.2.1. Les androgènes

Les androgènes, aussi appelés hormones sexuelles mâles, incluent la testostérone, la dihydrotestostérone (DHT), la déhydroépiandrostérone (DHEA), l'androstènedione (A4) et l'androstènediol (A5). Le principal androgène est la testostérone qui est biosynthétisée par le testicule, l'ovaire et les glandes surrénales. La régulation de la sécrétion de testostérone s'effectue par les hormones gonadotrophines du lobe antérieur de l'hypophyse : la LH et la FSH. La DHEA, l'A4 et l'A5, principalement synthétisées par les glandes surrénales, sont des précurseurs de la testostérone. La testostérone peut être métabolisée en œstradiol par l'aromatase ou en DHT par la 5 α -réductase. L'action des androgènes s'effectue par leur liaison au récepteur des androgènes (AR), pour lequel la DHT possède une affinité bien supérieure à celle de la testostérone. Chez le mâle, les androgènes jouent un rôle essentiel dans la différenciation sexuelle du fœtus, le développement des caractères sexuels secondaires à la puberté (croissance des organes génitaux, pilosité, mue...), la spermatogénèse et la libido. La testostérone a également une action stimulante sur le développement de la musculature et aurait un effet sur le comportement (comme l'agressivité).

1.1.2.2. Les œstrogènes

Les œstrogènes incluent l'œstradiol (E2), l'œstriol (E3) et l'œstrone (E1). Ils sont principalement synthétisés par l'ovaire, le placenta, les glandes surrénales et le testicule. Les œstrogènes sont dérivés des androgènes par des réactions enzymatiques : l'A4 et la testostérone sont converties par l'action de l'aromatase en E1 et E2 respectivement. L'E2 est également synthétisée à partir de l'E1 via la 17- β HSD. L'E3 est dérivée de l'E1 et l'E2 et est particulièrement élevée au cours de la grossesse puisqu'elle est largement produite par le placenta. Il existe deux isotopes du récepteur aux œstrogènes (ER) avec des distributions tissulaires et des rôles physiologiques distincts : ER α principalement exprimé au niveau utérin, vaginal, hépatique et hypophysaire et ER β principalement exprimé au niveau prostatique, testiculaire, ovarien et dans certaines parties du cerveau. Les œstrogènes jouent un rôle important dans le développement des caractères sexuels féminins (mais dans une moindre mesure que les androgènes chez le mâle) et sont impliquées dans le contrôle du cycle menstruel et le processus de fécondation. Outre leurs rôles dans la reproduction, les œstrogènes agissent également sur le système squelettique, la peau et les muqueuses, le système cardiovasculaire, le cerveau, ou encore le métabolisme lipidique.

1.1.2.3. Les progestagènes

Les progestagènes incluent la pregnénolone et la progestérone (et leurs formes hydroxylées, 17 α OH-pregnénolone et 17 α OH-progestérone). La pregnénolone est synthétisée à partir du cholestérol et métabolisée en progestérone par la 3 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD). Les progestagènes sont les précurseurs des androgènes et des corticoïdes. La progestérone est principalement sécrétée par le corps jaune (pendant la phase sécrétoire du cycle menstruel), le placenta (pendant la grossesse) et les corticosurrénales (comme chez l'homme), sous le contrôle des hormones gonadotrophines hypophysaires (LH, FSH). L'utérus est l'organe-cible le plus important de la progestérone qui agit via son récepteur, le récepteur à la progestérone (PR). Le rôle principal de la progestérone est de préparer le tractus génital de la femme à l'implantation et au développement de l'ovule fécondée et de maintenir la grossesse.

1.1.2.4. Transport des stéroïdes

Dans le sang, les stéroïdes sexuels circulent principalement en étant liés à deux protéines de transport : la *Sex hormone binding globulin* (SHBG) et l'albumine, la première étant spécifique aux stéroïdes et l'autre pas. Les protéines de transport régulent l'accès des stéroïdes au niveau des tissus cibles puisque seule la fraction libre, c'est-à-dire la fraction non liée aux protéines de transport, est biologiquement active. La SHBG possède une forte affinité pour la DHT et une affinité moyenne pour la testostérone et l'E2. L'albumine quant à elle possède une affinité faible et facilement rompue avec les stéroïdes, mais elle est présente en très grande quantité (60% de l'ensemble des protéines de l'organisme). Ainsi, pour la testostérone, on observe qu'environ 50% de la testostérone circulante est liée à la SHBG, 50% est liée à l'albumine et seulement 2% reste libre. La SHBG est principalement synthétisée dans le foie (comme l'albumine) et est régulée par les œstrogènes. L'*androgen binding protein* (ABP) est une autre protéine de transport spécifique des hormones stéroïdiennes qui est produite par les cellules de Sertoli et qui, contrairement à la SHBG, reste localisée au niveau testiculaire. L'ABP possède une affinité élevée pour la DHT, plus faible pour la testostérone et quasi inexistante pour les autres stéroïdes. Sa synthèse est sous le contrôle de la FSH, elle-même dépendante, entre autres, de la testostérone.

1.1.3. Le développement du système reproducteur

Le développement du système reproducteur commence très tôt au cours de la vie fœtale, lors de la phase de différenciation sexuelle des gonades, et se termine à la puberté avec la mise en place des caractères sexuels secondaires [2,3]. Le développement du système reproducteur est sous le contrôle des hormones sexuelles dont les niveaux sont particulièrement élevés à trois périodes distinctes du développement : 1) la période prénatale, 2) aux alentours du 3^e mois de vie, période aussi appelée « mini-puberté », et 3) lors de la puberté. Après une brève activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique au cours de la mini-puberté, celui reste par la suite quiescent jusqu'au début de la puberté. Les concentrations de testostérone et d'œstradiol varient ainsi grandement avec l'âge (Figure 3).

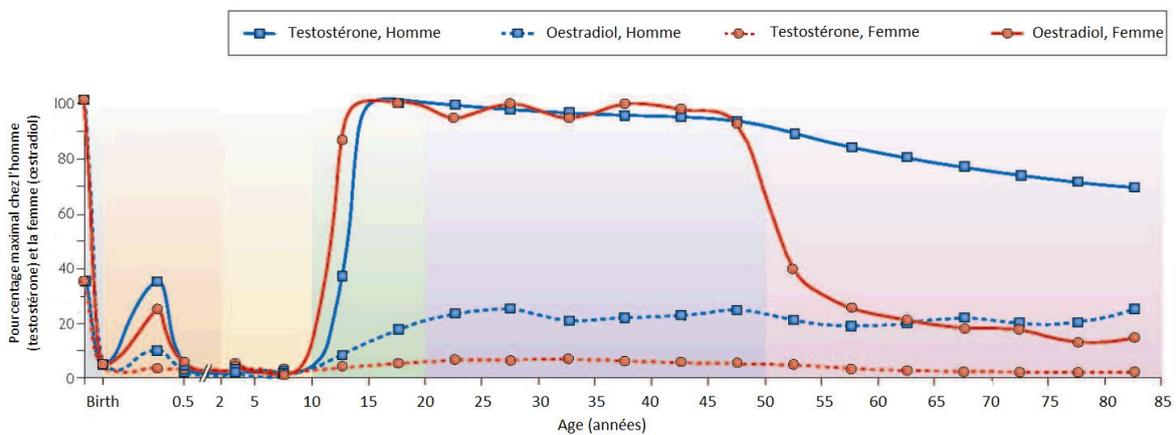


Figure 3 : Evolution des concentrations de testostérone et d'œstradiol chez l'homme et la femme au cours de la vie. Source : Ober et al. 2008 [4]

1.1.3.1. La période prénatale

➤ Différenciation gonadique

Le développement du système reproducteur commence très tôt au cours de la grossesse. Chez l'homme, comme chez les autres mammifères, le sexe est déterminé génétiquement à la fécondation selon que le spermatozoïde est porteur ou non du chromosome Y (l'ovocyte étant toujours porteur du chromosome X) : c'est le sexe génétique. A ce stade, les gonades sont dites « indifférenciées » ou « bipotentiels » et ce n'est qu'à partir de la 5^e-6^e semaine de grossesse que leur différenciation en testicules ou en ovaires va démarrer et déterminer le sexe gonadique. Cette différenciation gonadique est sous l'influence d'un gène présent seulement sur le chromosome Y : le gène *SRY* (*sex-determining region of Y chromosome*). L'expression du gène *SRY* dans les cellules somatiques de la gonade va entraîner la différenciation de celles-ci en cellules de Sertoli, suite à une cascade

d'activation génétique, et donnera lieu à la formation du testicule. A l'inverse, l'absence du gène SRY fera évoluer la gonade indifférenciée en ovaire mais la cascade génétique qui la contrôle est moins bien connue chez la femelle.

➤ Différenciation des voies génitales internes

Dès les premières étapes de différenciation gonadique, la gonade mâle va être capable de produire des hormones sexuelles. Le développement des voies génitales internes va dépendre de l'activité hormonale du testicule fœtal : l'hormone antimüllérienne (AMH), produite par les cellules de Sertoli, va entraîner la régression des canaux de Müller tandis que les canaux de Wolff vont au contraire se développer et former l'épididyme, le canal déférent et les vésicules séminales, sous l'action de la testostérone, produite par les cellules de Leydig. Chez la femelle, la non production d'AMH et de testostérone par la gonade va à l'inverse entraîner la régression des canaux de Wolff et la différenciation des canaux de Müller à l'origine des trompes de Fallope, de l'utérus et de la partie haute du vagin. Les connaissances sur les mécanismes impliqués dans la différenciation de la gonade femelle sont encore limitées mais certains gènes spécifiques (comme Dax1, Wnt4, Rspo1, Fst ou FoxL2) ont été identifiés [5].

➤ Différenciation des organes génitaux externes

A partir du 3^e mois, les organes génitaux externes vont se développer. Chez le garçon, sous l'effet des hormones androgènes (testostérone et DHT), le tubercule génital va s'allonger pour former le pénis et entraîner avec lui les replis génitaux, qui fusionneront sur le bord ventral du pénis pour isoler l'urètre, et les bourrelets urogénitaux, qui formeront le scrotum. A la 14^e semaine de grossesse, l'appareil génital externe est différencié mais la croissance du pénis et la descente des testicules dans les bourses vont se poursuivre jusqu'à la fin de la grossesse sous le contrôle des androgènes et de l'insuline-like peptide 3 (INSL3). Chez la fille, en l'absence d'androgène, le tubercule génital va évoluer en clitoris tandis que les replis et bourrelets génitaux ne vont pas fusionner et se différencier en petites et grandes lèvres, respectivement. Les mécanismes de formation des organes génitaux externes féminins restent encore mal connus mais les niveaux d'œstrogènes pendant la grossesse pourraient y contribuer [2,6].

La Figure 4 ci-dessous résume les étapes du développement des différents organes composant le système reproducteur masculin au cours de la période prénatale.

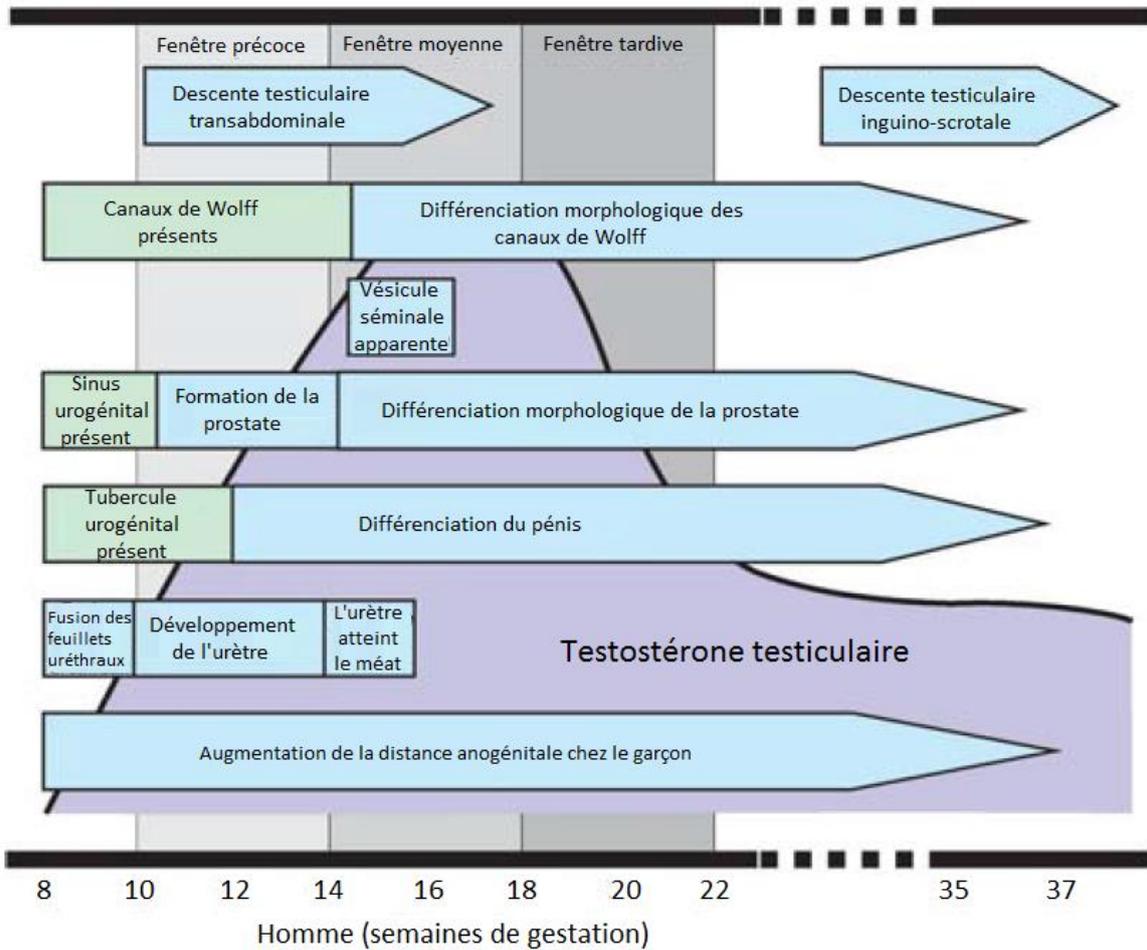


Figure 4 : Phases de développement des différents organes composant le système reproducteur masculin.
Source : Expertise Inserm – Environnement et reproduction [7]

1.1.3.2. La mini-puberté

L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique, bien qu'actif au milieu de la grossesse, est par la suite inactivé du fait de la forte production d'œstrogènes par le placenta (*negative feedback*). A la naissance, l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique se réactive jusqu'aux alentours du 6^e mois et stimule la production de gonadotrophines (LH, FSH), avec un pic d'activité aux alentours de 3 mois, appelé mini-puberté [8]. Cette augmentation des niveaux de gonadotrophines stimule ainsi la production d'hormones gonadiques : une augmentation des niveaux de testostérone, d'Inhibine-B et d'AMH chez le garçon et une augmentation des niveaux d'œstradiol chez la fille [8,9]. Chez les enfants nés avec une cryptorchidie, il est fréquent d'observer une descente spontanée du testicule

dans la bourse au cours de cette période de mini-puberté [10,11]. Chez le garçon, la mini-puberté joue un rôle important dans le développement des fonctions testiculaires, la production spermatique et la masculinisation du cerveau mais son rôle chez la fille est encore mal connu [8,9]. L'âge de 3 mois est donc une période au cours de laquelle la mesure des niveaux d'hormones stéroïdiennes et des gonadotrophines permet de capturer le pic d'activité de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique [12]. Chez le garçon, la mesure des niveaux de testostérone, LH, FSH et INSL-3 permettent d'évaluer les fonctions des cellules de Leydig tandis que les niveaux d'Inhibine-B, d'AMH et de FSH permettent d'évaluer les fonctions des cellules de Sertoli. Chez la fille, l'activité des gonadotrophines, notamment de la FSH, est plus irrégulière mais entraîne des pics d'œstradiol équivalents à ceux de la puberté. Les variations sont très brèves et, par rétrocontrôle, chaque augmentation d'œstradiol inhibe la libération de FSH, ce qui, en retour, fait chuter le taux d'œstradiol.

1.1.3.3. La puberté

La puberté est l'étape finale du développement du système reproducteur après laquelle l'individu devient physiologiquement capable de procréer. Elle correspond à la période de maturation des organes sexuels et à la formation d'ovocytes et de spermatozoïdes matures mais également au développement des caractères sexuels secondaires, le tout sous l'influence des stéroïdes sexuels. Depuis la fin de la mini-puberté, l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique est resté quiescent et n'est réactivé définitivement qu'au moment de la puberté. L'initiation de la puberté est ainsi déterminée par une augmentation de la sécrétion de GnRH par les neurones hypothalamiques, stimulant la production de gonadotrophines (LH, FSH) qui vont elles-mêmes stimuler la production de stéroïdes par les ovaires ou les testicules. La sécrétion de GnRH est sous le contrôle de nombreux facteurs hypothalamiques (dont des neuropeptides et neurotransmetteurs : kisspeptines, neurokinine B, glutamate, GABA...), périphériques (dont les niveaux circulants d'hormones incluant les stéroïdes) et environnementaux (dont alimentation, le stress ou les perturbateurs endocriniens) [13–16]. Ainsi, l'initiation de la puberté est un mécanisme neuroendocrinien complexe que nous ne développerons pas davantage dans le cadre de cette thèse centrée sur les anomalies du système reproducteur à la naissance.

1.1.4. La stéroïdogénèse pendant la grossesse

1.1.4.1. L'unité foeto-placentaire

Dès la 8^e semaine de grossesse, le placenta humain est le siège d'une importante production de stéroïdes sexuels, principalement la progestérone et les œstrogènes [17]. Cependant, le placenta, comme le fœtus, est dépourvu de certains complexes enzymatiques nécessaires à la réalisation de la stéroïdogénèse. Il existe donc des interactions actives entre les systèmes enzymatiques respectifs du placenta et du fœtus dénommées sous le concept d'*unité foeto-placentaire*. En effet, tandis que le placenta exerce une forte activité aromatasase, sulfatase, 3 β -HSD, 17 β -HSD et une faible activité 16 α -hydroxylase, 17 α -hydroxylase et 17-20 desmolase, on observe une activité inverse chez le fœtus [18]. Les principales réactions enzymatiques aboutissant à la synthèse des différents stéroïdes sont présentées dans la Figure 5.

➤ Formation des précurseurs des androgènes

L'ensemble des stéroïdes synthétisés par l'unité foeto-placentaire ont pour précurseur commun le cholestérol. Le placenta n'est pas capable de synthétiser du cholestérol et utilise les LDL et le cholestérol libre du compartiment maternel pour synthétiser la pregnénolone par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (SCC). Une partie de cette pregnénolone est convertie par la 3 β -HSD placentaire en progestérone tandis qu'une autre partie est convertie en pregnénolone sulfate chez le fœtus et utilisée pour la synthèse d'androgènes.

➤ Formation des androgènes

Parmi les androgènes, la DHEA, la DHEAS et la 16 α -OH DHEAS sont principalement produites à partir de leurs précurseurs dans le compartiment fœtal. En effet, on observe une forte activité de la 17 α -hydroxylase et la 17-20 desmolase dans les corticosurrénales du fœtus qui sont ainsi capables de synthétiser, dès la 8^e semaine de grossesse, de fortes quantités de DHEA et DHEAS [19]. Le foie fœtal quant à lui convertit la DHEA(S) en 16 α -OH DHEA(S) grâce à l'activité de la 16 α -hydroxylase. Dans le placenta, la DHEAS d'origine fœtale mais aussi maternelle est convertie en DHEA par la sulfatase. Puis, la 3 β -HSD transforme la DHEA en A4 qui est elle-même en partie convertie en testostérone par la 17 β -HSD. Chez le fœtus mâle, le testicule est une autre source importante de production d'androgènes (testostérone et DHT).

➤ Formation des œstrogènes

Les œstrogènes sont principalement formés dans le placenta par conversion des androgènes par l'aromatase (testostérone en œstradiol, androstènedione en estrone et 16αOH-DHEAS en œstriol). L'activité enzymatique de l'aromatase augmente au cours de la grossesse. Les androgènes permettant la synthèse de l'œstradiol et de l'estrone sont issus, à parts quasi égales, de précurseurs maternel et fœtal (DHEAS) alors que, pour la synthèse d'œstriol, 90% des androgènes précurseurs sont d'origine fœtale (16αOH-DHEAS). Une altération du développement des corticosurrénales peut de ce fait avoir un impact sur la production d'androgènes, et par conséquent d'œstrogènes.

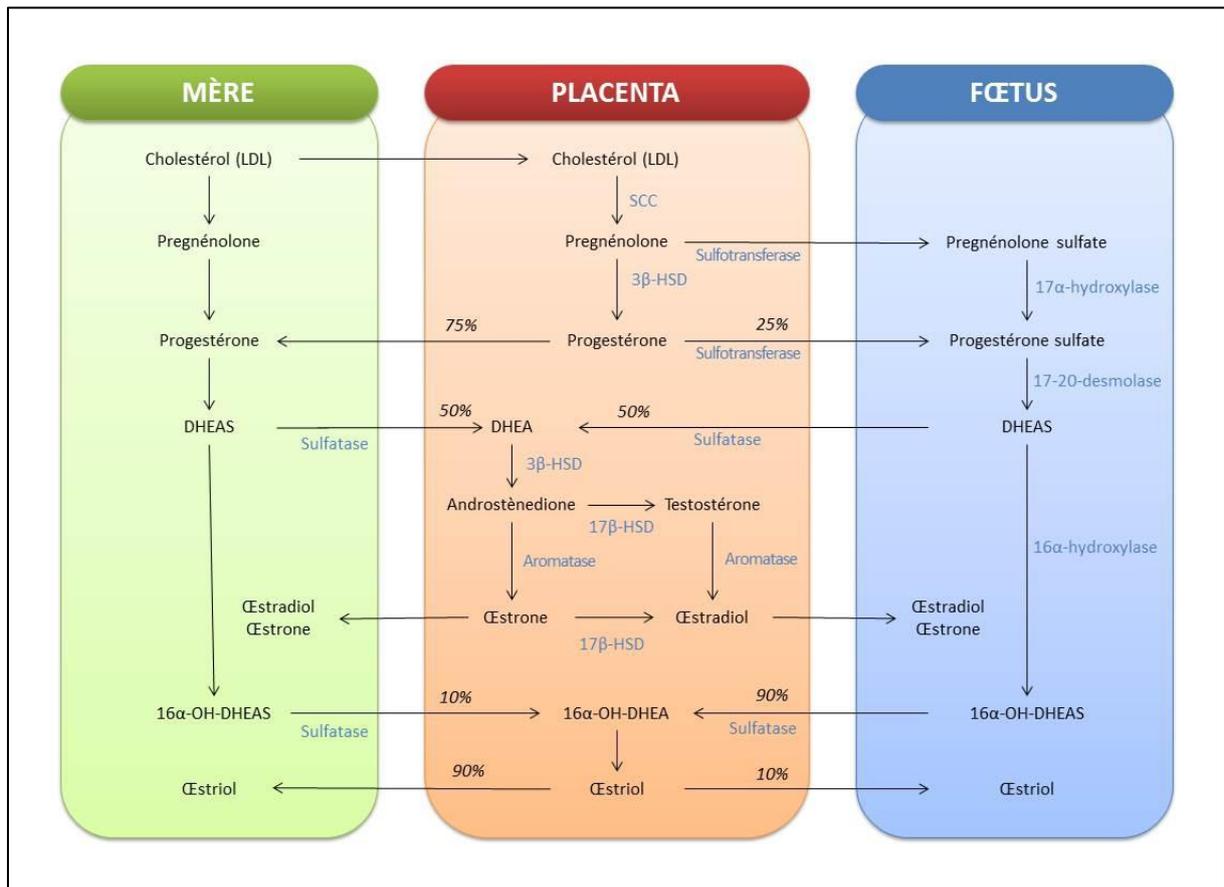


Figure 5 : Stéroïdogénèse au sein de l'unité foeto-placentaire

1.1.4.2. Le testicule foetal

Le testicule foetal peut classiquement être divisé en deux compartiments interdépendants : le tissu interstitiel, contenant notamment les cellules de Leydig responsables de la synthèse d'androgènes, et les cordons sexuels (futurs tubules séminifères et siège de la spermatogénèse), formés des cellules de Sertoli et de la lignée germinale [2].

➤ Les cellules de Sertoli

La différenciation des cellules de Sertoli constitue le premier évènement de l'organogénèse testiculaire dès la 6^e semaine de grossesse. Sous l'activation du gène SRY, la différenciation des cellules de Sertoli en provenance de l'épithélium coelomique va démarrer puis elles vont activement proliférer en s'organisant autour des cellules germinales pour former les cordons sexuels, ébauches des futurs tubules séminifères. Le nombre de cellules de Sertoli augmente de façon exponentielle pendant le 2^e trimestre de gestation. Les cellules de Sertoli sécrètent l'AMH responsable de la régression des canaux de Müller en faveur des canaux de Wolff. Elles jouent également un rôle crucial dans la différenciation et le bon fonctionnement des cellules de Leydig et préviennent l'entrée en méiose des gonocytes. Parmi les nombreuses protéines synthétisées par la cellule de Sertoli, deux sont essentielles à la fonction testiculaire: l'inhibine, exerçant un rétrocontrôle au niveau hypothalamo-hypophysaire, et l'ABP, protéine de transport des androgènes ayant une affinité élevée pour la testostérone et la DHT (cf 1.1.2.4).

➤ Les cellules germinales

Au cours de la 5^{ème} semaine de grossesse, les cellules germinales primordiales colonisent les structures gonadiques qui, sous l'influence des cellules de Sertoli, vont se différencier en spermatogonies durant le reste de la grossesse. Les spermatogonies sont bloquées lors de la période foetale et n'entreront en méiose qu'à partir de la puberté avec la mise en place de la spermatogénèse. La prolifération et la différenciation des cellules de Sertoli dans la gonade en développement est donc primordiale puisqu'elles déterminent le nombre de cellules germinales et donc la qualité de la spermatogénèse à l'âge adulte [20].

➤ Les cellules de Leydig

C'est à partir de la 7^e semaine de grossesse que des cellules du mésenchyme vont se différencier en cellules de Leydig sous le contrôle de divers facteurs (*Insuline growth factor-I*, protéine *GATA4*, *Desert hedgehog*). Dès la 8^{ème} semaine, les cellules de Leydig foetales commencent à produire des androgènes, dont la testostérone, nécessaires à leur bon développement ainsi qu'à celui des organes génitaux internes et au maintien de la stéroïdogénèse. Les cellules de Leydig produisent également une autre hormone indispensable à la différenciation du tractus génital mâle : l'INSL3, essentielle dans le processus de descente testiculaire. Le nombre de cellules de Leydig augmente de façon exponentielle dès la 8^e semaine de gestation jusque vers la 19^e semaine. A partir du 2^e trimestre, la testostérone est transformée en périphérie, par la 5 α -réductase, en DHT. La DHT est supposée jouer un rôle dans la masculinisation du tractus génital (développement du pénis, des bourses et de la prostate).

1.1.4.3. L'ovaire fœtal

Chez le fœtus de sexe féminin, la différenciation des ovaires démarre au cours de la 7^e semaine de grossesse mais n'est pas nécessaire à la différenciation du phénotype femelle [2]. L'ovaire fœtal contient à la fois les futurs ovocytes et les précurseurs des cellules somatiques (cellules de la granulosa et de la thèque). Au cours de la vie fœtale, l'ovaire, contrairement au testicule, possède une très faible activité vis-à-vis de la stéroïdogénèse.

➤ Les cellules germinales

Chez le mâle, la spermatogénèse ne démarre qu'à la puberté mais chez la femelle, l'ovogenèse commence dès la vie fœtale, au cours du quatrième mois de grossesse, où se constitue le stock des follicules primordiaux. Depuis la 5^e semaine de grossesse et jusqu'au 7^{ème} mois, les cellules germinales primordiales, ainsi que leurs descendants, les ovogonies, se multiplient par mitose. Puis, à partir de la 12^e semaine, ils entrent en méiose et se bloquent en prophase I. Chaque ovocyte I s'entoure alors d'une couche de cellules somatiques (cellules de pre-granulosa) pour former le follicule primordial, dès la 16^e semaine de grossesse. Une fois formés, la majorité des follicules primordiaux vont rester quiescents et leur croissance ne reprend que plusieurs mois ou années après la naissance. On suppose aujourd'hui que la formation des follicules primordiaux est achevée au cours de la vie fœtale. Cependant, un phénomène d'atrésie des follicules est observé dès la 14^e semaine de grossesse puis tout au long de la vie aboutissant à un épuisement de la réserve ovarienne au cours du temps. Ainsi, on estime que le nombre maximal (7 millions) de cellules germinales est atteint au milieu de la grossesse puis chute à 2 millions à la naissance, 400 000 à la puberté et à moins de 2000 à la ménopause.

➤ Les cellules de la thèque et de la granulosa

La fonctionnalité des follicules évolue au cours de leur croissance. Elle se traduit par l'acquisition de récepteurs aux gonadotrophines et stéroïdes, l'aptitude à produire des facteurs locaux modulant la fonction gonadique et l'acquisition d'une stéroïdogénèse fonctionnelle. La croissance des follicules démarre majoritairement à partir de la puberté : les follicules primordiaux évoluent vers le stade primaire puis secondaire, stade à partir duquel se forment les cellules matures de la granulosa et de la thèque, sensibles aux gonadotrophines et impliquées dans la stéroïdogénèse ovarienne. Sous l'effet de la LH, les cellules matures de la thèque interne synthétisent de l'A4, de la testostérone et de la DHT tandis que, sous le contrôle de la FSH, les cellules de la granulosa aromatisent ces androgènes en œstrogènes. Par la suite, certains follicules poursuivent leur maturation (les autres entrant en atrésie) jusqu'au stade antral puis pré-ovulatoire (De Graff).

A ce jour, il n'est pas établi que les cellules primitives de la granulosa et de la thèque de l'ovaire fœtal possèdent une activité endocrinienne. Cependant, il a été montré que l'ovaire fœtal possède dès le second trimestre le matériel nécessaire à la synthèse (CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1) et la détection (récepteurs des stéroïdes) d'hormones stéroïdiennes, en particulier les œstrogènes [21]. En fin de grossesse, la majeure partie des follicules sont des follicules primordiaux mais certains auront atteint le stade primaire voire pré-antral comportant ainsi des cellules de la granulosa et de la thèque matures [22]. De ce fait, une activité endocrine de l'ovaire fœtal peut être observée en fin de gestation et on détecte notamment l'AMH, produite par les cellules de la granulosa, dès la 36^e semaine de grossesse [22,23].

1.1.4.4. Le rôle des gonadotrophines hypophysaires

Les gonadotrophines hypophysaires sont des hormones glycoprotéiques qui incluent la LH et la FSH. La pulsativité de la LH est le reflet de la pulsativité de la GnRH. Chez le fœtus, la GnRH est décelable dans l'hypothalamus dès la 6^e semaine de grossesse et les cellules gonadotropes hypophysaires, qui synthétisent la LH et la FSH, à partir de la 9^e semaine (soit après la période de différenciation sexuelle) [24,25]. Chez le fœtus mâle, l'Hormone chorionique gonadotrope (hCG) placentaire (activité de type LH produite dès le début de la grossesse), puis la LH (aux alentours de la 8^e semaine), se lient aux récepteurs spécifiques des cellules de Leydig pour stimuler la sécrétion de testostérone. Ces récepteurs sont également exprimés dans les cellules de Sertoli et vont stimuler la production d'INSL3 [26,27]. La FSH se lie aux récepteurs spécifiques des cellules de Sertoli et provoque la synthèse de l'ABP. Chez le fœtus femelle, les récepteurs ovariens de la LH ne sont pas exprimés avant la 16^e semaine de grossesse et ceux de la FSH apparaissent à la fin du second trimestre de grossesse [28]. Les gonadotrophines hypophysaires ne sont pas nécessaires à la différenciation sexuelle des gonades mais sont largement impliquées dans le développement des organes génitaux externes, et particulièrement chez le garçon (descente testiculaire, croissance du pénis).

1.1.4.5. Evolution des niveaux d'hormones au cours de la grossesse

a. Les niveaux d'hormones maternelles

Chez la femme enceinte, les niveaux de progestérone et d'œstrogènes augmentent régulièrement au cours de la grossesse. Le pic de production de l'hCG placentaire est observé entre la 6^e et la 12^e semaine de grossesse, puis diminue fortement jusqu'à l'accouchement. Les concentrations de LH et FSH sont très faibles (indétectables) tout au long de la grossesse bien qu'une augmentation des niveaux de LH est observée au cours du 1^{er} trimestre [29]. Les concentrations de SHBG s'élèvent considérablement dès la 10^e semaine de grossesse et atteignent son maximum à 25-30 semaines de grossesse [30]. Puis les concentrations de SHBG reviennent à leurs valeurs basales une semaine après

l'accouchement. Les niveaux de testostérone, Inhibine-A et A4 augmenteraient également au cours de la grossesse [29,30]. Les niveaux d'Inhibine-B semblent plus élevés au cours du 3^e trimestre [29].

b. Les niveaux d'hormones fœtales

➤ Gonadotrophines

Les taux sériques de LH et FSH augmentent progressivement au cours de la grossesse, atteignent leur maximum à la moitié de la gestation, puis diminuent en parallèle de la diminution de la sécrétion d'androgènes (chez le fœtus mâle), l'augmentation des niveaux d'œstrogènes maternels et la mise en place de mécanismes de rétrocontrôle négatif. A la naissance, les niveaux de gonadotrophines sont très faibles voire non détectables dans les deux sexes [30].

➤ Androgènes

Les surrénales sécrètent des quantités importantes de DHEA pendant la vie fœtale. Cette sécrétion est nécessaire à la synthèse des œstrogènes par le placenta (première source de production d'œstrogènes à partir de la 8^{ème} semaine de gestation). Les variations au cours de la grossesse sont mal connues mais les niveaux de DHEA sont élevés à la naissance dans les deux sexes [30]. Chez le garçon, les concentrations de testostérone sont très élevées à la fin du premier trimestre de la grossesse, permettant la mise en place de l'appareil génital mâle, puis diminuent fortement jusqu'à atteindre des niveaux faibles à terme. La DHT n'est pas détectable au cours du 1^{er} trimestre de grossesse puisque le fœtus ne possède pas encore la 5 α -réductase. Chez la fille, les concentrations de testostérone à la naissance sont faibles mais comparables à celles du garçon à terme [30].

➤ Œstrogènes

Les concentrations d'œstrogènes sont extrêmement élevées pendant la grossesse, sans différence selon le sexe étant donné qu'elles proviennent de l'aromatation placentaire des androgènes (DHEA). Une différence selon le sexe tend à apparaître à la fin de la grossesse avec des valeurs un peu plus élevées chez les filles, suggérant un possible rôle de l'aromatase ovarienne.

➤ AMH et Inhibine-B

Chez le garçon, les concentrations d'AMH et d'Inhibine-B sont très élevées au cours de la période de la différenciation sexuelle. Puis ces concentrations diminuent jusqu'au terme mais restent élevées. Chez la femelle, l'AMH et l'Inhibine-B sont produites par les cellules somatiques de l'ovaire mais seulement dans les follicules en croissance [22]. Ainsi, les concentrations de ces deux hormones sont majoritairement non détectables chez la fille, excepté en très faibles quantités en fin de gestation [30].

1.2. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

1.2.1. Historique

C'est en 1962, suite à la parution du livre de Rachel Carson, biologiste marine américaine, que démarre certainement la prise de conscience des effets potentiels des polluants chimiques sur l'environnement. Dans son ouvrage, intitulé *Silent Spring*, Rachel Carson rapporte les dommages causés par l'utilisation massive de pesticides sur le monde vivant, du sol aux rivières, des plantes aux animaux jusqu'à l'Homme [31]. Elle rapporte notamment une augmentation de la mortalité des oiseaux et une diminution de leurs capacités de reproduction dans des régions où le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), un pesticide organochloré, était largement utilisé. Outre de nombreuses autres observations faites sur la faune et la flore, l'auteure évoque également l'impact potentiel de l'exposition aux pesticides pendant la vie fœtale sur la santé de l'enfant. Ce livre eut un grand succès aux Etats-Unis et contribua à la création de l'Agence américaine de protection de l'environnement (*Environmental Protection Agency*, US-EPA) et à l'interdiction du DDT au début des années 70. Il marquera, selon Al Gore, vice-président des USA, « l'acte de naissance du mouvement écologique ».

Cependant, ce n'est qu'au début des années 90 qu'une réelle mobilisation autour de la présence de substances chimiques dans l'environnement se met en place. De nouvelles observations ont été faites dans le milieu naturel, particulièrement chez les espèces aquatiques. Des anomalies des organes reproducteurs, voire une diminution des populations, ont été observées dans des zones polluées. On peut notamment citer l'exemple de la masculinisation de gastéropodes femelles due à l'utilisation de tributylétain (TBT) dans les peintures des coques des bateaux [32], les cas de micro-pénis chez les alligators de Floride suite au déversement massif de pesticides dans le lac Apopka [33], ou encore la féminisation des poissons mâles exposés aux effluents issus du traitement des eaux usées dans certaines rivières du Royaume-Uni [34].

Des anomalies du système reproducteur et du développement ont également été observées chez les rongeurs de laboratoire exposés à différents agents chimiques. Au cours des dernières décennies, de nombreuses publications scientifiques ont fait état d'une augmentation de l'incidence de diverses pathologies (cancer, obésité, diabète) et ont suggéré une diminution de la fertilité chez l'homme. L'ensemble de ces observations a conduit à l'hypothèse que les polluants chimiques de l'environnement seraient responsables de l'augmentation de la fréquence de ces pathologies [35,36].

1.2.2. Définitions

C'est en 1991, lors d'un colloque aux Etats-Unis, que le terme de « perturbateur endocrinien » va apparaître pour la première fois et définir « *toute substance étrangère à l'organisme susceptible d'altérer les équilibres hormonaux* ». Par la suite, en 1996, la Commission Européenne, l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le Conseil Européen des Fédérations de l'Industrie Chimique (CEFIC) se réunirent à Weybridge (UK) et précisent cette définition : les modifications de la fonction hormonale se traduisent par « *des effets néfastes sur l'organisme ou sur sa descendance* » [37]. Dans le même temps, l'US-EPA propose une définition plus mécanistique et définit comme perturbateur endocrinien toute « *substance exogène qui interfère avec la production, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme* » [38]. La définition communément adoptée aujourd'hui au sein de la communauté scientifique est celle proposée par l'OMS en 2002, et mise à jour en 2012, qui définit comme perturbateur endocrinien « *une substance exogène ou un mélange qui altère une ou des fonctions du système endocrinien et qui, par conséquent, cause des effets délétères sur la santé d'un organisme, de sa descendance ou d'une (sous-)population* » [39,40]. Notons ici, l'apparition des notions « *de mélange* » et « *de (sous-)population* ». Enfin, nous reviendrons en discussion sur la définition proposée très récemment (Juin 2016) par la Commission Européenne.

Certaines des définitions proposées ci-dessus se sont limitées à décrire la présence d'une propriété hormonale de la substance, sans préjuger des conséquences (effets néfastes). Une telle approche s'apparente et se limite à la description d'un mécanisme d'action. D'autres définitions ont tenté de mettre l'accent sur le caractère néfaste des effets, sans pour autant les préciser. Quelle que soit la ou les définitions retenues, les propriétés hormonales attribuées à diverses substances chimiques et l'influence de cette activité sur les systèmes endogènes, soulèvent de nombreuses questions sur leur rôle éventuel dans la survenue de pathologies. Le concept de perturbation endocrinien ayant été étendu par la suite à de nombreux systèmes hormonaux, la liste potentielle des effets indésirables s'est élargie.

A ce jour, il n'existe pas de classification harmonisée des perturbateurs endocriniens mais différentes autorités ont établi des listes de perturbateurs endocriniens potentiels [41]. L'UE a notamment identifié plus de 500 molécules suspectées d'être des perturbateurs endocriniens dont certaines ont été classées comme substances prioritaires du fait de la fréquence de leur exposition dans la population [42,43].

1.2.3. Exemples et sources d'exposition aux perturbateurs endocriniens

Parmi les perturbateurs endocriniens, on distingue en premier lieu les hormones naturelles telles que les phyto-œstrogènes naturellement présents dans certaines plantes (soja, luzerne) et les hormones de synthèse utilisées en thérapeutique (contraception, hormonothérapie). Un second groupe de perturbateurs endocriniens, bien plus large, rassemble tous les produits chimiques et sous-produits industriels qui peuvent interférer avec le système endocrinien. Il existe une grande diversité de perturbateurs endocriniens potentiels qui sont pour la plupart issus de l'industrie agro-chimique (pesticides, plastiques, médicaments...) et de leurs rejets. Parmi les plus fréquents, on peut citer des produits industriels ou domestiques comme les phtalates, ou le bisphénol A utilisés dans les plastiques, les parabènes utilisés comme conservateurs dans les cosmétiques ou encore les polychlorobiphényles, utilisés dans le passé dans les condensateurs électriques, ou certains pesticides (Tableau 2). Certains composés sont également produits de manière non intentionnelle par combustion dont les dioxines, furanes et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Tableau 2 : Exemples de familles de molécules à effet perturbateur endocrinien et leurs sources potentielles
Source : Expertise collective AFSSET INSERM, 2008: Cancer et environnement[44]

Famille chimique	Sources potentielles	Exemples
Phtalates	Plastiques, cosmétiques	Dibutyl phtalate
Alkylphénols	Détergents, plastiques, pesticides	Nonylphenol
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Sources de combustion: fumée de cigarette, émission des moteurs diesels, incendies	Benzo(a)pyrène
Polychlorobiphényles	Transformateurs électriques	PCB, Arochlor
Anciens pesticides	Résiduels de stockage, pollution rémanente	DDT, Dieldrine, Chlordane
Autres pesticides	Agriculture, nettoyages urbains, jardins particuliers	Atrazine, Ethylène thiourée, Heptachlor, Lindane, Malathion
Retardateurs de flamme	Mousses pour les mobiliers, tapis, équipements électroniques	Polybromodiphényles (PBDE)
Dérivés phénoliques	Désinfectants, plastiques, cosmétiques	Bisphénols A, Parabens, Halogéno-phénols

Les voies d'exposition aux perturbateurs endocriniens sont orale (via l'eau et l'alimentation), respiratoire (air) et cutanée (via l'utilisation de cosmétiques par exemple) [44]. L'exposition aux perturbateurs endocriniens de la population générale concerne de faibles doses mais de façon continue. Des niveaux d'exposition plus importants sont observés dans certains secteurs professionnels, tant au niveau de la production que de l'utilisation, dont l'agriculture, les industries chimiques et pharmaceutiques, le secteur des cosmétiques et le traitement des déchets [45].

1.2.4. Les effets toxiques des perturbateurs endocriniens

1.2.4.1. Toxicocinétique

La toxicocinétique inclut les phénomènes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion des xénobiotiques (Figure 6). Le processus de métabolisme des xénobiotiques implique de nombreux systèmes enzymatiques dont l'activité peut être modifiée par des perturbateurs endocriniens. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, certains xénobiotiques seront stockés dans l'organisme pendant plusieurs années (ex : polluants organiques persistants), tandis que d'autres seront rapidement éliminés, sous forme inchangée ou de métabolites. La toxicocinétique dépend également d'autres facteurs : génétiques, physiopathologiques ou environnementaux.

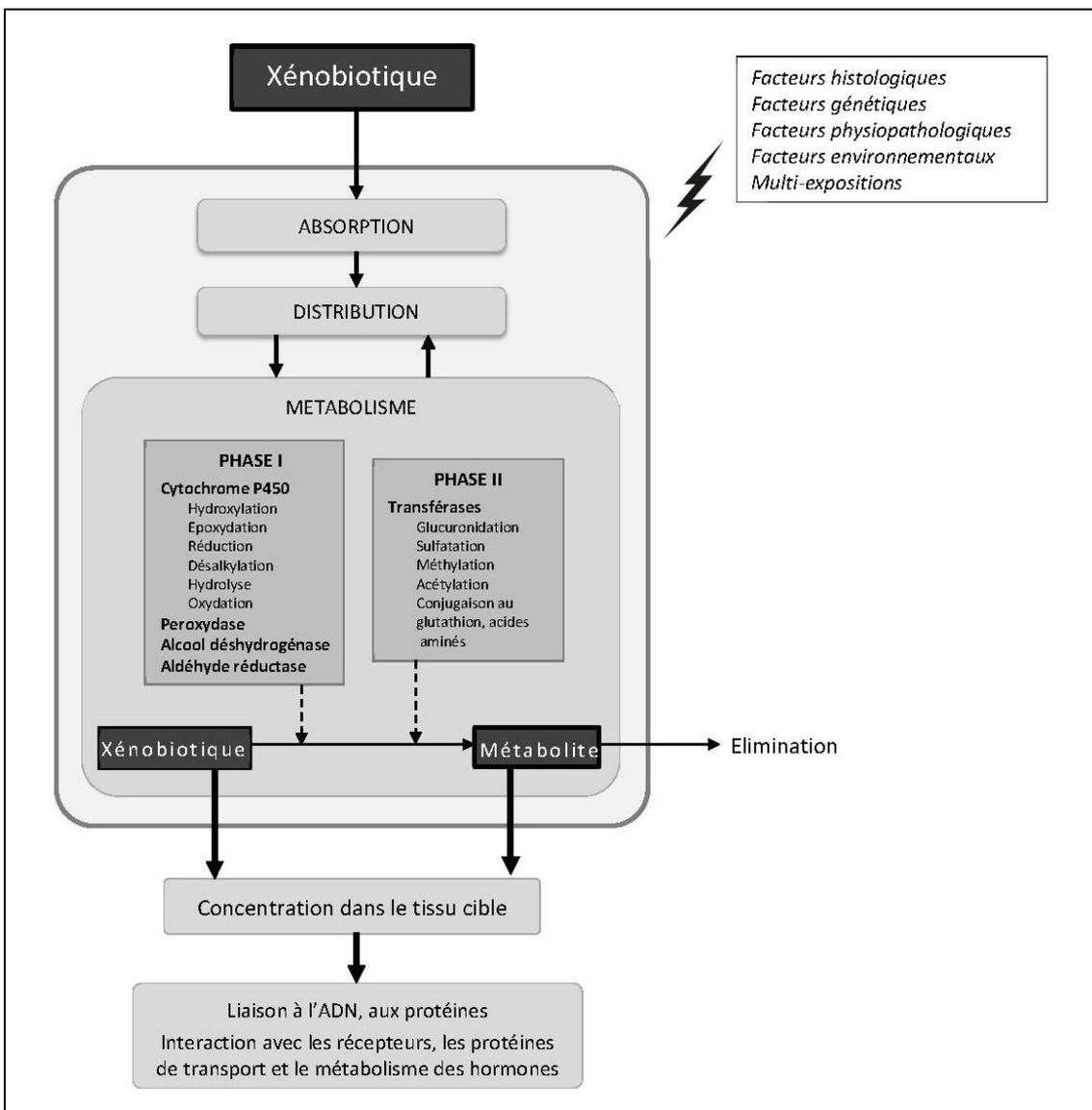


Figure 6 : Toxicocinétique des xénobiotiques.

Source : adaptée de Inserm 2011 [6]

Pendant la grossesse, le placenta est responsable de la grande majorité des échanges entre la mère et le fœtus, y compris les xénobiotiques. Comme pour les autres organes, le passage transplacentaire des xénobiotiques est tributaire de leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi, un certain nombre de xénobiotiques de faible poids moléculaire va traverser le placenta par diffusion passive, d'autres seront métabolisés par les enzymes placentaires et les métabolites ainsi formés pourront atteindre la circulation du fœtus alors que d'autres substances mères ou métabolites ne traverseront pas le placenta et n'atteindront donc pas le fœtus [46].

1.2.4.2. Mécanismes de perturbation endocrinienne

Certaines molécules sont capables d'interférer avec le système endocrinien et ainsi modifier l'équilibre hormonal. Ces molécules, d'origine naturelle (comme les phyto-estrogènes) ou artificielle (comme certains médicaments ou substances chimiques), peuvent agir de différentes manières :

- 1) En mimant l'action d'une hormone endogène en se fixant à son récepteur (=effet agoniste)
- 2) En bloquant les récepteurs et empêchant ainsi l'action de l'hormone endogène (=effet antagoniste)
- 3) En modifiant la production, le transport ou le métabolisme des hormones endogènes ou des récepteurs.

Les perturbateurs endocriniens peuvent également avoir un impact sur la synthèse des enzymes qui participent à leur métabolisme (ex : cytochrome P450, CYP450) [6].

Les précisions qui vont suivre sur ces différents modes d'action des perturbateurs endocriniens concernent plus particulièrement les hormones stéroïdiennes.

a. Interaction avec les récepteurs

Les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens les mieux étudiés concernent leur interaction avec les récepteurs nucléaires et notamment les récepteurs aux œstrogènes ou aux androgènes. Les récepteurs nucléaires sont déterminants dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, le développement, l'homéostasie et le métabolisme. Certains perturbateurs endocriniens peuvent ainsi se lier à ces récepteurs et les activer ou les inactiver de façon inappropriée : on parle alors de perturbateurs endocriniens à action œstrogénique ou anti-œstrogénique dans le cadre des récepteurs aux œstrogènes (ER α ou ER β) et à action androgénique ou anti-androgénique dans le cadre du récepteur AR. Hormis les récepteurs nucléaires, certains perturbateurs endocriniens peuvent interagir avec des récepteurs transmembranaires (récepteurs des neurotransmetteurs, dopaminergique).

b. Modification de la synthèse ou du métabolisme des hormones

La stéroïdogénèse repose en une succession de réactions enzymatiques nécessaires à la synthèse des stéroïdes à partir du cholestérol (cf section 1.1.2). Les perturbateurs endocriniens peuvent avoir un impact sur la synthèse même de ces enzymes (au niveau hépatique par exemple) ou en moduler l'activité. Parmi les enzymes particulièrement intéressantes dans l'étude des perturbateurs endocriniens citons l'aromatase, une enzyme responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes, et la 5 α -réductase qui va convertir la testostérone en DHT. Une activation de l'activité aromatase en réponse à un perturbateur endocrinien aurait comme conséquence une modification du ratio androgènes/œstrogènes.

c. Altération du transport des hormones

Les perturbateurs endocriniens peuvent également interagir avec les protéines de transport des hormones stéroïdiennes comme la SHBG. D'une part, ils peuvent se lier à la protéine de transport en lieu et place des hormones endogènes et d'autre part ils peuvent modifier la quantité de protéines circulantes dans le sang, par exemple en altérant la synthèse hépatique. Par conséquent, les perturbateurs endocriniens pourraient modifier les proportions de fractions libres et liées de stéroïdes endogènes, la fraction libre étant la fraction biologiquement active.

1.2.4.3. Autres mécanismes d'action

Au niveau cellulaire, certains perturbateurs endocriniens sont suspectés d'affecter les processus d'apoptose, de prolifération et de différenciation cellulaires au sein des organes composant le tractus reproducteur notamment. L'apoptose des cellules germinales peut conduire à une diminution du nombre de gamètes et donc à une baisse de la fertilité. A l'inverse, une diminution de l'apoptose pourrait être impliquée dans le développement de cellules cancéreuses. Un dérèglement de la prolifération ou de la différenciation des cellules germinales fœtales peuvent également induire des troubles de la fertilité et ont été suspectés dans la survenue de cancer.

Des mécanismes épigénétiques ont également été avancés : les perturbateurs endocriniens pourraient interférer avec le processus normal de méthylation de l'ADN et conduiraient à des anomalies de l'expression des gènes. Il a été montré que ces marqueurs épigénétiques étaient transmissibles par mitose ce qui pourrait expliquer les effets trans-générationnels parfois observés. Les marqueurs épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN subissent, au cours de la période fœtale, des modifications considérables liées à la mise en place des tissus et des organes. La moindre perturbation de ces modifications physiologiques peut ne pas se traduire par un changement fonctionnel immédiat, mais pourrait avoir un effet différé et altérer l'expression des gènes à l'âge adulte.

Toutes les substances qui ont une activité endocrinienne ne sont pas forcément qualifiées de perturbateur endocrinien. Le système hormonal dispose en effet de mécanismes de régulation qui permettent à l'organisme de corriger certaines modifications hormonales, prévenant ainsi l'apparition d'un effet néfaste. Il faut également souligner que toutes les substances toxiques pour la reproduction ne sont pas nécessairement des perturbateurs endocriniens. L'exemple communément cité est celui de certains solvants (éthers de glycol, éthanol) qui ont une action toxique directe sur les gonades, mais n'interagissent a priori pas avec le système endocrinien. Nous reviendrons sur le potentiel endocrinien des éthers de glycol dans la suite de cette thèse.

1.2.4.4. Fenêtre de susceptibilité

Les perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets tout au long de la vie, en interagissant avec les mêmes voies de signalisation que celles des hormones endogènes. Cependant leurs effets sur la santé varient selon l'âge et l'état physiologique des individus exposés. Il existe ainsi des fenêtres de susceptibilité (ou périodes de vulnérabilité) durant lesquelles les êtres vivants seraient plus sensibles à l'action des perturbateurs endocriniens comme la gestation, l'enfance et l'adolescence. Ces périodes sont particulièrement sensibles aux facteurs exogènes, d'une part du fait de la croissance et de la différenciation rapide des cellules, et d'autre part dû à des épisodes de forte activité endocrinienne. A partir des années 60-70s, David Barker s'intéressa au rôle de l'environnement périnatal sur l'apparition des maladies chroniques à l'âge adulte. Après plusieurs années de recherche, il démontra notamment que la sous-nutrition pendant la grossesse était responsable de l'apparition de maladies cardio-vasculaires [47]. Ses recherches ont ainsi donné lieu au concept de l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD pour *Developmental Origins of Health and Disease*) selon lequel la plasticité de l'organisme, au cours des périodes critiques de développement que sont la vie fœtale et l'enfance, permettrait à l'environnement (nutrition, infection, chimique) de programmer de manière permanente le métabolisme et être ainsi déterminant dans l'apparition de pathologies plus tard au cours de la vie [48,49]. Chez l'homme comme chez l'animal, la période prénatale est particulièrement importante pour la mise en place des fonctions endocrines et reproductives. Pendant la grossesse, les perturbateurs endocriniens pourraient ainsi affecter la programmation des cellules et tissus en développement et aboutir à des effets permanents et irréversibles. Ils pourraient notamment interférer avec les stéroïdes sexuels, impliqués dans la différenciation sexuelle, ou les hormones thyroïdiennes, impliquées dans le développement du cerveau. Le début de la période postnatale est également une autre fenêtre de susceptibilité importante aux perturbateurs endocriniens avec la poursuite du développement du cerveau et l'activation et la mise en place des mécanismes de rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique. Plus récemment, un effet transgénérationnel des perturbateurs

endocriniens a été suggéré laissant à penser que les mécanismes mis en jeu relevaient d'une programmation épigénétique. Ainsi, l'environnement des parents au cours de la période pré-conceptionnelle, notamment chez le père, jouerait également un rôle important dans l'apparition des maladies [50].

1.2.4.5. Effets sanitaires chez l'Homme résultant potentiellement des perturbateurs endocriniens

Les effets des perturbateurs endocriniens les plus étudiés à ce jour concernent la reproduction. Chez l'Homme, certains perturbateurs endocriniens ont été associés à diverses anomalies de la reproduction : malformations de l'appareil génital du garçon (cryptorchidie et hypospadias), diminution de la qualité du sperme, troubles des cycles menstruels, augmentation du délai nécessaire à concevoir, endométriose, puberté précoce... Les perturbateurs endocriniens sont également suspectés de jouer un rôle dans l'apparition de cancers hormono-dépendants tels que les cancers du sein, de l'utérus, de la prostate et du testicule. Certains auteurs suggèrent que les malformations génitales du garçon, la moindre qualité du sperme et le cancer du testicule ont une origine fœtale commune et dénomment l'association de ces troubles sous le terme de syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS), entité qui reste toutefois débattue au sein de la communauté scientifique [35]. Hormis les effets sur la reproduction, les perturbateurs endocriniens auraient également des effets néfastes sur le neurodéveloppement de l'enfant, les maladies métaboliques (obésité, diabète) ou les fonctions immunitaires (asthme, allergies). Cependant, les études épidémiologiques ne permettent pas d'affirmer avec certitude que ce sont bien ces substances qui sont responsables de l'effet observé. A ce jour, seul le diéthylstilbestrol (DES) est un perturbateur endocrinien avéré chez l'Homme. Cette molécule aux propriétés œstrogéniques puissantes a été prescrite aux femmes enceintes – d'abord aux USA dès la fin des années 30, puis en France dès les années 50 – afin de prévenir le risque de fausse couche. Dans les décennies qui ont suivi les premières prescriptions, un nombre important de pathologies génitales ont été rapportées chez les enfants exposés in utero, particulièrement les filles, incluant notamment des cancers du vagin et de l'utérus et une stérilité. Chez les garçons, le DES ne semble pas affecter la fertilité ni l'apparition de cancer mais pourrait être à l'origine d'un certain nombre d'anomalies urogénitales (kystes de l'épididyme, hypospadias, cryptorchidie). La prescription de ce médicament a été interdite chez les femmes enceintes plusieurs années après sa 1^{ère} commercialisation (interdite en 1971 aux USA et en 1977 en France) et on estime, en France, que près de 200 000 femmes ont pris du DES pendant leur grossesse. Des effets trans-générationnels ont aussi été suggérés chez les petits-enfants des femmes qui ont pris du DES, ce qui en fait, encore aujourd'hui, une problématique d'actualité [51–53].

1.2.5. Méthodes d'évaluation des perturbateurs endocriniens

Au vu des différents critères donnés pour l'identification des perturbateurs, les effets à étudier peuvent être représentés selon trois niveaux (Figure 7) :

- 1) La substance testée doit montrer un effet mécanistique mettant en jeu un mécanisme de perturbation endocrinienne (ex : interaction avec les récepteurs nucléaires)
- 2) La substance testée doit montrer un effet biologique (ex : diminution du poids des organes génitaux ou modification des niveaux d'hormones)
- 3) Les effets biologiques observés doivent entraîner un effet nocif sur la santé (effets biologiques non compensés par l'organisme)

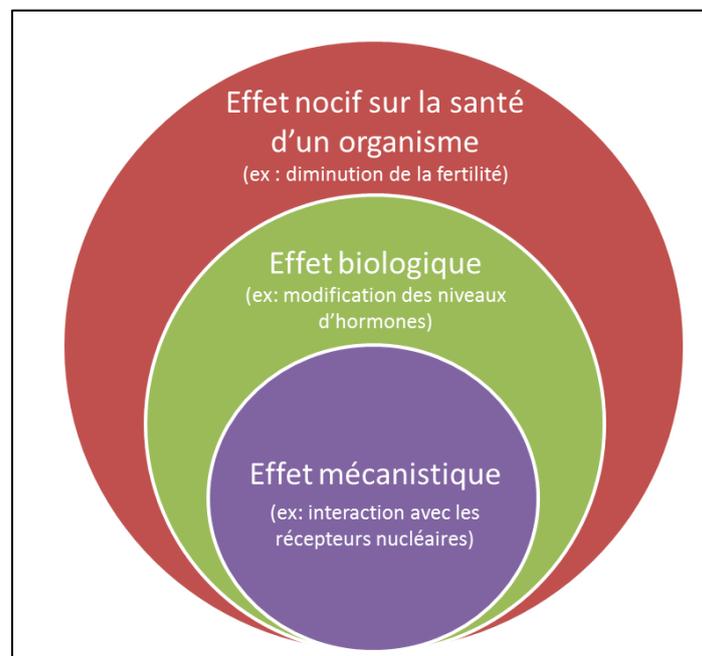


Figure 7 : Schématisation des différents types d'effets définissant les perturbateurs endocriniens

Pour démontrer une preuve scientifique en matière de risque lié à l'environnement, deux disciplines doivent collaborer : la toxicologie qui explore les effets mécanistiques et biologiques des dangers, mais ne sont pas toujours extrapolables aux populations humaines, et l'épidémiologie qui détecte les dangers en population humaine, compte tenu des niveaux d'exposition aux polluants, mais ne peut que suggérer des mécanismes à l'origine des maladies. Des allers-retours sont donc constamment nécessaires entre ces deux disciplines.

1.2.5.1. Les études de toxicologie

L'une des particularités des perturbateurs endocriniens est qu'ils produisent leurs effets via des mécanismes de signalisation physiologiques et non via les mécanismes classiques de toxicité. Il est notamment difficile d'identifier leurs cibles et de différencier les effets directs de ceux résultant de régulations physiologiques inappropriées. Par conséquent, des tests *in vitro* et *in vivo* spécifiques, aujourd'hui validés et recommandés par l'OCDE, ont été développés. Les tests *in vitro* sont essentiels pour comprendre les mécanismes d'action : certains permettent de caractériser l'activité d'une substance vis-à-vis d'un récepteur hormonal et d'autres d'évaluer l'effet d'une substance vis-à-vis d'un paramètre de la fonction de reproduction (expression de gènes cibles, effets cellulaires tels que apoptose, prolifération cellulaire ou dommages à l'ADN). Les tests *in vivo* permettent quant à eux d'avoir une vue d'ensemble de la toxicité d'une substance. Chez l'animal, trois tests *in vivo* sont entre autres utilisés : 1) le test utéro-trophique qui consiste à évaluer le poids de l'utérus après exposition de femelle immature et qui met en évidence l'effet œstrogénique ou anti-œstrogénique du produit testé, 2) le test de Hershberger qui permet de détecter l'activité androgénique ou anti androgénique (OECD, 2009) en mesurant les variations pondérales des organes et tissus mâles (prostate, vésicules séminales, pénis, muscles bulbo-caverneux..), et 3) le test OCDE 407, une étude de toxicité répétée sur 28 jours permettant le recueil de nombreux paramètres tels que le poids et l'histopathologie des organes reproducteurs, la présence de malformations des organes génitaux, les niveaux d'hormones circulants, la qualité spermatique ou encore la qualité des cycles œstraux. D'autres méthodes qui se sont développées au cours des dernières années grâce aux progrès des outils informatiques peuvent également être utiles à l'identification de perturbateurs endocriniens et à la compréhension de leurs mécanismes. Elles incluent notamment des méthodes dites *in silico*, qui consistent à simuler ou modéliser un phénomène biologique (notamment à partir de la structure et des caractéristiques physico-chimiques de la substance à étudier) et des méthodes dites *omics*, qui permettent d'obtenir de nombreuses informations sur la réponse cellulaire et/ou tissulaire, que ce soit au niveau de l'ADN (génomique), de l'ARN (transcriptomique), des protéines et peptides (protéomique) ou des métabolites (métabolomique).

La toxicologie est une science expérimentale : elle utilise des modèles de laboratoire pour tester la toxicité d'une substance en contrôlant l'ensemble des paramètres de l'expérience ; seule l'exposition sera variable. De ce fait, les études toxicologiques permettent d'évaluer avec un niveau de preuve élevé l'effet de la substance testée. Cependant, la principale limite de ces études réside dans la difficulté de l'extrapolation des résultats obtenus chez l'animal (ou sur des cultures de cellules) aux effets potentiellement observables chez l'Homme, et des études épidémiologiques sont ainsi nécessaires.

1.2.5.2. Les études épidémiologiques

a. Les principaux types d'étude

Deux types d'études épidémiologiques sont communément utilisés en épidémiologie environnementale et reconnus pour leur niveau de preuve satisfaisant : les études de cohortes et les études cas-témoins. Le net avantage des études de cohortes est qu'elles permettent un suivi prospectif des individus avec une évaluation de l'exposition qui précède l'apparition de la maladie. Les études de cohortes de naissances sont d'autant plus intéressantes qu'elles permettent d'évaluer les expositions pendant la période critique du développement fœtal et de les mettre en regard des évènements de santé visibles dès la naissance ou à la puberté ou à l'âge adulte. En règle générale, les risques associés aux expositions environnementales chez l'Homme sont relativement faibles, or plus les effets seront subtils et plus la taille de l'échantillon d'étude nécessaire à la mise en évidence de ces effets devra être importante. Lorsque l'évènement de santé étudié est rare, comme c'est le cas des malformations congénitales par exemple, les études cas-témoins seront préférées afin de recruter un plus grand nombre de cas à moindre coût. Cependant, ce type d'étude est sujet à différents types de biais (davantage contrôlés dans les études de cohortes) incluant un biais de sélection. Le choix des témoins est particulièrement délicat et le taux de participation des cas et des témoins peut parfois différer et ainsi engendrer des erreurs dans l'estimation du risque. De même, le caractère rétrospectif de l'évaluation de l'exposition est une limite majeure de ces études et est souvent sujet aux critiques. Une alternative permettant de contrer les limites liées aux études de cohortes (proportion de cas) et aux études cas-témoins (participation et mesure de l'exposition) est de combiner ces deux types d'étude pour réaliser une étude cas-cohorte ou une étude cas-témoins nichée dans une cohorte. Ce type d'étude permet ainsi d'améliorer la qualité de la mesure des expositions en se limitant à un sous-groupe de sujets, plutôt que d'étudier l'ensemble de la cohorte et épuiser les ressources financières et logistiques (i.e., épuisement des prélèvements biologiques). Enfin, pour augmenter la taille de la population d'étude, la mise en commun de données issues de différentes cohortes se développe mais ce type de pratique peut biaiser les estimations si les populations sources sont très différentes (ex : projets européens) et que les instruments de mesure de l'exposition, de la maladie et des facteurs de risque ne sont pas harmonisés [54].

b. L'évaluation de l'exposition

L'évaluation de l'exposition est une question centrale en épidémiologie environnementale puisque les erreurs de mesure peuvent aboutir à un biais dans l'estimation de la relation polluant-effet sanitaire et également réduire la puissance statistique [55]. Contrairement aux études toxicologiques, l'épidémiologie n'a aucun contrôle sur le niveau, la durée et la fenêtre d'exposition

des individus. Plusieurs méthodes existent pour évaluer les expositions environnementales (toutes ne sont pas présentées ici) et le choix d'une méthode en particulier dépend des caractéristiques physicochimiques, des sources et des voies d'exposition du composé chimique étudié. Par exemple, les études s'intéressant à la pollution atmosphérique estiment généralement le niveau auquel les individus sont exposés (dose externe) en utilisant des méthodes de « monitoring » environnemental ou individuel. Cette approche n'est pas vraiment adaptée à l'étude de polluants chimiques ayant des voies et des sources d'exposition multiples comme c'est le cas des pesticides ou des solvants. La mesure des expositions par questionnaire est la méthode la plus simple et la moins coûteuse à mettre en œuvre mais est sujette à un manque de précision dans l'estimation de l'exposition, d'autant plus marqué lorsque les sources sont multiples. A l'inverse, l'utilisation de biomarqueurs d'exposition (molécule mère ou métabolite mesuré dans les fluides biologiques : sang, urine, lait, cheveux...) est considérée comme la mesure la plus précise de l'imprégnation d'un individu, intégrant l'ensemble des sources et voies de contamination (dose interne), mais est aussi l'une des plus coûteuses. Cette méthode ne garantit pas pour autant l'absence d'erreurs de mesure. En effet, les biomarqueurs d'exposition reflètent le niveau d'exposition à un moment donné et cela est d'autant plus vrai lorsque la demi-vie du composé étudié est courte et que le niveau d'exposition varie au cours du temps. Cette méthode suppose une bonne connaissance de la pharmacocinétique et du métabolisme des différentes molécules et nécessite de disposer de prélèvements et de techniques de mesures appropriés.

En règle générale, les effets d'une substance chimique sur la santé humaine ont plus de chances d'être mis en évidence lors de contaminations accidentelles de grande ampleur (ex : catastrophes de Seveso et dioxines, de Yucheng et PCB), ou en milieu professionnel, où les niveaux d'exposition sont plus élevés qu'en population générale. Des matrices emploi-exposition peuvent être utiles pour évaluer les expositions professionnelles à partir de l'intitulé de l'emploi, du type d'entreprise et éventuellement de la période d'emploi. Une matrice emploi-exposition a d'ailleurs été spécialement construite pour estimer les probabilités d'exposition à sept classes de perturbateurs endocriniens potentiels (pesticides, phtalates, composés organochlorés, alkylphénols, composés biphénoliques, métaux lourds, et autres composés) en milieu professionnel [56].

c. La causalité

L'épidémiologie est une science d'observation : elle va constater d'éventuelles relations entre l'exposition à une substance et l'apparition d'une maladie mais, contrairement aux études expérimentales, ne permet pas d'affirmer avec certitude que c'est bien la substance d'intérêt qui est responsable de la maladie (i.e., relation causale). En effet, les différences interindividuelles liées aux modes de vie, aux susceptibilités génétiques ainsi qu'à la multitude d'expositions auxquelles les

individus sont exposés sont autant de facteurs susceptibles d'introduire une erreur dans l'estimation du risque appelée biais de confusion. L'effet de confusion potentiel dû à un facteur peut être pris en compte aussi bien par appariement au moment de la constitution de l'échantillon que par ajustement au moment de l'analyse. Le choix des facteurs d'appariement et d'ajustement est complexe mais primordial pour s'assurer que l'effet observé n'est pas lié à une confusion résiduelle. A l'inverse, un sur-appariement ou un sur-ajustement pourraient masquer artificiellement l'association entre l'exposition étudiée et l'évènement de santé. Bien que le niveau de preuve des études épidémiologiques ne soit pas aussi convaincant que celui des études toxicologiques (du fait de la multitude de facteurs extérieurs difficiles à contrôler), ces études, puisque pertinentes pour la santé humaine, sont un réel outil d'aide à la décision en Santé Publique.

1.2.5.3. Difficultés d'identification des perturbateurs endocriniens

L'identification des perturbateurs endocriniens et l'évaluation de leurs risques sanitaires sont complexes et sujettes à controverse, en raison notamment de l'absence de critères harmonisés en matière d'identification et d'évaluation du caractère perturbateur endocrinien des substances chimiques (de récents critères ont été proposés par la Commission Européenne et sur lesquels nous reviendrons en discussion). D'autres facteurs complexifient encore cette évaluation. L'approche de la toxicologie réglementaire qui consiste traditionnellement à faire l'hypothèse qu'il existe une relation monotone entre la dose et l'effet ne semble pas s'appliquer aux perturbateurs endocriniens. Des relations non monotones ont été rapportées suggérant ainsi des effets à de faibles doses et la probable absence de dose sans effet dans certaines circonstances [57]. Ces relations non monotones peuvent notamment s'expliquer par divers mécanismes comme par exemple une compétition entre récepteurs, une régulation négative du nombre de récepteurs ou encore par la combinaison de deux réponses monotones affectant un processus commun mais dans des directions opposées [57]. La mesure de l'exposition pendant les fenêtres de susceptibilité de l'organisme, notamment la période périnatale, représente également un enjeu dans l'estimation des risques et particulièrement quand le délai de latence est long. A cela s'ajoute la présence diffuse dans l'environnement de multiples substances et leurs possibles interactions dans l'organisme (effets « cocktails »). De plus, parce que le système hormonal est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions de l'organisme, la multiplicité d'effets cliniques possiblement attribuables à certains perturbateurs endocriniens et leur mise en relation avec les effets moléculaires observés à partir d'études expérimentales (extrapolation animal-Homme) constituent de vrais défis pour la recherche et la réglementation de ces substances.

1.3. INDICATEURS D'ALTERATION DU DEVELOPPEMENT DU SYSTEME REPRODUCTEUR A LA NAISSANCE

1.3.1. Généralités

Comme mentionné précédemment, le développement du système reproducteur est un processus long et complexe, impliquant une parfaite harmonie de l'équilibre hormonal dès les premières semaines de grossesse et ce jusqu'à l'âge pubertaire. Une altération de ce développement peut avoir des conséquences sur la santé reproductive à l'âge adulte incluant une baisse de la fertilité ou l'apparition de cancers hormono-dépendants. Ainsi, l'identification d'indicateurs cliniques ou biologiques d'anomalie du développement du système reproducteur à la naissance, permettrait d'une part d'améliorer les connaissances sur l'origine développementale des maladies et d'autre part d'améliorer la prévention chez des sujets potentiellement plus à risque de développer certaines pathologies plus tard au cours de leur vie.

Parmi les anomalies du système reproducteur identifiables à la naissance, citons en premier lieu les malformations congénitales de l'appareil génital incluant notamment la cryptorchidie et l'hypospade chez le garçon et, bien que moins fréquentes, les malformations des ovaires ou de l'utérus chez la fille. Il s'agit là de « pathologies » mais des indicateurs biologiques d'effet plus subtils ont été proposés, avec pour chacun des avantages (facilité de mesure) et des inconvénients (variabilité de jugement, invasif). La distance anogénitale, c'est-à-dire la distance qui sépare l'anus de la base du pénis ou de la vulve, est une mesure couramment utilisée dans les études animales, et plus récemment dans les études épidémiologiques, et qui traduit l'action androgénique du fœtus [58,59]. De même, le ratio digital (aussi appelé indice 2D :4D) déterminé par le rapport entre la longueur de l'index et de l'annulaire, reflèterait aussi l'action androgénique du fœtus [60]. Le sex-ratio à la naissance, c'est-à-dire le rapport du nombre de garçons et de filles nés au cours d'une période donnée, est également un indicateur qui peut se voir modifié par l'exposition aux perturbateurs endocriniens. Chez le garçon, la taille du pénis, la mesure quantitative de la position des testicules et de leur volume peuvent également être utilisés comme indicateurs d'altération du développement du système reproducteur mais leur signification biologique reste controversée [12,61]. Chez la fille, certains marqueurs d'une activité œstrogénique ont été proposés (couleur de la vulve, cytologie vaginale) mais sont peu utilisés [12]. Enfin, de par l'implication des stéroïdes sexuels dans le développement de l'appareil reproducteur, il paraît également pertinent de mesurer les niveaux circulants d'hormones au cours du développement fœtal et à la naissance [12,62]. Plusieurs études chez l'homme et l'animal ont rapporté des associations entre certains des indicateurs biologiques

mentionnés ci-dessus et les malformations de l'appareil génital. On note notamment une diminution de la distance anogénitale et de la taille du pénis chez les garçons nés avec une malformation génitale [63–65], ainsi qu'une modification de certains niveaux d'hormones tels que l'INSL-3, la FSH, ou de façon plus contrastée, la testostérone [66,67]. Dans la suite de ce chapitre, nous reviendrons particulièrement sur les hormones sexuelles mesurées à la naissance, dans le sang de cordon ombilical, et les malformations congénitales de l'appareil génital du garçon, qui sont les deux indicateurs d'altération du développement du système reproducteur, marqueurs de perturbation hormonale, étudiés dans le cadre de cette thèse.

1.3.2. Les hormones sexuelles fœtales

1.3.2.1. Choix de la matrice

Idéalement, les niveaux d'hormones sexuelles devraient être mesurés dans le sang fœtal, de préférence à différents temps de la grossesse et notamment lors du pic de testostérone qui a lieu pendant la période de différenciation sexuelle (1^{er} trimestre). Cependant, il n'est actuellement pas possible de réaliser ce type de prélèvement en population humaine sans risque pour le fœtus, et cette approche n'est donc pas éthiquement réalisable en routine. Il en est de même du prélèvement de liquide amniotique qui nécessite la réalisation d'une amniocentèse qui présente un risque pour la grossesse. Le sang maternel est parfois utilisé pour approximer la circulation fœtale mais son utilisation est discutable puisque la mesure des stéroïdes maternels ne refléterait pas les niveaux chez le fœtus (ex : le pic de testostérone fœtale au cours de la différenciation sexuelle n'est pas retrouvé dans le sang maternel) [68–70]. Le sang de cordon ombilical est une alternative intéressante car il est facilement collecté à la naissance de façon non-invasive même s'il reflète les niveaux d'hormones du fœtus uniquement en fin de grossesse [69]. C'est en pratique le seul moyen d'inclure les niveaux d'hormones fœtales dans les études épidémiologiques [68,69].

Le cordon ombilical relie le placenta au fœtus et permet les échanges de l'oxygène, des nutriments, et des stéroïdes via la circulation sanguine. Pour ce faire, il est composé d'une artère et de deux veines ombilicales. Le sang quitte le placenta, enrichi par les métabolites stéroïdiens placentaires ainsi que certains stéroïdes maternels, via la veine ombilicale. A l'opposé, les stéroïdes d'origine fœtale circulent, vers le placenta, par les artères ombilicales. La veine et les artères ombilicales possèdent donc des profils stéroïdiens différents. Cependant, de fortes corrélations ont été rapportées entre les niveaux de stéroïdes mesurés dans les deux sources sanguines et il est ainsi admis que la mesure de stéroïdes dans le sang de cordon ombilical, sans distinction de la veine ou de l'artère ombilical, est représentative du profil stéroïdien fœtal à la fin de la grossesse [71].

1.3.2.2. Interprétation biologique des niveaux d'hormones sexuelles à la naissance

En clinique, la mesure des concentrations d'hormones sexuelles à la naissance peut donner des informations sur la fonction du système endocrinien du nouveau-né et être un outil efficace pour la reconnaissance de diverses pathologies endocriniennes. Un dépistage d'hyperplasie congénitale des glandes surrénales est ainsi effectué systématiquement en mesurant les niveaux de 17-hydroxyprogestérone dans le sang du nouveau-né (test néonatal du buvard). La particularité du sang circulant dans le cordon ombilical est qu'il est composé d'un mélange de stéroïdes dont les concentrations dépendent de l'activité endocrinienne de l'unité fœto-placentaire. Ainsi, une modification des niveaux de stéroïdes dans le sang de cordon pourrait être le reflet d'un effet au niveau fœtal (e.g., gonades, corticosurrénales), placentaire (e.g., activité aromatasase) ou maternel (e.g. disponibilité du cholestérol), difficiles à distinguer. Cependant, des associations ont été mises en évidence entre des pathologies maternelles, fœtales ou placentaires et les niveaux de certaines hormones sexuelles mesurées dans le sang de cordon, ce qui confirme la pertinence de s'y intéresser [67,72–74]. La majorité des stéroïdes sexuels circulants sont liés à leurs protéines de transport (Albumine et SHBG) dont les concentrations impactent la fraction bioactive des stéroïdes. L'interprétation précise des concentrations de stéroïdes impliquent donc la prise en compte du taux de protéines de transport. Enfin, l'accouchement est un évènement particulièrement stressant et impliquant de nombreuses hormones (pas seulement stéroïdiennes) pour stimuler l'expulsion du fœtus et les concentrations d'hormones mesurées dans le sang de cordon pourraient être modifiées par ces conditions particulières liées à l'accouchement dont il faut tenir compte.

Aussi, les niveaux d'hormones à la naissance pourraient être utilisés comme des indicateurs intermédiaires d'effet entre une exposition prénatale et l'apparition d'une maladie plus tard au cours de l'enfance ou à l'âge adulte. Il est notamment suggéré que les niveaux de stéroïdes pendant la vie fœtale pourraient prédire l'apparition de pathologies au cours de la vie ultérieure. Cette hypothèse repose principalement sur des études réalisées chez l'animal et des observations faites chez des fœtus exposés à de fortes concentrations d'androgènes du fait de pathologies particulières (hyperplasie congénitale des surrénales, mère atteinte du syndrome des ovaires polykystiques). Ainsi, un excès d'androgènes serait associé, principalement chez les sujets de sexe féminin, à des anomalies de la reproduction (puberté précoce, altération du cycle menstruel, ovaires polykystiques, infertilité) [75–77], à des désordres métaboliques (résistance à l'insuline, hypertension) [78–81], ou encore à des troubles du comportement (cognition, activités liées au genre) [82–85]. Cependant, les études chez l'homme sont encore limitées par leur nombre et peu d'entre elles ont mesuré les niveaux d'androgènes chez des nouveau-nés sains. Aussi, plusieurs études épidémiologiques ont

observé une corrélation entre le poids de naissance et le risque de cancer du sein et ont suggéré que cette association pouvait s'expliquer par un excès d'œstrogènes pendant la grossesse [86].

1.3.2.3. Limites de la méthode analytique

Le sang de cordon ombilical possède un profil stéroïdien particulier dû à la combinaison des métabolismes placentaire et fœtal, nécessaire à la synthèse des stéroïdes. La présence de stéroïdes sous leur forme sulfate nécessite l'utilisation de méthodes analytiques capables de correctement discriminer les différentes formes de stéroïdes. Initialement, des méthodes de dosages radio-immunologiques étaient utilisées pour mesurer les stéroïdes dans le sang de cordon ombilical. Cependant, cette méthode a montré des limites pour mesurer de faibles concentrations de stéroïdes comme la testostérone pour laquelle des réactions croisées existent avec les autres stéroïdes [69,87]. De là, la spectrométrie de masse est devenue la méthode de référence pour mesurer de faibles niveaux de testostérone. En 2014, une étude a comparé, selon ces deux méthodes, les niveaux de testostérone et d'œstradiol mesurés dans le sang de cordon et rapportés dans la littérature [69]. Il en ressort que la méthode radio-immunologique rapporte des concentrations de testostérone plus hétérogènes et plus élevées que la spectrométrie de masse. Les concentrations d'œstradiol sont quant à elles relativement comparables. Le choix de la méthode analytique employée aura donc un impact sur les concentrations de stéroïdes mesurées dans le sang de cordon et devra faire l'objet d'une attention particulière pour l'interprétation des résultats.

1.3.2.4. Facteurs de variation des niveaux d'hormones sexuelles dans le sang de cordon ombilical

Peu d'études se sont intéressées aux facteurs de variations des niveaux d'hormones mesurées dans le sang de cordon et leurs résultats sont détaillés ci-après.

➤ Sexe de l'enfant

Les études portant sur la différence des niveaux d'hormones, autres que la testostérone, selon le sexe sont peu nombreuses et peu concluantes. Une méta-analyse récente incluant 18 études publiées entre 1980 et 2010 a comparé les niveaux de testostérone des filles et des garçons [88]. Les niveaux de testostérone mesurés dans le sang de cordon sont significativement plus élevés chez les garçons que chez les filles. Cependant, une certaine hétérogénéité est observée selon le type de méthodes analytiques utilisé et l'usage de sang veineux, artériel, ou mixte du cordon ombilical.

Les niveaux d'AMH sont nettement plus élevés chez le garçon ; ils sont quasiment indétectables chez la fille [74]. Deux études [89,90] étudiant les niveaux de SHBG rapportent des concentrations plus élevées chez le garçon mais cette différence n'est pas observée dans deux autres études [68,91]. Une seule étude [68] sur quatre [68,89,91,92] observe des niveaux d'A4 plus élevés chez le garçon. Concernant les niveaux de DHEA(S), deux études [68,91] n'observent pas de différence selon le sexe, une [89] observe des niveaux de DHEA plus élevés chez la fille tandis que deux autres suggèrent des niveaux de DHEAS plus élevés chez le garçon [92,93].

Dans leur majorité, les études [73,91,94] ne rapportent pas de différence des niveaux d'œstrogènes (E1, E2, E3, E4) selon le sexe bien qu'une étude [68] observe des niveaux plus élevés d'E2 chez les garçons et une étude [93] observe des niveaux un peu plus élevés chez les filles.

➤ Pathologies pendant la grossesse

Une diminution des niveaux d'E3 et d'œstérol (E4) dans le sang de cordon a été rapportée en cas de pré-éclampsie [73], tandis que les niveaux d'E1 et E2 ne semblent pas modifiés [73,94]. Une étude rapporte des niveaux d'androgènes (testostérone, A4, DHEA) et de SHBG comparables chez les femmes avec ou sans pré-éclampsie [89]. Cette même étude n'observe pas non plus de variation significative dans les niveaux de ces hormones en cas de prise de glucocorticoïdes anténatale bien que les concentrations de testostérone et DHEA soient légèrement plus élevées [89]. Une étude a comparé les niveaux de testostérone et d'A4 chez des femmes diabétiques et non diabétiques et ne rapporte pas de différence [95]. Une diminution des niveaux d'E2 et d'A4 est observée chez les filles (mais pas chez les garçons) de mères atteintes du syndrome des ovaires polykystiques, tandis que les niveaux de testostérone, DHEA, DHT et 17-OHP ne diffèrent pas [96].

➤ Age gestationnel

Une étude [73] observe une augmentation des niveaux d'œstrogènes (E1, E2, E3, E4) avec l'âge gestationnel tandis que deux autres études [91,97] ne rapportent pas d'association avec l'E1, l'E2 et l'E3. Les études évaluant les niveaux de DHEA(S) en association avec l'âge gestationnel observent une corrélation positive [89,91]. L'une de ces études observe également une augmentation des niveaux de SHBG et d'A4 et une diminution des niveaux de testostérone [89] mais deux autres études [91,97] ne rapportent pas ces associations.

➤ Poids de naissance

Parmi les études ayant évalué les associations entre les niveaux d'hormones sexuelles dans le sang de cordon et le poids de naissance, cinq se sont intéressées aux androgènes, huit aux œstrogènes et deux à la SHBG. Concernant les niveaux d'androgènes, deux études [91,97] observent une corrélation positive avec les niveaux de testostérone tandis que les trois autres [98–100] n'observent pas d'association. Les niveaux de DHEA et de d'A4 sont positivement corrélés avec le poids de naissance dans une étude [91] mais pas dans les autres [97,99,100]. Sept études [73,94,97–101] n'observent pas d'association avec les niveaux d'E2 tandis qu'une étude [91] observe des niveaux d'E1 et E2 plus faibles chez les enfants nés avec un petit poids de naissance (<2500g). Trois études [73,98,101] sur cinq [73,91,97,98,101] observent une corrélation positive entre le poids de naissance et les niveaux d'E3. Sur les trois études [91,98,102] étudiant la relation entre les niveaux de progestérone et le poids de naissance, seule une [98] rapporte une corrélation négative. Sur les deux études étudiant la relation entre le niveau de SHBG et le poids de naissance, une [99] observe une corrélation négative et l'autre [98] n'observe pas d'association. Cinq études [73,97,99,100,103] ont étudié le lien entre le poids du placenta et certaines hormones : une étude [103] rapporte une corrélation négative avec la testostérone mais cette corrélation n'est pas retrouvée dans les autres études [97,99,100]. Aucune des autres hormones (E1, E2, E3, E4, A4, DHEAS, SHBG, progestérone) n'a été associée au poids du placenta [73,97,99,100,103].

➤ Mode d'accouchement

Une étude [73] a comparé les niveaux d'œstrogènes, et une autre [89] les niveaux d'androgènes et de SHBG, en fonction du mode d'accouchement. En cas de travail spontané, les niveaux d'E1, E2, E3, E4, SHBG, A4 et DHEA sont plus élevés et les niveaux de testostérone sont plus faibles qu'en cas de césarienne réalisée avant travail [73,89].

➤ Age maternel

Peu d'études ont étudié les variations d'hormones dans le sang de cordon en fonction de l'âge maternel [89,91,94,97,100]. Une étude [89] sur trois [89,91,97] observe une diminution des niveaux d'A4 avec l'âge, une étude [91] sur trois [89,91,100] observe une augmentation des niveaux de DHEA(S) et une étude [94] sur quatre [91,94,97,100] observe une augmentation des niveaux d'E2 chez les femmes de moins de 25 ans.

➤ Parité

Trois études [94,99,100] rapportent une diminution des niveaux d'E2 avec l'augmentation de la parité contre une [91] qui n'observe pas de différence. Deux études [99,100] sur trois [91,99,100] observent également une diminution des niveaux de testostérone. Les niveaux d'A4 sont augmentés avec la parité dans une étude [99] mais pas dans la seconde [91]. Les niveaux de SHBG [91,99,100], de DHEAS [91,100] et de progestérone [91] n'ont pas été associés à la parité.

➤ Origine maternelle

A partir d'une population comparant les niveaux d'hormones de femmes vivant à Shanghai et à Boston, des concentrations plus élevées d'E2, E3, testostérone, A4 et SHBG ont été rapportées chez les femmes de Shanghai [104,105]. Aux États-Unis, les niveaux de testostérone et le *free androgen index* (FAI, testostérone/SHBG) sont plus faibles chez les femmes d'origine caucasienne que chez les femmes afro-américaines tandis que les niveaux d'E2, A4 et DHEAS ne diffèrent pas [99,100].

➤ Poids maternel

Parmi les quatre études [73,91,94,97] ayant évalué les associations entre le poids maternel et les niveaux d'œstrogènes (E1, E2, E3, E4), seule une [73] observe une augmentation des niveaux de E1 et E2. Les trois études s'intéressant aux niveaux d'androgènes (testostérone, A4, DHEAS) n'observent pas d'association avec le poids maternel. Le gain de poids pendant la grossesse n'a pas non plus été associé aux niveaux d'androgènes ni d'œstrogènes [97].

➤ Alcool, Tabac

Le tabagisme maternel pendant la grossesse n'a pas été associé à des variations des niveaux d'androgènes ni d'œstrogènes [73,89,91,94] excepté dans une étude qui rapporte une diminution des niveaux d'E3 [106]. Une étude a comparé les niveaux d'E2, E3 et testostérone chez les femmes ayant consommé, ou non, de l'alcool pendant la grossesse et n'observe pas de différence [107]

1.3.3. Les malformations génitales du garçon : l'hypospade et la cryptorchidie

Chez le garçon, le développement des organes génitaux externes est, en partie, sous contrôle hormonal. Une perturbation de l'équilibre hormonal au moment de la période de développement pourra entraîner des malformations congénitales de l'appareil génital du garçon dont la cryptorchidie et l'hypospade.

1.3.3.1. L'hypospade

a. Définition, prévalence et diagnostic

L'hypospade est une malformation du pénis qui se caractérise par une malposition de l'ouverture de l'urètre (méat urétral). La sévérité de l'hypospade est associée à la position du méat urinaire : l'hypospade est dite antérieure (ou balanique) si le méat est situé dans la région glandulaire, moyenne (ou pénienne) s'il est situé sur la face ventrale du pénis et postérieure s'il est situé en position péri-scrotale, scrotale ou périnéale (Figure 8) [108]. Dans la majorité des cas, une intervention chirurgicale est réalisée au cours des premières années de vie pour replacer le méat urétral en sa position normale.

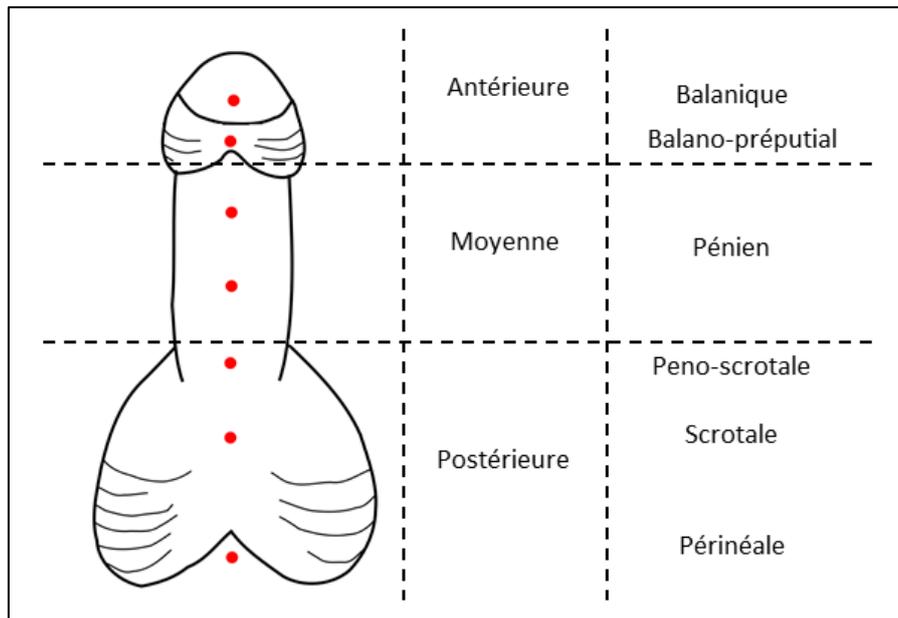


Figure 8 : Représentation des différentes formes d'hypospade

L'hypospade est une malformation congénitale avec une prévalence variant de 1 à 20 pour 1000 enfants de sexe masculin selon les régions [109]. Une augmentation de l'incidence d'hypospade a été observée entre les années 1970 et 2000. Ces disparités spatio-temporelles peuvent en partie s'expliquer par des différences dans le diagnostic et l'enregistrement des cas. Les registres de malformations ont l'avantage d'être exhaustifs dans l'enregistrement des cas d'hypospade les plus

sévères (moyenne et postérieure) mais certains d'entre eux ne recensent (ou ne recensaient) pas les formes balaniques. C'est notamment le cas du réseau européen EUROCAT qui, jusqu'en 2005, ne les enregistraient que si elles étaient associées à une malformation majeure [110]. Les données d'études de cohortes prospectives procédant à un examen clinique standardisé et un suivi adéquat des cas identifiés à la naissance peuvent aussi permettre d'estimer les taux de prévalence d'hypospade. Les données hospitalières de chirurgie sont également une autre source d'informations utile pour apprécier l'évolution temporelle de l'incidence de l'hypospade sévère ou des recours à la chirurgie.

En termes de diagnostic, il peut parfois être difficile de distinguer une hypospade balanique d'une anomalie du prépuce ce qui donne lieu à une sur-déclaration du nombre de cas. Certaines études ont rapporté une proportion de faux-positifs variant de 5 à 20% parmi les cas d'hypospades identifiés à la naissance [111–113].

b. Mécanismes

L'hypospade résulte de la mauvaise fusion des replis génitaux qui se produit au cours des 8^e-14^e semaines de gestation, pendant la période de différenciation sexuelle du fœtus. La masculinisation de l'appareil génital mâle est médiée par les androgènes et le développement du pénis est plus particulièrement induit par la dihydrotestostérone, localement produite par la conversion de la testostérone par la 5 α -réductase (cf 1.1.3.1). Plusieurs mutations génétiques sont connues pour causer une hypospade et concernent notamment des mutations au niveau des gènes impliqués dans la différenciation testiculaire (SRY), la synthèse ou la conversion de la testostérone (Steroid 5- α reductase type 2, SRD 5A2) et l'action des récepteurs aux androgènes (gène AR) [114–116]. D'autres gènes tels que les gènes Homeobox (HOX), Fibroblast growth factor (FGF), Activating transcription factor (ATF) ou Sonic Hedgehog (shh) sont également suspectés de jouer un rôle dans l'étiologie de l'hypospade [108,115–117]. Cependant, ces mutations génétiques n'expliquent que peu de cas et l'étiologie de l'hypospade reste donc majoritairement inconnue. Son origine serait multifactorielle et impliquerait ainsi de nombreux facteurs génétiques, endocriniens et environnementaux [108,115–117].

c. Facteurs de risque

➤ Antécédents familiaux

Les antécédents familiaux d'hypospade ont été associés à une augmentation du risque d'hypospade [118–124] mais des analyses de ségrégation familiale ne rapportent pas d'évidence d'une transmission génétique majeure [125,126].

➤ Durée de gestation et poids de naissance

Le petit poids de naissance (<2500g) ainsi que la restriction de croissance intra-utérine ont été associés de manière constante au risque d'hypospade [118,122,123,127–138]. Certaines études rapportent une association entre le risque d'hypospade et la prématurité (<37 semaines d'aménorrhées) [122,129,131–134,136,137] et d'autres non, notamment après ajustement sur le poids de naissance [121,123,128,135,139]. Il en est de même en cas de grossesse gémellaire : le risque d'hypospade est augmenté [118,124,128,131,133,136,140–142] mais pourrait être expliqué par un poids de naissance plus faible observé chez les jumeaux [123,127,143]. Il a été suggéré, non pas que le poids de naissance (ou la restriction de croissance) serait un facteur de risque d'hypospade, mais que ces deux facteurs partageraient une cause commune et pourraient notamment résulter d'une insuffisance placentaire [144,145].

➤ Origine ethnique

La majorité des quelques études qui se sont intéressées au risque d'hypospade en fonction de l'origine ethnique de la mère rapportent un risque plus élevé chez les mères de type caucasien [124,128,135,146–149]. A l'inverse, quatre études n'observent pas d'association [134,138,141,150].

➤ Age parental

Les études qui ont évalué le risque d'hypospade en fonction de l'âge maternel ont rapporté des résultats discordants : plusieurs d'entre elles ne rapportent pas d'association [118–123,127,135,136,138,146,150], quand d'autres observent une augmentation du risque croissant avec l'âge [124,128,141,147,148,151] ou seulement chez les femmes de plus de 35 ans [152,153] ou de moins de 25 ans [134], et enfin une qui rapporte une diminution du risque chez les femmes de plus de 35 ans [137]. L'âge paternel ne semble pas associé au risque d'hypospade [122,123,135] bien qu'une étude suggère une augmentation du risque chez les hommes de moins de 20 ans [154].

➤ Indice de masse corporelle

Plusieurs études observent une augmentation du risque d'hypospade chez les femmes en surpoids (IMC compris entre 25 et 30) ou obèses (IMC >30) [122,137,141,155,156]. Une étude rapporte une augmentation du risque d'hypospade chez les femmes en état de maigreur (IMC<18.5) [157] alors que les autres études n'observent pas d'association [119,124,130,150].

➤ Niveau d'études

Les études portant sur le risque d'hypospade en association avec le niveau d'études des femmes ou leur niveau social sont également discordantes : certaines rapportent un risque plus élevé chez les femmes ayant un haut niveau d'études [124,128,141,146], d'autres rapportent un risque plus élevé chez les femmes ayant un faible niveau d'études [118,120,121,135] ou de faibles revenus [130,134] et enfin, certaines n'observent pas d'association [122,137,148,150].

➤ Parité

La majorité des études s'accordent à dire que le risque d'hypospade est augmenté chez la femme primipare [122–124,127,128,138,141,146,148,158,159]. Cependant, quelques études ne retrouvent pas cette association [120,135–137,160].

➤ Tabagisme et consommation d'alcool

La consommation d'alcool pendant la grossesse n'a pas été associée à une augmentation du risque d'hypospade, et ce de manière constante [118,120,124,138,150]. A l'inverse, les études portant sur le tabagisme rapportent des résultats discordants : certaines rapportent une augmentation [118,130,134,135] ou une diminution [148,159,161] du risque d'hypospade et d'autres ne rapportent pas d'association [119,121,124,127,137,138,150]. Le tabagisme paternel a été associé à une augmentation du risque d'hypospade dans deux études [118,119].

➤ Alimentation

Les études portant sur le rôle de l'alimentation ne sont, elles non plus, pas concordantes. L'alimentation végétarienne est majoritairement non associée au risque d'hypospade [118,134,135] bien que deux études rapportent une augmentation du risque [137,160]. La consommation de produits de la mer est associée à une augmentation du risque d'hypospade dans deux études [121,122] et à une diminution du risque dans deux autres études [130,137].

➤ Pathologies et traitements pendant la grossesse

L'hypertension artérielle pendant la grossesse, parfois associée à une protéinurie (pré-éclampsie), fait partie des facteurs de risque d'hypospade pour lesquels l'ensemble des études s'accordent [119,123,124,127,129,136,137,143,162–167]. A l'inverse, les études portant sur le diabète (pré-existant ou gestationnel) sont discordantes, certaines rapportant une augmentation du risque d'hypospade [133,147,168] et d'autres non [119,124,136,138,140,148,169]. Quelques études isolées ont également suggérées une augmentation du risque d'hypospade en cas de fièvre [142], de grippe [160] ou d'infection virale pendant le 1^{er} trimestre de grossesse [123], de maladie thyroïdienne [124,170] ou d'antigènes de l'hépatite B [136].

Concernant les traitements pris pendant la grossesse, les enfants nés de mères ayant pris du Diéthylstilbestrol pendant la grossesse sont également plus à risque d'hypospade [51,52,171,172]. Les antiépileptiques et notamment l'acide valproïque ont été régulièrement associés à une augmentation du risque d'hypospade [163,173–177]. D'autres traitements ont également été associés à une augmentation du risque (lopéramide, nystatine, paroxétine, thérapie antirétrovirale) mais ces résultats ne reposent que sur des études individuelles [178–181]. A l'inverse, les corticostéroïdes, antibiotiques, antipsychotiques et antiasthmatiques n'ont pas été associés au risque d'hypospade [118,182–185]. La prise de contraception orale (avant ou pendant la grossesse) n'a également pas été associée à une augmentation du risque d'hypospade [118,119,123,124,137,160,186]. La majorité des études ne rapporte pas non plus d'association avec la supplémentation en fer [118,119,130] bien qu'une étude rapporte une augmentation du risque d'hypospade [160]. Les résultats concernant la prise d'acide folique sont discordantes puisque quatre ne rapportent pas d'association [118,119,135,150], deux rapportent une diminution du risque [130,134] et une rapporte une augmentation du risque [124].

➤ Fertilité

Les troubles de la fertilité ont également été associés à une augmentation du risque d'hypospade. Des études rapportent un délai nécessaire à concevoir augmenté chez les couples ayant donné naissance à un enfant atteint d'hypospade [119,135,159,187]. L'aide à la procréation par ICSI semble associée à une augmentation du risque d'hypospade [131,188–192] bien que toutes les études ne rapportent pas cette association [193,194]. La stimulation hormonale pourrait également augmenter le risque d'hypospade mais les résultats restent divergents [123,159,195–197]. A l'inverse, le recours à la fécondation in vitro [123,131,190,193,194] ne semble pas associé à une augmentation du risque d'hypospade. Enfin, deux études ont observé une diminution de la qualité du sperme chez les pères d'enfants nés avec une hypospade [187,198].

➤ Expositions professionnelles aux perturbateurs endocriniens

Plusieurs études se sont intéressées à l'exposition professionnelle aux perturbateurs endocriniens et la survenue d'hypospade. Une méta-analyse, ayant inclus neuf études (parmi 90 études publiées entre 1966 et 2008 et excluant 41 études de faibles effectifs) portant sur l'exposition aux pesticides, rapporte une augmentation significative du risque d'hypospade en association avec le travail de la mère et du père dans l'agriculture [199]. D'autres études ont évalué la probabilité d'exposition à sept catégories de substances suspectées d'être des perturbateurs endocriniens (pesticides, phtalates, composés organochlorés, alkylphénols, composés biphenoliques, métaux lourds, et autres composés) à partir d'une matrice emploi-exposition commune [120,122,134,135,200–203]. Six des

huit études observent une augmentation du risque d'hypospade en cas d'exposition maternelle à au moins une des catégories de substances mentionnées ci-dessus [122,201,202]. Plus spécifiquement, quatre observent une association avec l'exposition aux phtalates [122,134,200,201], et des associations individuelles sont rapportées avec l'exposition aux pesticides [202], aux alkylphénols [201], aux composés biphénoliques [122], aux métaux lourds [200] et aux autres composés [201]. L'une des études n'observant pas d'association à partir des expositions définies par cette matrice emploi-exposition rapporte cependant une augmentation du risque pour certaines professions (manager, scientifique, couturier, formateur, coiffeuse) [203]. Une autre étude suggère également une légère augmentation du risque d'hypospade chez les coiffeuses [204]. L'exposition professionnelle aux solvants est également suspectée d'être associée à une augmentation du risque de malformations génitales [135,205–208].

Les études utilisant la matrice emploi-exposition mentionnée ci-dessus se sont intéressées à l'exposition professionnelle paternelle et rapportent des augmentations de risque d'hypospade avec l'exposition aux pesticides [135], aux composés organochlorés et biphénoliques [200] et aux métaux lourds [201].

1.3.3.2. La cryptorchidie

a. Définition, prévalence et diagnostic

La cryptorchidie congénitale, ou non descente testiculaire, est définie comme l'absence du testicule dans le scrotum ; elle peut être uni ou bilatérale. Il s'agit d'une des malformations congénitales les plus fréquentes avec une prévalence variant entre 1 et 9% chez les nouveau-nés à terme [209,210]. Cependant, il est fréquent d'observer, au cours des 6 premiers mois de vie, une descente spontanée du testicule dans le scrotum. Ainsi, les prévalences de cryptorchidies à 3 mois sont plus faibles qu'à la naissance comme observées à partir d'une étude de cohorte danoise qui rapportait une prévalence de 9% à la naissance contre 2% à 3 mois [211]. A l'inverse, on peut également observer, une remontée du testicule au cours de l'enfance chez des enfants dont le testicule était (ou non) en position scrotale à la naissance. On parle alors de cryptorchidie acquise. Enfin, on distingue également le testicule rétractile qui peut atteindre une position supra-scrotale, notamment liée au réflexe crémastérien, mais qui est abaissable en position scrotale par manipulation [212,213]. Les cryptorchidies congénitales peuvent être classées en fonction de la position du testicule selon la classification de Scorer : le testicule non palpé (qui peut être inguinal, abdominal ou ectopique), en position inguinale, supra-scrotale, scrotale haute ou scrotale (Figure 9) [10,211].

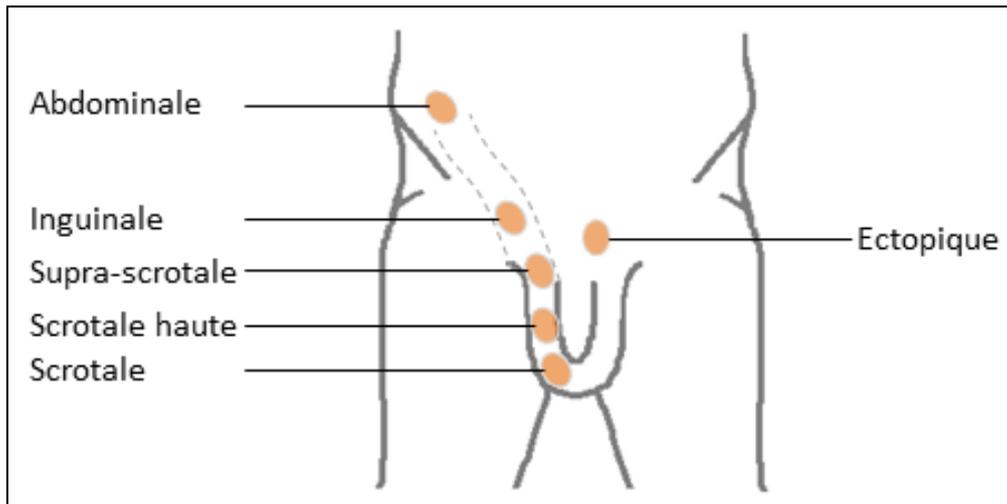


Figure 9 : Représentation des différentes formes de cryptorchidies

Lorsque la descente du testicule ne survient pas spontanément, une opération chirurgicale, appelée orchidopexie, est recommandée afin de maintenir le testicule en position scrotale, de préférence au cours de la 1^{ère} année de vie. En effet, la cryptorchidie est associée à une augmentation du risque d'infertilité à l'âge adulte et l'orchidopexie, lorsqu'elle est réalisée suffisamment tôt, réduirait les risques d'infertilité [11,117,214]. De même, la cryptorchidie est associée à une augmentation du risque de cancer du testicule mais l'effet de l'orchidopexie sur une éventuelle diminution du risque reste controversé [117,214–216].

Tout comme pour le risque d'hypospade, des variations spatio-temporelles dans les prévalences de cryptorchidies ont été rapportées : à titre d'exemple, les prévalences à la naissance rapportées dans les années 60 au Royaume-Uni et au Danemark étaient relativement similaires (2-3%) tandis qu'au début des années 2000, celles-ci ont atteint 5 et 8.5%, respectivement. Cependant, ces variations spatio-temporelles peuvent en partie s'expliquer par des différences dans la définition, le suivi et l'enregistrement des cas [117,210,217]. En effet, les prévalences peuvent varier grandement en fonction du moment auxquelles elles sont mesurées (à la naissance, à 3 mois, à 1an) et selon que les formes de cryptorchidies les plus mineures (position scrotale haute, testicule rétractile) ou acquises durant l'enfance sont ou pas enregistrées.

Ces variations spatio-temporelles peuvent aussi refléter les différentes sources d'informations utilisées pour identifier les cas (études de cohorte, registres de malformations, données hospitalières d'orchidopexie). Les données issues de cohortes de naissance obtenues à partir d'un examen clinique standardisé du nouveau-né et confirmées au cours d'un suivi postnatal, semblent les données de prévalence les plus fiables [117]. Pour ce qui est des registres, les cryptorchidies ne font pas systématiquement partie des malformations soumises à enregistrement et sont donc parfois sous

diagnostiquées [217]. En effet, par exemple, d'après le réseau EUROCAT qui est en charge de la surveillance des malformations congénitales au niveau européen, les cryptorchidies sont considérées comme des malformations mineures et ne sont soumises à enregistrement que si elles sont associées à une autre malformation congénitale considérée comme majeure [110]. EUROCAT conseille tout de même aux différents registres de les enregistrer en local mais seulement s'ils ont la possibilité de les confirmer lors d'un suivi [110]. Enfin, les données hospitalières d'orchidopexie peuvent également être utilisées comme source d'identification des cas mais celles-ci ne permettent pas toujours de différencier les cryptorchidies congénitales des cryptorchidies acquises et les variations observées peuvent aussi refléter des différences temporelles et géographiques dans les pratiques chirurgicales [217].

b. Mécanismes

La descente testiculaire peut être divisée en deux phases, toutes deux régulées par les hormones : une phase de descente trans-abdominale et une phase de descente inguino-scrotale [217–219]. La descente trans-abdominale est essentiellement due à la traction exercée par le gubernaculum testis (cordon ligamentaire) dont une extrémité est fixée au testicule et l'autre dans la région des bourrelets labio-scrotaux. En parallèle apparaît une petite évagination du péritoine appelée processus vaginal. Entre la 7^e et la 12^e semaine de grossesse, le gubernaculum va se rétrécir et attirer le testicule vers l'entrée de l'orifice interne du canal inguinal, sous l'action de l'INSL3 produite par les cellules de Leydig et de son récepteur (LGR8). A la fin du 3^e mois, la descente testiculaire est interrompue et ce n'est qu'à partir du 7^e mois de grossesse que la seconde phase de descente testiculaire va démarrer. Le testicule va poursuivre sa migration à travers le canal inguinal, sous l'effet des androgènes, en particulier la testostérone produite par les cellules de Leydig. Le processus vaginal s'allonge alors que le gubernaculum se raccourcit davantage entraînant les testicules, leurs canaux déférents et leurs vaisseaux vers le scrotum. La descente testiculaire s'achève normalement au cours du 9^e mois. Après la naissance, le processus vaginal s'oblitère.

L'INSL3 et la testostérone sont toutes deux produites par les cellules de Leydig fœtales en réponse à une stimulation par les gonadotrophines (HCG placentaire puis LH). Une altération de la sécrétion des gonadotrophines ou de l'expression de leur récepteur peut donc être impliquée dans les anomalies de la descente testiculaire. Une altération de la production d'AMH ou de l'expression de ses récepteurs peut également entraver la descente trans-abdominale du fait de la régression incomplète des canaux de Muller.

c. Facteurs de risque

Certaines cryptorchidies sont la conséquence de mutations génétiques, notamment au niveau des gènes codant pour le récepteur aux androgènes, des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse ou des régulateurs de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique [220,221]. Cependant, les causes génétiques n'expliquent qu'une très faible proportion des cas de cryptorchidie et la majeure partie d'entre elles restent d'étiologie inconnue. Plusieurs études épidémiologiques se sont intéressées aux caractéristiques maternelles et fœtales associées au risque de cryptorchidie mais leurs conclusions ne sont pas toujours concordantes.

➤ Antécédents familiaux

Le risque de cryptorchidie est augmenté en cas d'antécédents familiaux de cryptorchidies [120,121,222–224].

➤ Durée de gestation et poids de naissance

La majorité des études s'accordent à dire que la durée de gestation est inversement corrélée au risque de cryptorchidie (i.e., augmentation du risque en cas de prématurité) [127,131,132,222,224–238]. En effet, conformément à la période de descente testiculaire inguino-scrotale qui a lieu au cours du 3^e trimestre de grossesse, le risque de cryptorchidie est inversement corrélé à l'âge gestationnel. Ces études observent que le poids de naissance est également associé à un risque plus élevé de cryptorchidie, y compris après correction sur l'âge gestationnel [127,132,224,226,228–230,232,235,238]. Cependant, il a été suggéré que ces deux facteurs pouvaient être des marqueurs intermédiaires d'effets en réponse à un facteur commun, comme par exemple une anomalie placentaire [132,144]. Une augmentation du risque en cas de grossesse gémellaire est également suggérée mais pourrait être associée au plus faible poids de naissance des nouveau-nés [127,146,223,224,226,229,233,237].

➤ Origine ethnique

Peu d'études sont disponibles sur le risque de cryptorchidie selon l'origine ethnique de la mère. L'une d'entre elles [234] observe une diminution du risque chez les femmes d'origine africaine tandis que deux autres [146,222] rapportent une augmentation du risque dont l'une observant également une augmentation du risque chez les femmes d'origine asiatique. Une quatrième étude n'observe pas de différence [150].

➤ Age parental

Les résultats des études portant sur la relation entre l'âge maternel et le risque de cryptorchidie ne sont pas concordants. La majorité des études [120,121,127,135,146,150,223,229,236,237,239–241] ne rapporte pas d'association tandis que certaines observent une augmentation du risque avec l'âge [233,234] ou seulement chez les femmes de plus de 35 ans [230,238]. Deux études [230,231] rapportent également une augmentation du risque chez les femmes de moins de 20 ans alors qu'une autre étude [232] observe une diminution du risque pour cette même tranche d'âge. Une augmentation du risque de cryptorchidie chez les pères de moins de 20 ans a également été rapportée dans deux études [135,231] mais deux autres [120,229,240] ne rapportent pas d'association avec l'âge paternel.

➤ Indice de masse corporelle

Bien que la majeure partie des études [150,223,229,240–243] ne rapporte pas d'association entre l'IMC de la mère et le risque de cryptorchidie, trois études [222,227,238] rapportent une augmentation du risque chez les femmes en surpoids ou obèses. Une étude ne retrouve pas d'association entre l'IMC du père et le risque de cryptorchidie [223].

➤ Niveau d'études

La majorité des études [120,121,131,146,150,229,234,240] ne retrouve pas d'association avec le niveau d'études maternel mais trois études [135,222,232] rapportent une diminution du risque de cryptorchidie chez les femmes avec un niveau d'études ou une classe sociale élevés. Une étude ne retrouve pas d'association entre le niveau d'études du père et le risque de cryptorchidie [135].

➤ Parité

Bien que la majorité des études ne retrouvent pas d'association entre la parité et le risque de cryptorchidie [120,135,150,222,224,229,234,236,240,241], certaines autres observent une augmentation du risque chez les femmes primipares [127,146,228,232,233].

➤ Tabagisme et consommation d'alcool

La majorité des études ayant évalué l'impact de la consommation de tabac pendant la grossesse sur le risque de cryptorchidie ne retrouvent pas d'association [121,135,222,223,225,229,234,237,240,241,243]. Cependant, trois études [127,228,231] ont rapporté une augmentation du risque et une étude [238] observait une diminution du risque. Seule une étude [120] sur huit [120,222,223,228,243,244] rapporte une augmentation du risque de

cryptorchidie en cas de consommation d'alcool pendant la grossesse. Le tabagisme paternel a été associé à une augmentation du risque de cryptorchidie dans deux études [231,240] mais deux autres études ne retrouvent pas cette association [135,223]. Deux études ne rapportent pas d'association avec la consommation paternelle d'alcool [120,240].

➤ Alimentation

Il n'y a pas d'évidence quant au rôle de l'alimentation sur le risque de cryptorchidie bien qu'une étude rapporte une augmentation du risque en cas de consommation élevée de foie et d'aliments frits et fumés [121]. Les autres études ne rapportent pas d'association en cas d'alimentation végétarienne [135,223] ni avec la consommation de soja, tofu et produits de la mer [135,223,240]. Une étude [243] observe une augmentation du risque de cryptorchidie avec la consommation de café tandis qu'une autre [222] ne retrouve pas cette augmentation du risque avec le café mais avec la consommation régulière de soda. Cette dernière étude rapporte également une diminution du risque avec la consommation de thé [222]. Une étude ne retrouve pas d'association entre l'alimentation du père et le risque de cryptorchidie [223].

➤ Pathologies de la grossesse

Quelques études se sont intéressées à la relation entre le diabète gestationnel et le risque de cryptorchidie [146,169,222,223,228,234,237–239,241,242]. Une méta-analyse récente de ces études rapporte une augmentation modérée du risque de l'ordre de 1.2 et à la limite de la significativité statistique ($p=0.06$) mais avec un coefficient d'hétérogénéité relativement élevé [245]. Certaines études ont également rapporté une augmentation du risque de cryptorchidie en cas d'hypertension ou de pré-éclampsie maternelle [228,229,232,234] mais une majorité ne retrouve pas d'association [127,222,223,225,238,239]. Peu d'études se sont intéressées à l'effet potentiel des traitements pris au cours de la grossesse : quatre études [150,222,239,246] ont évalué l'effet de la prise d'analgésiques dont deux [150,222] rapportent une augmentation du risque de cryptorchidie. Une étude [223] rapporte une augmentation du risque en cas de prise de contraception orale tandis qu'une autre [239] n'observe pas d'association. Deux études rapportent respectivement une augmentation du risque de cryptorchidies en cas de prise de stéroïdes [237] et d'anti vomitif [223]. La prise d'acide folique et de supplémentation en fer n'ont pas été associés au risque de cryptorchidie [150,239].

➤ Fertilité

Les résultats des études portant sur le risque de cryptorchidie en cas de difficultés à concevoir ne sont pas concluants. Certaines études rapportent ou suggèrent une augmentation du risque en cas de recours à une aide médicale à la procréation (AMP) [131,223,229,231], ou d'historique d'infertilité [225,240], quand une autre étude ne rapporte pas d'association [135]. De plus, les résultats divergent selon le type d'AMP : une étude rapporte un risque augmenté après insémination mais pas en cas d'ICSI ou de FIV [229], tandis qu'une autre rapporte une augmentation du risque après l'ICSI mais pas la FIV [131]. Le délai nécessaire à concevoir ne semble pas associé au risque de cryptorchidie [120,135,223].

➤ Expositions professionnelles - Perturbateurs endocriniens

Trois études [135,201,202] ont évalué la probabilité d'exposition à différentes substances suspectées d'être des perturbateurs endocriniens à partir d'une matrice emploi-exposition commune [56] : l'exposition professionnelle maternelle aux pesticides est associée à une augmentation du risque de malformations génitales (29 cryptorchidies et 21 hypospades) dans une étude, à une diminution du risque dans une autre, et n'est pas associée dans la troisième, qui quant à elle suggère une association avec l'exposition aux solvants. Deux autres études rapportent une augmentation du risque de cryptorchidie en association avec le travail maternel dans le secteur de l'agriculture ou l'horticulture [247,248]. Une étude ne rapporte pas d'augmentation du risque de cryptorchidie chez les coiffeuses [204].

Concernant les expositions professionnelles paternelles étudiées à partir de la matrice emploi-exposition mentionnée précédemment, une étude rapporte une augmentation du risque de cryptorchidie en association avec l'exposition aux pesticides et aux solvants [135]. Deux de ces études suggèrent également une augmentation du risque associée à l'exposition à au moins un type de perturbateurs endocriniens [135,202]. La dernière étude observe elle une diminution du risque de cryptorchidies avec l'exposition aux pesticides et aux alkyl phénols et une augmentation du risque avec l'exposition aux métaux lourds [201]. Le travail dans le secteur de l'horticulture, mais pas l'agriculture, semble également associé à une augmentation du risque de cryptorchidie dans une étude [247] sur deux [247,248].

Le Tableau 3 ci-dessous résume les facteurs de risque d'hypospade et de cryptorchidie qui viennent d'être évoqués en fonction de leur niveau de preuve. On remarque que le nombre de facteurs pour lesquels les études ne sont pas concordantes est plus important pour les cryptorchidies, ce qui peut refléter les disparités observées dans le diagnostic et l'enregistrement des cas selon les études.

Tableau 3 : Facteurs de risque d'hypospade et de cryptorchidie

	Hypospade	Cryptorchidie
Facteur de risque avéré	Antécédents familiaux Petit poids de naissance Primiparité Hypertension artérielle/pré-éclampsie maternelle Antécédent familial de prise de Diéthylstilbestrol Prise d'antiépileptique Trouble de la fertilité (délai nécessaire à concevoir)	Antécédents familiaux Durée de gestation Petit poids de naissance
Facteur de risque suggéré	Durée de gestation Grossesse multiple Origine ethnique (caucasienne) Insuffisance placentaire Tabagisme paternel Aide médicale à la procréation Exposition professionnelle aux pesticides, aux phtalates et aux solvants	Grossesse multiple Insuffisance placentaire Diabète maternel Aide médicale à la procréation
Facteur de risque non concordant entre les études	Age maternel Indice de masse corporelle Niveau d'études maternel Tabagisme maternel Alimentation maternelle Diabète maternel Prise d'acide folique Supplémentation en fer	Origine ethnique Age maternel et paternel Indice de masse corporelle maternel Niveau d'études maternel Primiparité Tabagisme maternel et paternel Alimentation maternel Hypertension/pré-éclampsie maternelle Prise d'analgésique Contraception orale Exposition professionnelle aux pesticides et aux solvants
A priori pas facteur de risque	Age paternel Consommation d'alcool maternelle Contraception orale	Consommation d'alcool maternelle et paternelle Prise d'acide folique Supplémentation en fer Délai nécessaire à concevoir

Les deux sections qui vont suivre portent sur les deux familles de polluants chimiques d'intérêt de cette thèse que sont les polluants organiques persistants et les éthers de glycol.

Nous avons fait le choix d'étudier les polluants organiques persistants car ce sont des perturbateurs endocriniens connus chez l'animal, capables d'interagir avec les récepteurs des hormones stéroïdiennes ou d'en altérer la synthèse, le transport ou le métabolisme, mais dont les mécanismes d'action chez l'homme sont encore mal connus bien que des effets sur la santé reproductive ont été rapportés. Comme leur nom l'indique, ce sont des molécules persistantes et dont la pollution est diffuse dans les différents compartiments de l'environnement.

Les éthers de glycol ont été choisis du fait de la toxicité connue pour la reproduction et le développement de certains d'entre eux, leur utilisation massive en tant que solvant dans de nombreux produits à usage industriel ou domestique et, contrairement à la majorité des autres solvants, pour l'existence de biomarqueurs d'exposition qui leurs sont spécifiques. Bien que ces molécules ne sont pas persistantes et se dégradent rapidement, leur présence dans divers produits de consommation utilisés au quotidien ainsi que sur le lieu de travail, font que l'exposition de la population générale se caractérise par des expositions répétées dans le temps.

1.4. LES POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS : DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS RECONNUS

1.4.1. Définition et propriétés

Le terme de « polluants organiques persistants » ou POP, regroupe une variété de composés organiques présents dans l'environnement et partageant des propriétés communes. Ce sont des composés toxiques, stables chimiquement et difficilement dégradables dans l'environnement, contaminant ainsi les sédiments marins et de rivières. Ils ont la propriété d'être liposolubles, se stockant facilement dans les graisses et provoquant un phénomène de bioaccumulation tout au long de la chaîne alimentaire, dont l'homme se trouve au sommet. Ce sont des composés semi-volatils, facilement transportables dans l'air sur de longues distances, mais peu hydrosolubles donc faiblement présents dans l'eau. La contamination existe sur l'ensemble du globe, y compris dans des zones géographiques exemptes de toute utilisation passée. Bien que quelques POP puissent être synthétisés naturellement, la plupart d'entre eux sont d'origine anthropique. Parmi les POP, on peut citer les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides organochlorés, les retardateurs de flamme bromés (PBDE) ou encore les dioxines.

1.4.2. Structure chimique

Les structures chimiques des PCB, de certains pesticides organochlorés et PBDE sont présentées en Figure 10. Les PCB, forment une famille de 209 congénères aromatiques chlorés dérivés du diphenyle et comportant jusqu'à 10 atomes de chlore en substitution des atomes d'hydrogène. Le numéro de congénère est fonction du degré croissant de substitution par les atomes de chlore et de leur position.

Les pesticides organochlorés sont des composés organiques de synthèse qui, comme leur nom l'indique, sont composés d'au moins un atome de chlore. Les pesticides organochlorés sont nombreux et seules les structures chimiques des composés auxquels nous nous intéresserons sont présentées dans la Figure 10.

Les PBDE sont des molécules organobromées composées d'au moins un atome de carbone lié à un atome de brome. Tout comme les PCB, les PBDE forment une famille de 209 congénères dont le numéro est fonction du nombre croissant d'atomes de brome et de leur position.

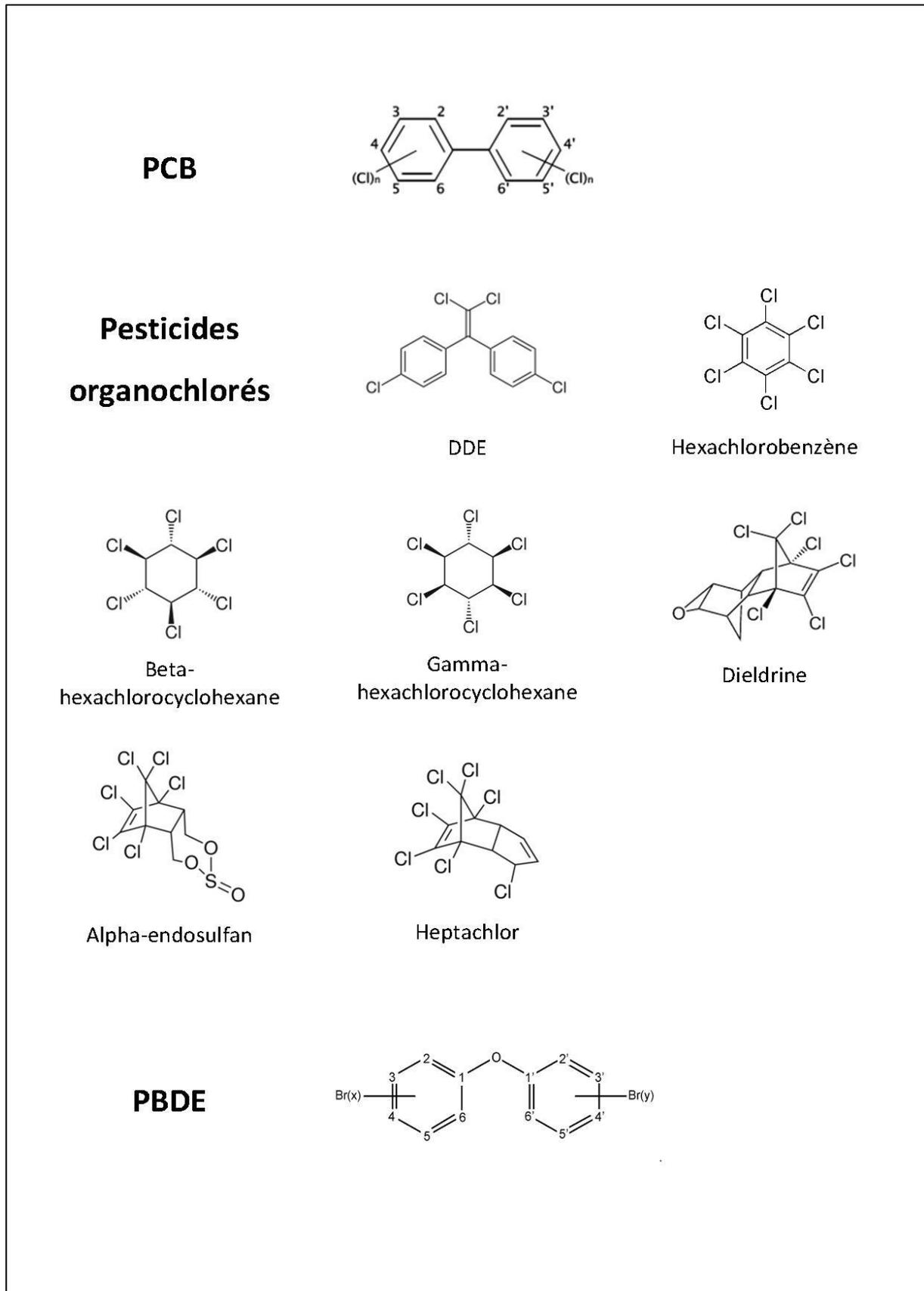


Figure 10 : Structure chimique des PCB, pesticides organochlorés et PBDE

1.4.3. Utilisations passées

Les PCB ont été utilisés massivement au cours des années 70 jusqu'à leur interdiction à la fin des années 80. Ces molécules étaient appréciées pour leur stabilité chimique et leurs propriétés lubrifiantes et isolantes et ainsi largement utilisées comme isolant électrique, par exemple dans les transformateurs ou condensateurs, mais aussi dans les encres, peintures, ou plastifiants [249]. Malgré leur interdiction depuis plusieurs décennies, la contamination environnementale reste aujourd'hui présente du fait de leur grande stabilité dans l'environnement.

Les pesticides organochlorés ont été introduits au cours des années 40 et principalement utilisés comme insecticides et fongicides. De par leur rémanence dans l'environnement, leur bioaccumulation et leur toxicité, ils sont aujourd'hui interdits ou très restreints d'utilisation en France depuis 1987. Cependant, certains pays continuent de les utiliser, n'ayant d'autre moyen de lutte contre certains vecteurs de maladies comme le paludisme. Parmi les pesticides organochlorés auxquels nous nous intéresserons, citons le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT, et plus particulièrement son métabolite, le dichlorodiphényldichloroéthylène, DDE), l'endosulfan (notamment l'isomère α), la dieldrine, l'hexachlorobenzène (HCB), l'heptachlor et l'hexachlorocyclohexane (HCH isomère β et γ).

Les PBDE sont des mélanges chimiques qui sont ajoutés à une grande variété de produits de consommation pour les rendre moins inflammables. Ils sont couramment utilisés dans les plastiques, les textiles, les matériaux de construction, les composants électroniques ou encore les véhicules. Aujourd'hui, la majorité des PBDE sont interdits.

1.4.1. Sources d'exposition de la population générale

L'Homme est exposé aux POP via les différentes voies d'exposition. La contribution relative de chacune des voies d'exposition varie selon le type de composés mais l'ingestion d'aliments contaminés reste la voie prépondérante. De par leur affinité particulière pour les graisses (lipophiles), les POP se concentrent particulièrement dans les tissus graisseux des animaux. Ainsi, les aliments d'origine animale, riches en graisses tels que les poissons gras, le foie, les œufs, le lait ou encore le beurre sont des contributeurs majeurs de l'exposition de la population générale aux PCB [249]. Une autre source d'exposition provient des sites de stockage ou de traitement des déchets ou de la mauvaise manipulation de matériaux contenant des PCB notamment dans le cadre professionnel (contact cutané ou inhalation). Dans le passé, l'exposition professionnelle aux pesticides organochlorés était également une source importante d'exposition pour certains travailleurs particulièrement dans le domaine de l'agriculture. Les POP sont également retrouvés dans les

poussières, comme le montrent les campagnes de monitoring en population générale, et sont donc une source d'exposition potentielle, notamment pour les plus petits (comportement main-bouche) [250].

1.4.2. Toxicocinétique

Aujourd'hui, les PCB, pesticides organochlorés et PBDE sont principalement absorbés par voie orale. Le caractère lipophile de ces molécules fait qu'elles passent facilement dans le système lymphatique puis sanguin et se stockent dans le tissu adipeux. Le coefficient de répartition entre le tissu adipeux et le sang varie selon le degré de lipophilie du composé. Le métabolisme des POP est limité puisque leur distribution dans le tissu adipeux réduit la fraction des POP pouvant accéder aux organes où le métabolisme se produit et les taux de métabolisation sont très lents pour la majorité des POP. De ce fait, les temps de demi-vie de ces molécules dans l'organisme sont très élevés, certaines pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années. La biotransformation des POP est principalement hépatique, catalysée par les monooxygénases dépendantes du CYP450 et conduisant notamment à la formation de métabolites hydroxylés. Les enzymes impliquées et la rapidité de la métabolisation sont variables selon les congénères. Les POP sont principalement éliminés par voies urinaire et fécale mais sont aussi largement excrétés via le lait maternel et traversent la barrière foëto-placentaire.

1.4.3. Facteurs de variation des niveaux de POP

Comme mentionné précédemment, la source principale d'exposition aux POP est actuellement l'alimentation et cela a été confirmé par plusieurs études qui ont rapporté des associations positives entre la fréquence de consommation d'aliments particulièrement contaminés en POP, comme les poissons, les fruits de mer, les œufs ou les produits laitiers et les niveaux sanguins de POP. D'autres études se sont intéressées à l'impact de facteurs sociodémographiques et liés au mode de vie et ont constaté que le pays d'origine, l'âge, le sexe, la parité, l'indice de masse corporelle, l'allaitement et le niveau d'études étaient associés à des variations des niveaux de POP [251–253]. Concernant le pays d'origine, ces variations peuvent s'expliquer par des régimes alimentaires différents, des disparités de réglementation (actuelle ou passée) dans la restriction des POP ou encore par une susceptibilité génétique de certaines populations. Des variations sont également observées au niveau régional. L'âge est un facteur fortement lié à la concentration sérique de POP du fait de leur propriété de bioaccumulation au cours du temps. Le sexe et la parité sont également liés aux concentrations de POP : on observe des niveaux plus faibles chez les femmes que chez les hommes, et plus faibles pour les femmes ayant déjà eu un enfant en comparaison des femmes nullipares. Notons que l'allaitement est considéré comme une des voies principales d'élimination des polluants liposolubles. C'est aussi

cette propriété qui pourrait en partie expliquer la relation inverse entre l'IMC et la concentration de POPs retrouvée dans le sang [253]. Enfin, certaines de ces études ont mis en évidence que les concentrations de POPs augmentaient avec le niveau d'études.

1.4.4. Réglementation passée et actuelle

Compte tenu de la toxicité et la rémanence dans l'environnement de ces composés, la limitation des rejets de POP a fait l'objet de plusieurs accords internationaux, dont les deux textes majeurs sont le Protocole d'Aarhus et la Convention de Stockholm. Le Protocole d'Aarhus a été signé en juin 1998, dans le cadre de la convention de Genève sur la pollution atmosphérique transfrontière, et est entré en vigueur en octobre 2003 puis revu en décembre 2009. La Convention de Stockholm sur les POP a été signée le 22 mai 2001, est entrée en vigueur le 17 mai 2004 et a été suivie de plusieurs amendements afin de mettre à jour la liste des substances préoccupantes. Tous deux visent à contrôler, réduire ou éliminer les émissions de POP, le protocole d'Aarhus se limitant aux rejets atmosphériques mais incluant les hydrocarbures aromatiques polycycliques, contrairement à la Convention de Stockholm. Aujourd'hui, la liste des substances couvertes par la Convention de Stockholm comprend 26 composés (ou famille de composés) tels que les PCB, les pesticides organochlorés, certains retardateurs de flamme, ou encore des composés perfluorés ou les dioxines et furanes.

L'Union européenne a intégré la Convention de Stockholm et le Protocole d'Aarhus au sein du règlement européen (CE) 850/2004 du 29 avril 2004 [254]. La réglementation européenne fixe également des teneurs maximales pour les dioxines, PCB et résidus de pesticides présents dans les denrées alimentaires [255,256].

Des valeurs limites d'exposition professionnelle existent également [257]. En France, un plan national de décontamination et d'élimination des appareils contenant des PCB a été mis en place et des interdictions de pêche ou de consommation de produits de la mer peuvent être ordonnées en cas de contamination de sites [258,259]. Ces réglementations ainsi que la dégradation naturelle des PCB au cours du temps ont permis d'observer une diminution de l'exposition de la population générale.

1.4.5. Toxicité des PCB, pesticides organochlorés et PBDE sur les fonctions reproductives

1.4.5.1. Etudes *in vivo* et *in vitro*

➤ PCB

D'un point de vue toxicologique, 12 congénères des PCB se comportent comme les PCDD/F (dioxines), en se liant au récepteur cellulaire Ah (Aryl hydrocarbon). Ils sont désignés PCB « dioxin-like » (PCB-DL) par opposition aux autres PCB dits « non dioxin-like » (PCB-NDL). Le récepteur à la dioxine AhR possède des voies de signalisation et d'activation qui se croisent avec celles des récepteurs ER α et AR. Une faible activité œstrogénique et anti-œstrogénique des PCB-NDL a été observée à partir d'études *in vitro*. Les PCB les moins chlorés (PCB44, 49, 52) possèdent une activité œstrogénique tandis que les composés les plus chlorés (ex : PCB118, 138, 170) seraient des antagonistes du récepteur aux œstrogènes [260]. Une étude récente suggère que plusieurs des PCB-NDL inhiberaient l'activité de l'*œstrogen-sulfotransférase* [261]. Les PCB possèderaient également une activité anti-androgénique et inhiberaient l'activité de la 5 α -réductase [261–264]. Chez l'animal, l'exposition aux PCB a été associée à une augmentation du poids des organes génitaux et de la distance anogénitale dans certaines études, et à une diminution dans d'autres [265]. Un délai de l'apparition de la puberté est également observé [265]. Une diminution de l'activité de l'aromatase et une augmentation du poids de l'utérus (signe d'une activité œstrogénique) chez les rats femelles et une diminution des concentrations de testostérone chez les rats mâles (activité anti-androgénique) ont également été rapportées [264,266,267]. Chez la souris mâle C57, l'exposition à un mélange de PCB n'a pas entraîné de modification des niveaux de testostérone mais une diminution des niveaux d'estradiol a été observée [268].

De plus, les PCB sont aussi connus pour être des inducteurs des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et pour interférer avec les hormones thyroïdiennes [265]. Enfin, plusieurs auteurs s'accordent également sur une perturbation de la différenciation sexuelle du cerveau mâle ou femelle lors d'expositions pré- ou périnatales [264,269].

➤ Pesticides organochlorés

Parmi les pesticides organochlorés, le DDT (et ses métabolites) est celui qui a été plus étudié. Une activité anti-androgénique mais également une activité œstrogénique sont attribuées à certains pesticides organochlorés. Le p,p'-DDE mais aussi la dieldrine et l'endosulfan possèdent une affinité pour le récepteur AR et le p,p'-DDE inhiberait l'activité de la 5 α -réductase [270]. Le p,p'-DDE montre également une affinité pour les récepteurs ER α et ER β tandis que la dieldrine et l'endosulfan

montrent une affinité pour le récepteur ER α mais une activité anti-œstrogénique pour le récepteur ER β . Le lindane ne montre a priori pas d'affinité pour les récepteurs AR et ER. Une étude a montré pour le p,p'-DDE une stimulation de la sécrétion d'œstrogène associée à une diminution de la sécrétion de testostérone dans des cellules porcines de la thèque et de la granulosa [271]. Une diminution des taux de testostérone a également été observée avec plusieurs pesticides, en particulier le lindane (exposition prénatale chez le rat, mesure de la testostérone à la puberté et à l'âge adulte) (Dalsenter et al. 1997) et l'heptachlor (rats matures) [272]. Cette diminution de la testostérone n'a pas toujours été retrouvée pour l'endosulfan [273,274]. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'endosulfan augmentait le catabolisme et la clairance de la testostérone mais que l'équilibre homéostatique permettait de réduire les effets attendus sur les niveaux de testostérone (Wilson and LeBlanc 1998). L'endosulfan et le lindane ont été associés à une inhibition de l'activité de l'aromatase [275,276]. De plus, une étude chez des rats mâles adultes exposés au lindane rapporte une diminution des taux de StAR (protéine de la stéroïdogénèse) et de la 17 β -HSD ainsi qu'une diminution de l'ABP, ce qui pourrait expliquer la diminution des niveaux de testostérone observée [277]. Tout comme pour les études sur les PCB, ces observations faites sur des cellules sont difficilement extrapolables aux effets attendus lors d'une exposition prénatale. L'activité antiandrogénique du DDE chez l'animal mâle se traduit par une diminution du poids des organes génitaux et de la distance anogénitale, des anomalies de l'appareil reproducteur (hypospades, micropénis) et un délai de l'apparition de la puberté [278,279]. Chez la femelle, des anomalies morphologiques de l'ovaire et une puberté précoce ont été rapportées [280,281].

➤ PBDE

Les polybromodiphényléthers pourraient avoir une faible activité œstrogénique ou anti-œstrogénique. Des propriétés œstrogéniques ont été observées pour les composés faiblement bromés (PBDE28, 30, 32, 47, 51, 71, 75, 85, 99, 100 et 119) tandis que des propriétés anti-œstrogéniques ont été observées pour des congénères plus fortement bromés (PBDE153, 166 et 190) [282]. Ces constats ont également été rapportés par d'autres : activité œstrogénique faible pour les PBDE 19, 38, 47, 49, 100 et 155, activité anti-œstrogénique faible pour PBDE 181, 183, 185 et 190 (pas pour le 209) [283]. Des études ont également montré que les PBDE 47, 99, 100 et 154 inhibaient la liaison d'un androgène synthétique au récepteur AR dans la prostate ventrale [284]. Les PBDE 47 et 100 inhiberaient également l'activité transcriptionnelle du gène de la luciférase induit par la DHT [284]. Chez les rongeurs, des effets tels qu'une modification de la distance anogénitale chez le mâle, un retard pubertaire dans les deux sexes, une altération de la qualité spermatique, et une diminution du nombre de follicules ovariens ont été rapportés après exposition (prénatale, pubertaire ou adulte) aux PBDE 99 et 209 [6,284,285]. Des modifications des niveaux d'hormones ont également été

observées : une exposition de rats adultes mâles au PBDE 99 a entraîné une diminution du poids des testicules associée à une diminution des niveaux d'œstradiol et de testostérone sanguins [286]. L'exposition prénatale au PBDE 99 a aussi entraîné une diminution des concentrations de ces mêmes hormones chez la progéniture à l'âge adulte [285].

1.4.5.1. Etudes épidémiologiques

a. Expositions prénatales et anomalies à la naissance

➤ Anomalies de l'appareil génital du garçon

Les études épidémiologiques ayant évalué les effets de l'exposition prénatale aux PCB [122,287–290] et au DDT et ses métabolites [122,202,288,291–293] sur le risque de malformations génitales (cryptorchidie et hypospade) ne rapportent majoritairement pas d'association significative malgré des risques légèrement augmentés (Tableau 4). Certaines études portant sur d'autres pesticides organochlorés ont rapporté des augmentations significatives du risque de malformation génitale en association avec les niveaux d'hexachlorobenzène (HCB) [122,294], de lindane (γ -HCH) et mirex [202] et de β -HCH [295]. Cependant, ces résultats n'ont pas été répliqués dans l'ensemble des études [288,293,295]. Une méta-analyse publiée en 2009 rapporte une augmentation du risque d'hypospade chez les enfants nés de parents exposés professionnellement aux pesticides (OR=1.4 [1.0 ; 1.8] pour l'exposition maternelle et OR=1.2 [1.0 ; 1.4] pour l'exposition paternelle) [199]. Cependant, la méthode d'évaluation de l'exposition ne permet pas de distinguer le type de pesticides utilisés. Parmi les deux études ayant étudié l'impact de l'exposition aux PBDE, une étude [241] rapporte une augmentation du risque de cryptorchidie à 3 mois en association avec la somme des PBDE mesurés dans le lait (mais pas dans le placenta) et l'autre [288] n'observe pas d'association avec le risque d'hypospade.

➤ Variations des concentrations d'hormones

Une seule étude a étudié les niveaux de testostérone et d'œstradiol dans le sang de cordon ombilical en association avec l'exposition prénatale aux PCB [296]. Cette étude rapporte une diminution des niveaux de testostérone chez les filles et une diminution des niveaux d'œstradiol chez les garçons. Une étude a mesuré la distance anogénitale chez les garçons à la naissance et ne rapporte pas d'association avec les niveaux de DDE mesurés dans le sang maternel après l'accouchement [297]. Concernant les PBDE, une étude a mesuré les taux sériques de testostérone, LH, FSH, SHBG et Inhibin B chez des garçons de 3 mois et n'observe pas d'association avec les concentrations de PBDE mesurés dans le placenta mais rapporte une corrélation positive entre la somme des PBDE mesurés dans le lait et les niveaux de LH [241].

b. Expositions prénatales et effets à la puberté ou à l'âge adulte

➤ Variations des concentrations d'hormones

Cinq études [298–302] ont mesuré les niveaux d'hormones au cours de la puberté (8-17 ans) et deux [303,304] chez les jeunes adultes (19-21 ans) en association avec les niveaux de PCB (parfois associés aux dioxines), DDE, ou HCB mesurés dans le placenta, le sang de cordon ombilical ou le sang maternel pendant la grossesse. Plusieurs d'entre elles rapportent des associations significatives mais les résultats des différentes études sont hétérogènes (Tableau 4). On peut tout de même mentionner que trois études rapportent une diminution des niveaux de LH avec l'exposition prénatale aux PCB [302–304] et que deux d'entre elles suggèrent une diminution des niveaux de testostérone [302,304]. Une diminution du FAI avec l'exposition à l'HCB [303] et des variations des niveaux d'E2 avec l'exposition aux PCB sont également rapportées [298,299,304]. L'exposition au DDE n'a pas été associée à des modifications des niveaux d'hormones aux tranches d'âge considérées [300,302–304].

➤ Développement pubertaire

Neuf études ont porté sur l'apparition de la puberté, dont six chez les filles et trois chez les garçons, en étudiant notamment les stades de développement avec le score de Tanner et l'âge des premières règles chez les filles. Chez les filles, un avancement de l'âge des premières règles a été suggéré en association avec l'exposition prénatale aux PCB et au DDE [300,305] mais n'est pas confirmé dans deux autres études [303,306,307]. Une étude rapporte également une diminution de la taille de l'utérus chez les filles de 8 ans exposées aux PCB pendant la période prénatale [298]. Chez les garçons, une étude suggère un retard de la puberté (diminution du score de Tanner) avec l'exposition prénatale aux PCB et au DDE [302], tandis que les deux autres études ne rapportent pas d'association avec l'exposition aux PCB [299,300].

➤ Fertilité féminine

Deux études chez la jeune adulte (16-20 ans) se sont intéressées à la durée des cycles menstruels et l'une d'entre elle rapporte une proportion plus élevée de cycles courts chez les filles exposées *in utero* lors de la catastrophe de Yucheng (intoxication alimentaire avec l'huile de riz contaminé aux PCB et dioxines) [306]. La seconde étude rapporte une diminution du nombre de follicules en association avec l'exposition au DDE et à l'HCB mais pas aux PCB [303]. Trois études ont étudié le délai nécessaire à concevoir (DNC) des femmes en association avec l'exposition *in utero* aux PCB ou au DDE (sang maternel prélevé dans les jours suivants l'accouchement ou modélisation à partir d'une mesure pré-conception) [308–310]. Une augmentation du DNC est suggérée avec l'exposition aux PCB bien qu'une de ces études observe aussi une diminution du DNC avec la somme des PCB 99, 156

et 187 [309,310]. L'exposition au DDE semble également associée à une diminution du DNC [308,310] tandis que le DDT est associé à une augmentation du DNC [308].

c. Effets observés aux autres périodes d'exposition

De nombreuses autres études ont été publiées à ce jour concernant les effets des POP sur les fonctions de reproduction. Nous ne les détaillerons pas ici puisqu'elles concernent des mesures d'exposition réalisées en dehors la fenêtre de susceptibilité qui nous intéresse (i.e., la période prénatale). Brièvement, des troubles de la fertilité féminine (altération des cycles menstruels, allongement du DNC) et masculine (diminution de la mobilité des spermatozoïdes, altération de l'ADN) ont été rapportées [40,311–314]. Chez les femmes, une augmentation du risque d'endométriose est également suggérée avec l'exposition aux PCB [40]. Les études portant sur la puberté et les modifications des niveaux d'hormones sexuelles (à la puberté ou à l'âge adulte) sont limitées et non concordantes mais une diminution de la testostérone et une augmentation de la SHBG ont été rapportées à plusieurs reprises en association avec l'exposition aux PCB [315–320]. L'exposition aux PCB, et dans une moindre mesure au DDE, a également été associée à une augmentation du risque de cancers du sein [321–324] et de la prostate [325–327]. Concernant le cancer des testicules, l'exposition au DDE a été associée à une augmentation du risque tandis que l'exposition aux PCB a été associée à une diminution du risque [328,329].

Tableau 4. Exposition prénatale aux PCB, pesticides organochlorés ou PBDE et effets sur les fonctions de reproduction

Auteur et année	Type d'étude ; Années et pays d'inclusion	Sexe	Age	Expositions	Paramètres de santé	Effectif	Résultats
Cao 2008 [296]	Cohorte mère-enfant ; 2000-2002, Allemagne	Fille et garçon	Naissance	PCB : sang maternel et lait	Niveaux d'hormones dans le sang de cordon (T et E2)	N=104	Diminution T chez les filles. Diminution d'E2 chez les garçons.
Longnecker 2007 [297]	Transversale ; 2002-2003, Mexique	Garçon	Naissance	DDE : sang maternel, 1-2 jours après accouchement	Distance anogénitale	N=781	Pas d'association
Carmichael 2010 [288]	Cas-témoin nichée dans un programme de surveillance; 2003, US	Garçon	Naissance	PCB, DDE, HCB et PBDE : sang maternel 15-18 SA	Hyospade	N=20 cas N=28 témoins	Pas d'association
Rignell-Hydbom 2012 [294]	Cas-témoin nichée dans une cohorte ; 1986-2002, Suède	Garçon	Naissance	PCB, DDE, HCB : sang maternel 12-14 SA	Hyospade	N=237 cas N=237 témoins	Augmentation du risque pour la catégorie d'exposition à l'HCB la plus élevée. Augmentation suggérée avec le DDE.
Fernandez 2007 [202]	Cas-témoin nichée dans une cohorte ; 2000-2002, Espagne	Garçon	1 mois	DDE/DDT, HCB, γ -HCH, endosulfan, dieldrine et mirex : placenta	Cryptorchidie et hyospade combinées	N=48 cas N=114 témoins	Augmentation du risque de malformations génitales avec γ -HCH et mirex, fortement suggérée avec DDT, endosulfan et dieldrine.
Main 2007 [241]	Cas-témoin nichée dans deux cohortes cohorte; 1997-2001, Danemark et Finlande	Garçon	3 mois	PBDE ; placenta et lait	Cryptorchidie	N=62 cas N=69 témoins	Augmentation du risque avec la plupart des PBDE mesurés dans le lait mais seulement au Danemark. Pas d'association avec les PBDE dans le placenta
Brucker-Davis 2008 [330]	Cas-témoin ; 2002-2005, France	Garçon	3 mois	DDE, PCB : sang de cordon et lait	Cryptorchidie	N=78 cas N=86 témoins	Score d'exposition aux PCB le plus élevé associé à augmentation du risque de cryptorchidie à la naissance mais pas à 3 mois.
Virtanen 2012 [331]	Cas-témoin nichée dans 2 cohortes mère-enfant ; 1997-2001, Danemark et Finlande	Garçon	3 mois	PCB : placenta	Cryptorchidie et niveaux d'hormones (T, SHBG, LH, FSH, Inhibine-B)	N=95 cas N=185 témoins	Pas d'association entre PCB et cryptorchidie. PCB WHO-TEq associé à une diminution des niveaux de LH. Pas d'association avec les autres hormones.
McGlynn 2009 [290]	Cas-témoin nichée dans une cohorte ; 1959-1965, US	Garçon	<1 an	PCB : sang maternel 3 ^e trimestre de grossesse	Hyospade et cryptorchidie	N=230 cryptorchidie N=201 hyospades N=593 témoins	Augmentation du risque d'hyospade pour la catégorie d'exposition la plus élevée. Tendances ns pour la cryptorchidie. Pas d'association avec les congénères testés individuellement
Longnecker 2002 [292]	Cas-témoin nichée dans une cohorte ; 1959-1966, US	Garçon	<1 an	DDE : sang maternel, 3 ^e trimestre de grossesse	Hyospade et cryptorchidie	N=219 cryptorchidie N=199 hyospades N=552 témoins	Pas d'association
Pierik 2007 [295]	Cas-témoin nichée dans une cohorte ; 1959-1965, US	Garçon	<1 an	HCE, HCB, β -HCH : sang maternel 3 ^e trimestre de grossesse	Cryptorchidie	N=219 cas N=564 témoins	Augmentation du risque avec β -HCH.

Auteur et année	Type d'étude ; Années et pays d'inclusion	Sexe	Age	Expositions	Paramètres de santé	Effectif	Résultats
Damgaard 2006 [293]	Cas-témoin nichée dans deux cohortes cohorte; 1997-2001, Danemark et Finlande	Garçon	<1 an	DDE/DDT, HCB, α - β - γ -HCH, endosulfan, mirex, chlordane... : lait	Cryptorchidie	N=62 cas N=68 témoins	Augmentation du risque avec <i>cis</i> - et <i>trans</i> -chlordane, suggérée avec α -endosulfan et dieldrine
Giordano 2010 [122]	Cas-témoin hospitalier ; 2005-2007, Italie	Garçon	<2 ans	DDE, PCB, HCB : sang maternel 1 an après la grossesse	Hypospade	N=80 cas N=80 témoins	Augmentation du risque avec l'exposition à l'HCB, suggérée avec PCB180
Bhatia 2005 [291]	Cas-témoin nichée dans une cohorte ; 1959-1967, US	Garçon	<2 ans	DDT/DDE : sang maternel fin de grossesse ou après accouchement	Cryptorchidie et hypospade	N=75 cryptorchidies N=66 hypospades N=283 témoins	Augmentation du risque d'hypospade avec une classe intermédiaire d'exposition au DDT
Su 2012 [298]	Cohorte mère-enfant ; 2000-2001, Taïwan	Fille et garçon	8 ans	PCB (+dioxines) : placenta	Taille de l'utérus, niveaux d'hormones (E2, LH, FSH)	N=56	Σ PCB indicateurs (138, 153, 180) : diminution de la taille de l'utérus Σ PCB + dioxines : diminution des niveaux d'E2
Namulanda 2016 [307]	Cas-témoin nichée dans une cohorte ; 1991-1992, UK	Fille	8-13 ans	DDE, HCB, β -HCH : sang maternel pendant la grossesse	Age des premières règles	N=218 cas N=230 témoins	Pas d'association
Hsu 2005 [299]	Cohorte de Yucheng ; 1979-1985, Taïwan	Garçon	10-15 ans	PCB/PCDF : Yucheng vs non Yucheng	Score de Tanner, volume testiculaire, niveaux d'hormones (T, E2, LH, FSH, T/E2)	N=121	E2 plus élevée et T/E2 plus faibles chez les garçons Yucheng de plus de 13 ans (ns <13 ans)
Gladen 2000 [332]	Cohorte mère-enfant ; 1978-1982, US	Fille et garçon	10-15 ans	DDE et PCB : moyenne des mesures dans le sang maternel, le sang de cordon, le placenta et le lait.	Score de Tanner	N=594 (316 filles et 278 garçons)	Pas d'association significative. Quelques suggestions de l'avancement de l'âge des premières règles et stade 5 du développement mammaire pour les catégories d'exposition aux DDE et PCB les plus élevées.
Gladen 2004 [300]	Cohorte mère-enfant ; 1959-1966, US	Garçon	12-17 ans	DDE : sang maternel	Niveaux d'hormones (T, DHEAS)	N=304	Pas d'association
Mol 2002 [301]	Cohorte mère-enfant ; 1986-1987, Iles Féroé	Garçon	14 ans	PCB : sang de cordon	Score de tanner, volume testiculaire, niveaux d'hormones (T, Inhibine-B, SHBG, LH, FSH)	N=156	Pas d'association entre PCB et score de Tanner, volume testiculaire et niveaux d'hormones
Grandjean 2012 [302]	Cohorte mère-enfant ; 1986-1987, Iles Féroé	Garçon	14 ans	PCB (138, 153, 180) et DDE : sang de cordon	Score de Tanner, volume testiculaire, niveaux d'hormones (T, SHBG, T/SHBG, LH, FSH, Inhibine-B)	N=433	Σ PCB et DDE associés à une diminution du score de Tanner + légère diminution du volume testiculaire mais ns ($p=0.14$ et $p=0.07$). Σ PCB associée à une diminution des niveaux de LH et du ratio T/SHBG et une augmentation des niveaux de SHBG (diminution T suggérée, $p=0.07$).

Auteur et année	Type d'étude ; Années et pays d'inclusion	Sexe	Age	Expositions	Paramètres de santé	Effectif	Résultats
Vasiliu 2004 [305]	Cohorte de consommateurs de poissons ; 1973-1991, US	Fille	Adolescence	DDE et PCB : modélisation à partir de sang maternel prélevé à l'inclusion	Age des premières règles	N=151	DDE associé à l'âge des premières règles plus précoce. Pas d'association avec les PCB.
Yang 2005 [306]	Cohorte de Yucheng ; 1979-1985, Taiwan	Fille	16-17 ans	PCB/PCDF : Yucheng vs non Yucheng	Age des premières règles, durées des cycles menstruels	N=38	Proportion de cycles courts (<25 jours) plus élevée et durée des règles plus courtes chez les filles Yucheng
Kristensen 2016 [303]	Cohorte mère-enfant ; 1988-1989, Danemark	Fille	20 ans	DDE, PCB, HCB : sang maternel prélevé à 30 semaines de grossesse	Age des premières règles, durées des cycles menstruels, nombre de follicules, hormones (T, E2, LH, FSH, SHBG, AMH, FAI)	N=341	DDE associé à une diminution du nombre de follicules (diminution de T suggérée) HCB associé à une diminution du nombre de follicules et du FAI (diminution de T suggérée). Catégorie moyenne d'exposition aux PCB associée à une diminution de la LH
Vested 2014 [304]	Cohorte mère-enfant ; 1988-1989, Danemark	Garçon	19-21 ans	DDE et PCB : sang maternel prélevé à 30 semaines de grossesse	Qualité du sperme et niveaux d'hormones (T, E2, LH, FSH)	N=173	Σ PCB : diminution des niveaux de T, FT, E2, LH pour la catégorie moyenne d'exposition seulement. Pas d'association avec la qualité spermatique. DDE : diminution de la proportion de spermatozoïdes mobiles. Pas d'association avec les autres paramètres de la qualité spermatique ni avec les niveaux d'hormones.
Cohn 2003 [308]	Cohorte mère-enfant ; 1960-1963, US	Fille	Adulte	DDE, DDT : sang maternel, 1-3 jours après accouchement	Délai nécessaire à concevoir (DNC)	N=289	DDT associé à une augmentation du DNC. DDE à une diminution du DNC.
Cohn 2011 [309]	Cohorte mère-enfant ; 1960-1963, US	Fille	Adulte	PCB : sang maternel, 1-3 jours après accouchement	Délai nécessaire à concevoir (DNC)	N=289	PCB 99, 156 et 187 associés à une augmentation du DNC. PCB 105, 138 et 183 associés à une diminution du DNC. Σ PCB 99, 156, 187/ Σ 105, 138, 183 associés à une augmentation du DNC
Han 2016 [310]	Cohorte de consommateurs de poissons ; 1973-1991, US	Fille	Adulte	DDE et PCB : sang maternel prélevé à l'inclusion, niveau extrapolé à la grossesse	Délai nécessaire à concevoir (DNC)	N=151	PCB associé à une augmentation du DNC. DDE non significatif mais tendance à la diminution du DNC.

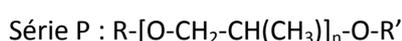
1.5. LES ETHERS DE GLYCOL : DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS POTENTIELS ?

1.5.1. Définition, propriétés

Les éthers de glycol (EG) constituent une famille de solvants oxygénés largement utilisés depuis les années 60. En 2004, la consommation de solvants oxygénés en France représentait plus de 280 000 tonnes, soit plus de la moitié des solvants utilisés, et dont 8% étaient des éthers de glycol [333]. Ce sont des composés liquides, incolores, légèrement visqueux, à l'odeur éthérée et faiblement volatiles. Ils ont la propriété d'être amphiphiles, c'est-à-dire à la fois solubles dans l'eau (hydrophiles) et dans les graisses (lipophiles) et sont de ce fait particulièrement appréciés dans les produits dits « à l'eau ». Les éthers de glycol sont présents dans de nombreux produits à usage professionnel ou domestique incluant les peintures et vernis, les cosmétiques, les produits d'entretien mais aussi certains médicaments ou biocides.

1.5.2. Structure chimique

Les éthers de glycol regroupent plus de 80 composés dont une trentaine sont ou ont été utilisés dans l'industrie. On distingue deux familles d'éthers de glycol : les éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol (série E) et les éthers de glycol dérivés du propylène glycol (série P).



Ils comportent une fonction éthylène ou propylène mais peuvent aussi en posséder davantage (ex : di- ou tri-éthylène glycol). Les éthers de glycol sont obtenus par réaction de l'oxyde d'éthylène ou de l'oxyde de propylène avec un alcool.

1.5.3. Source d'exposition et consommation en France

A la fin des années 1990, la consommation d'éthers de glycol en France était estimée à environ 30 000 tonnes dont 60% concernaient les dérivés de la série éthylénique. En 2006, le volume en tonnage est resté stable mais la répartition entre la série éthylénique et la série propylénique s'est inversée en raison de la classification de certains d'entre eux comme reprotoxiques [334]. L'utilisation des éthers de glycol classés reprotoxiques a ainsi largement diminué et atteint aujourd'hui des volumes marginaux (<1% du marché français des éthers de glycol). En effet, ils sont toujours utilisés pour quelques applications industrielles pour lesquelles aucun substitut n'a été trouvé.

Les éthers de glycol sont présents dans divers produits commerciaux et particulièrement dans les préparations dites « à l'eau ». On les retrouve ainsi dans les peintures, encres et vernis, les produits d'entretien, les cosmétiques, les produits biocides et phytopharmaceutiques ou encore les médicaments (Tableau 5) [334]. La population générale peut ainsi être exposée aux éthers de glycol via l'utilisation de ces produits et les voies d'exposition sont donc multiples (par exemple, principalement respiratoire pour les peintures, cutanée pour les cosmétiques et oral pour les médicaments). Plusieurs secteurs d'activité professionnelle sont également concernés par l'utilisation d'éthers de glycol, notamment les industries qui fabriquent les produits mentionnés ci-dessus mais également des secteurs utilisant les produits finis comme les cosmétiques ou les peintures (Tableau 5). L'exposition professionnelle est donc une source d'exposition importante.

Tableau 5 : Sources d'exposition aux éthers de glycol (Afsset 2008)

Produits susceptibles de contenir des éthers de glycol	
Les peintures (tous types : peintures d'avion, d'automobile, peinture en bâtiment...)	Les produits d'entretien ménagers et industriels (détergents, désinfectants, dégraissants...)
Les encres, teintures, et produits connexes (pour l'imprimerie, pour les meubles...)	Les produits à usage métallurgique et mécanique (fluides de coupes, décapants, agents de protection...)
Les vernis (pour meubles, métaux, automobiles...)	Les colles, polymères et produits connexes (produits agglomérant, durcisseurs...)
Les produits biocides et phytopharmaceutiques (produits de protection, antisalissure, fongicides...)	Les produits cosmétiques et apparentés (teintures capillaires, produits corporels rincés ou non rincés...)
Les médicaments (humains et vétérinaires)	
Secteurs d'activité utilisant des éthers de glycol	
La fabrication de peintures, vernis ou encres	La fabrication d'équipements de radio, télé, communication, d'appareils électriques
La réparation automobile	L'industrie des métaux
Les entreprises de nettoyage	L'industrie du papier et du carton
L'édition, l'imprimerie, la reproduction	La fabrication de meubles
L'industrie chimique, pharmaceutique et cosmétique	La fabrication de produits céramiques
L'industrie des matières plastiques et du caoutchouc	La construction, bâtiments et travaux publics
L'industrie automobile, aéronautique, ferroviaire, navale	La pisciculture
La fabrication d'instruments médicaux, de précision, d'optique et d'horlogerie	Les activités de service (salon de coiffure)

L'enquête SUMER (*Surveillance médicale des expositions aux risques professionnels*) réalisée en 2010 en France rapporte que 323 300 salariés étaient exposés aux éthers de glycol non reprotoxiques de la série E, 253 000 à ceux de la série P et 25 800 à des éthers de glycol reprotoxiques [335]. Les professionnels les plus exposés sont par ordre décroissant : les mécaniciens automobiles, les ouvriers d'imprimerie, presse et édition, les nettoyeurs, les ouvriers de production du travail des métaux et les ouvriers du second œuvre du bâtiment [336]. Chez les femmes enceintes, des corrélations entre la détection de certains métabolites urinaires d'éthers de glycol et l'emploi de la femme au cours de sa grossesse ont été observées [337]. Ces associations concernaient notamment les métiers d'infirmière et d'aide-soignante, d'agent d'entretien et de coiffeuse et esthéticienne [337].

1.5.4. Réglementation

Aujourd'hui, 7 éthers de glycol et leur acétate sont classés comme reprotoxiques de catégorie 1A ou 1B et un en catégorie 2, selon les critères de la réglementation sur la classification, l'étiquetage et l'emballage (CLP). Par conséquent, ces substances sont très restreintes dans leurs usages (interdiction dans les produits de consommation) et inscrite à l'Annexe XVII de la réglementation REACH. Cependant, des dérogations existent en milieu professionnel lorsqu'aucun moyen de substitution n'existe. Des mesures complémentaires de restriction sont également appliquées, particulièrement en France (Tableau 6) et concernent des restrictions d'usages dans les cosmétiques pour l'EGBE, l'EGPhE, le DEGBE et le DEGEE, dans les médicaments pour l'EGME et l'EGEE et les produits à usage vétérinaire pour l'EGDME, l'EGPhE, le DEGDME et le TEGDME. Pour les autres éthers de glycol, il n'y a *a priori* pas de restriction particulière dans les produits de consommation à destination du grand public.

Tableau 6 : Réglementation actuelle des éthers de glycol en France et en Europe

	Classification CLP	Année de classification	Restriction de mise sur le marché ^a	Autres restrictions complémentaires
EGME/A	Repro Cat. 1B	1993	Oui	Interdiction médicaments (France)
EGEE/A	Repro Cat. 1B	1993	Oui	Interdiction médicaments (France)
EGDME	Repro Cat. 1B	2004	Oui	Interdiction mélanges vétérinaires (France)
EGDEE	Repro Cat. 1A	2007	Oui	-
EGBE	Non classé	-	-	Restriction cosmétiques (France)
EGPhE	Non classé	-	-	Interdiction biocides vétérinaires (UE) Restriction cosmétiques (UE)
DEGME	Repro Cat. 2	1998	Oui ^b	-
DEGDME	Repro Cat. 1B	2001	Oui	Interdiction mélanges vétérinaires (France)
DEGEE	Non classé	-	-	Restriction cosmétiques (France)
DEGBE	Non classé	-	Oui ^b	Restriction cosmétiques (France)
TEGDME	Repro Cat. 1B	2004	Oui	Interdiction mélanges vétérinaires (France)
1PG2ME/A	Repro Cat. 1B	1998	Oui	-

EGME/A, éthylène glycol méthyl éther et son acétate ; EGEE/A, éthylène glycol éthyl éther et son acétate ; EGDME, éthylène glycol diméthyl éther ; EGDEE, éthylène glycol diéthyl éther ; EGBE, éthylène glycol n-butyl éther ; EGPhE, éthylène glycol phényl éther ; DEGME, diéthylène glycol méthyl éther ; DEGDME, diéthylène glycol diméthyl éther ; DEGEE, diéthylène glycol éthyl éther ; DEGBE, diéthylène glycol butyl éther ; TEGDME, triéthylène glycol diméthyl éther ; 1PG2ME/A, 1-propylène glycol 2-méthyl éther et son acétate

^a Présents dans l'Annexe XVII de la réglementation REACH

^b Restreint par l'annexe XVII depuis 2010 en raison de leur toxicité par inhalation et voie cutanée

1.5.1. Toxicocinétique

Les éthers de glycol sont absorbés rapidement et de manière importante principalement par voie cutanée et respiratoire. Une fois dans l'organisme, les éthers de glycol accèdent à tous les compartiments en quelques minutes et après quelques heures, on retrouve de fortes concentrations dans certains tissus comme le foie, les reins et la graisse. Les éthers de glycol traversent également la barrière fœto-placentaire. Le métabolisme des éthers de glycol est différent selon qu'ils sont dérivés de la série E ou de la série P [338]. Les dérivés de l'éthylène glycol (qui possèdent une fonction alcool primaire) connaissent une série d'oxydations catalysées par l'alcool déshydrogénase puis l'aldéhyde déshydrogénase et donnent lieu à la formation d'aldéhydes et d'acides alkoxy. Les dérivés du propylène glycol suivent des voies de métabolisation différentes selon qu'ils sont substitués sur le premier (isomère majoritaire α) ou le second (isomère minoritaire β) carbone du propylène glycol. L'isomère β est métabolisé par le même système alcool déshydrogénase/aldéhyde déshydrogénase que les éthers de glycol de la série E alors que l'isomère α subit une désalkylation par des mono-oxygénases à CYP450 libérant un alcool et le propylène glycol. Cette dernière voie de métabolisation est également une voie mineure pour métaboliser les éthers de glycol de la série E, notamment lorsque la voie principale de métabolisation est saturée.

Tableau 7 : Métabolites d'éthers de glycol dosés et leurs éthers de glycols sources

Métabolite	Ethers de glycol source
MAA, acide méthoxyacétique	EGME, EGDME, DEGME, DEGDME, TEGME, TEGDME
MEAA, acide methoxyethoxyacétique	DEGME, TEGME, DEGDME
EAA, acide éthoxyacétique	EGEE, EGDEE, DEGEE, DEGDEE, TEGEE
EEAA, acide éthoxyéthoxyacétique	DEGEE, TEGEE
BAA, acide 2-butoxyacétique	EGBE, DEGBE, TEGBE
PhAA, acide phénoxyacétique	EGPhE et autres substances
PrAA, acide n-propoxyacétique	EGnPE
2-MPA, acide 2-méthoxypropionique	1PG2ME (isomère β du 2PG1ME).

La métabolisation des éthers de glycol est très rapide (temps de demi-vie plasmatique de 20 à 30 minutes) et leur élimination se fait principalement par voie urinaire mais très peu sous forme inchangée. Plusieurs biomarqueurs urinaires spécifiques aux éthers de glycol ont été identifiés (Tableau 7). Un même métabolite peut être issu de différents éthers de glycol (ex : MAA) et certains éthers de glycol sont des précurseurs de plusieurs métabolites (ex : DEGDME). Contrairement aux molécules mères, les métabolites alkoxyacides ont des cinétiques d'élimination plus lentes. Par exemple, les temps de demi-vie des dérivés monosubstitués de l'éthylène glycol varient de 6 à 80 heures chez l'homme proportionnellement à la longueur de la chaîne alkyl du métabolite [338].

1.5.2. Toxicité des éthers de glycol sur les fonctions reproductives

La problématique de la toxicité des éthers de glycol a fait l'objet de deux expertises scientifiques menées par l'INSERM et publiées en 1999 et en 2006 [338,339]. Les résultats portant sur la toxicité des éthers de glycol sur les fonctions de reproduction et le développement sont résumés ci-dessous et complétés par la littérature récente (Tableau 8). Certains éthers de glycol comme l'EGME et l'EGEE ont fait l'objet de nombreuses études mais ce n'est pas le cas pour la majorité des éthers de glycol. Notons que les effets toxiques des éthers de glycol ont été attribués à leurs métabolites alkoxyacides

1.5.2.1. Etudes animales ou cultures cellulaires

➤ Effets au cours du développement

Les effets fœtotoxique et tératogène des éthers de glycol ont fait l'objet de nombreuses études chez l'animal [338,339]. Chez la femelle gravide, diverses manifestations d'intolérance ont été observées avec la plupart des éthers de glycol. Une mort fœtale, un retard de croissance ainsi que des malformations sont rapportées après exposition prénatale aux éthers de glycol de la série éthylénique. Ces malformations touchent de nombreux organes (système nerveux central, urinaire, cardiaque, squelettique...) et apparaissent de façon variable selon l'espèce testée et les périodes d'administration. En ce qui concerne les dérivés de la série propylénique, seul l'isomère β du PGME (1PG2ME) – que l'on sait métabolisé en alkoxy acide comme les dérivés de la série éthylénique – est associé à une toxicité fœtale incluant des résorptions fœtales, des malformations et un retard pubertaire.

➤ Gonades mâles

Dès le début des années 1980, de nombreuses études se sont intéressées à la toxicité des éthers de glycol sur la gonade mâle [338,339]. Toutefois, leur nombre était très variable selon l'éther de glycol considéré et les mécanismes les plus étudiés concernent l'EGME et l'EGEE et leur métabolite le MAA et l'EAA. Ces études ont permis de souligner la toxicité testiculaire de plusieurs éthers de glycol, en particulier ceux de la série éthylénique de bas poids moléculaire, mais aussi celle de l'isomère β du PGME, métabolisé en acide alkoxy. Cette toxicité est spécifique pour la lignée cellulaire germinale, entraînant un arrêt de la spermatogénèse et par conséquent une diminution de la fertilité. Plus précisément, cette toxicité se manifeste sur les spermatoocytes (parfois les spermatides), aboutissant à une mort cellulaire par apoptose qui va entraîner l'arrêt de la méiose des cellules germinales et une interruption de la production de spermatozoïdes. Ces effets, dont la gravité est fonction de la dose et de la durée d'exposition, ont été retrouvés pour l'ensemble des espèces testées et selon les

différentes voies d'administration. En fonction de l'intensité de l'exposition, les effets testiculaires peuvent être réversibles mais cette réversibilité est compromise lorsque les spermatogonies sont touchées en raison de la diminution du stock de cellules souches.

➤ Gonades femelles

Peu d'études se sont intéressées aux effets des éthers de glycol sur les gonades femelles et la fonction de reproduction. Chez les femelles rongeurs adultes, l'exposition à l'EGME (ou son principal métabolite le MAA) a été associée à une diminution (voire suppression) de l'ovulation, une diminution du nombre de follicules ovariens, et une augmentation des niveaux de progestérone résultant d'un effet toxique au niveau des cellules lutéales (pas de modification des niveaux de LH, FSH et prolactine) [340–342]. Cette augmentation de la production de progestérone a également été observée à partir de culture de cellules lutéales humaines [343]. Cependant, ces effets ne se traduisent pas forcément par une atteinte de la fertilité d'après les études animales l'ayant évaluée [344,345]. A l'inverse, une atteinte de la fertilité a été rapportée chez les femelles rongeurs exposées à l'EGEE, l'EGBE, l'EGPhE et le TEGDME [346–349]. Concernant le PGME, seul son isomère minoritaire (1PG2ME) a été associé à une atteinte de la fertilité ainsi qu'à une diminution du nombre d'implantations fœtales [350,351]. Les études portant sur le DEGEE, le DEGBE, et le DEGDME ne rapportent pas d'atteinte de la fertilité ni de modification du poids des organes génitaux [348,352–354]. Aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant les effets des autres éthers de glycol sur la fertilité des femelles.

➤ Activité endocrinienne

Les mécanismes impliqués dans la toxicité testiculaire des éthers de glycol ont été approfondis et à ce jour, deux métabolites (MAA et PhAA) ont fait l'objet d'une attention particulière concernant leur potentielle interaction avec le système endocrinien. Pour le MAA, il a notamment été montré qu'il était associé à une altération de l'expression du récepteur AR et de l'ARNm de l'ABP (Androgen binding protein) dans la cellule de Sertoli de rat [355], une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur ER β dans les spermatoocytes pachytènes de rat et de souris [356,357] et une diminution de l'expression de ER α dans les cellules MCF-7 et l'utérus de souris [358]. Le MAA atténue l'expression des gènes cibles des œstrogènes et cet effet est probablement dû à la diminution de l'expression des récepteurs aux œstrogènes puisque le MAA n'est pas en compétition avec l'œstradiol vis-à-vis de ces récepteurs [359,360]. Concernant le PhAA, seule une étude s'est intéressée à son potentiel (anti-)œstrogénique et ne rapporte pas d'effet allant en ce sens [361].

Tableau 8 : Synthèse des effets reprotoxiques des éthers de glycol chez l'homme et l'animal
Source : adapté de Multigner et al. 2005 [362]

	Fertilité masculine	Fertilité féminine	Développement
EGME/A	++	+	++
EGEE/A	++	+	++
EGDME	+	nd	+
DEGME	+/-	nd	+
DEGEE	+	nd	Nd
DEGDME	++	nd	+
TEGDME	+	+	+
EGDEE	nd	nd	+
DEGDDEE	-	nd	+
TEGME	+	nd	+
EGBE/A	-	+	+
DEGBE/A	-	+	-
EGPhE	+	+	+/-
EGnPE	+/-	nd	+
1PG2ME/A	nd	nd	+
2PG1ME	-	-	-

++ très toxique ; + toxique ; +/- toxique suggéré ; - non toxique ; nd, donnée non disponible.

1.5.2.2. Etudes épidémiologiques

Chez l'Homme, seules quelques études se sont intéressées aux effets des éthers de glycol sur la fonction de reproduction et le développement. Elles concernent principalement des expositions rencontrées en milieu professionnel et en particulier dans l'industrie de l'électronique et des semi-conducteurs. Les principaux solvants présents dans ces secteurs sont les éthers de glycol mais d'autres solvants sont également utilisés comme le xylène, l'acétate de n-butyle, l'acétone, l'alcool iso-propylique et le méthanol [197, 205]. La limite majeure de ces études réside dans leur caractère majoritairement rétrospectif et dans l'évaluation indirecte de l'exposition aux éthers de glycol. En effet, l'exposition est souvent caractérisée à partir d'une description de l'emploi, recueillie par questionnaires et parfois affinée par expertise, mais très rarement par une évaluation directe de l'exposition par la mesure de biomarqueurs urinaires.

➤ Fausses couches spontanées

A l'exclusion des études ne discriminant l'exposition que par le type de poste occupé (fabrication, lithographie, gravure), cinq études dans l'industrie des semi-conducteurs se sont plus spécifiquement intéressées à l'impact de l'exposition aux éthers de glycol sur la survenue de fausse couche spontanée. Les trois études de cohorte rétrospectives rapportaient une augmentation significative du risque de fausse couche en association avec un score d'exposition aux éthers de glycol déterminé par expertise [363–365]. Une étude de cohorte prospective avec un suivi quotidien de l'HCG chez 148 femmes rapportait également une augmentation du risque de fausse couche mais non significative [366]. A l'inverse, une étude cas-témoins anglaise nichée dans une cohorte de 2207 femmes ne retrouvait pas d'association [367].

➤ Malformations

Six études cas-témoins se sont intéressées au risque de malformations congénitales en association avec l'exposition aux éthers de glycol définie à partir de la description de l'emploi pendant la grossesse [368–373]. Deux d'entre elles ont étudié différents sous-groupes de malformations [368,369], deux autres se sont intéressées aux fentes orales seulement [370,371], et les deux dernières aux malformations du système nerveux central [372,373]. Une augmentation significative du risque de fente orale est rapporté par trois des quatre études s'y étant intéressé (dont deux partageant la même population d'étude) [368,370,371], ainsi qu'une augmentation significative du risque de malformations du système nerveux central par deux études sur les quatre [368,372]. Bien que les associations ne soient pas significatives, une autre étude rapporte également des risques augmentés pour ces deux types de malformations [369]. Une augmentation du risque de malformations cardiaques est également suggérée dans deux études [368,369]. Une seule étude, menée par notre groupe, a utilisé des biomarqueurs urinaires d'exposition aux éthers de glycol dans le cadre d'une étude prospective de cohorte [207]. Des associations significatives ont été observées entre la détection de métabolites alkoxy acides et le risque de malformations : EEAA et fentes orales et malformations des membres, et 2-MPA et toutes malformations majeures confondues et malformations urinaires [207]. Une augmentation du risque de malformations génitales du garçon est également suggérée en association avec la détection d'EAA [207]. Hormis des études épidémiologiques classiques, des séries de cas ont également été rapportées dans la littérature. Des syndromes dysmorphiques (malformations faciales et réduction des membres), des retards mentaux et des anomalies cytogénétiques ont été rapportés chez les enfants de femmes mexicaines travaillant dans une fabrique de condensateurs pendant la grossesse et fortement exposées à un mélange d'EGME et d'éthylène glycol [374,375]. Un rapport de 1990 fait également état d'une mère exposée professionnellement à l'EGMEA pendant ses grossesses (1980-83) et ayant donné naissance à deux enfants nés avec un hypospade [376].

➤ Fertilité masculine

Les premières études s'étant intéressées à l'impact des éthers de glycol sur la fertilité masculine ont été réalisées en milieu professionnel, chez des peintres de chantier naval et des ouvriers de fonderie [377,378]. Chez les sujets exposés aux éthers de glycol, ces études ont rapporté une diminution significative du nombre de spermatozoïdes [378] et ont suggéré une diminution de la concentration spermatique [377]. Au sein des entreprises de fabrication de semi-conducteurs, le risque de fausse couche spontanée n'est pas associé au poste de travail du père mais le pourcentage d'homme rapportant des difficultés à concevoir était plus élevé (mais non significatif) chez les ouvriers des secteurs exposés aux éthers de glycol [365,379]. Bien que l'exposition aux éthers de glycol (EGEE, EGME) soit importante dans ces secteurs, de nombreux autres solvants sont également utilisés et leurs effets respectifs ne peuvent être dissociés. Une étude cas-témoins conduite en Belgique a évalué la présence d'EAA dans les urines d'hommes ayant eu un diagnostic d'infertilité ou de sous fertilité et d'hommes fertiles et a observé une proportion significativement plus élevée d'échantillons positifs chez les cas que chez les témoins [380]. Une étude réalisée au sein de travailleurs de la municipalité de Paris rapporte une réduction du nombre de spermatozoïdes et du pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux en association avec les expositions antérieures à 1995 (période précédant l'interdiction des éthers de glycol reprotoxiques), mais pas pour les expositions récentes, estimées par des biomarqueurs urinaires d'exposition [46]. Une diminution des niveaux de FSH en association avec les expositions passées et une diminution des niveaux de testostérone en association avec les niveaux urinaires de 2-MPA sont également suggérées [381]. Une étude cas-témoins anglaise comparant des hommes avec une diminution de la mobilité des spermatozoïdes à des hommes sans anomalies du sperme, rapporte une association avec l'exposition aux éthers de glycol définie par expertise [382].

➤ Fertilité féminine

Quelques études se sont intéressées aux effets de l'exposition aux éthers de glycol sur les fonctions de reproduction féminines en étudiant la durée et la régularité des cycles menstruels ainsi que le délai nécessaire à concevoir. Au sein d'entreprises de fabrication de semi-conducteurs aux USA et à Taïwan, une augmentation du risque de cycles longs (>35 jours) [383], un allongement du délai nécessaire à concevoir [384,385] et une augmentation du risque sous-fertilité (délai >1 an) [365] ont été rapportés chez les femmes exposées aux éthers de glycol. Une étude conduite à Singapour observe une proportion légèrement plus importante de femmes avec des cycles longs en association avec l'exposition aux éthers de glycol déterminée par dosages urinaires d'EGEEA [386]. En population générale, un allongement du délai nécessaire à concevoir a été observé en association avec les niveaux de PhAA urinaires (pas d'association pour les autres métabolites mesurés) [387].

1.6. OBJECTIFS

L'objectif général de cette thèse porte sur l'étude d'indicateurs d'altération du développement du système reproducteur en lien avec l'exposition prénatale à deux familles de polluants chimiques différentes, mesurée à partir de biomarqueurs :

- **les polluants organiques persistants**, des substances lipophiles et bioaccumulables, connus pour leur activité endocrinienne et interdits depuis plusieurs décennies
- **Les éthers de glycol**, des substances hydrosolubles à courtes demi-vies, dont certains connus pour leur reprotoxicité et par conséquent restreints d'utilisation, mais dont l'activité endocrinienne a été peu étudiée

Ce travail de thèse repose sur l'analyse des données recueillies au sein de deux cohortes mère-enfant françaises (2002-2006). L'exposition prénatale aux polluants mentionnés ci-dessus sera étudiée en association avec les concentrations d'hormones sexuelles mesurées dans le sang de cordon ombilical et le risque de malformations congénitales de l'appareil génital du garçon.

Au cours de ce travail de thèse, trois études ont été menées :

1. Impact de l'exposition prénatale aux polluants organiques persistants sur les concentrations d'hormones sexuelles mesurées dans le sang de cordon ombilical
2. Impact de l'exposition prénatale aux éthers de glycol sur le risque de malformations congénitales de l'appareil génital du garçon
3. Impact de l'exposition prénatale aux éthers de glycol sur les concentrations d'hormones sexuelles mesurées dans le sang de cordon ombilical

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1. POPULATION D'ETUDE

Cette thèse repose sur les données issues de deux cohortes de naissances françaises : la cohorte PELAGIE (*Perturbateurs Endocriniens : Étude Longitudinale sur les Anomalies de la Grossesse, l'Infertilité et l'Enfance*) et la cohorte EDEN (*Etude des Déterminants pré- et post-natals du développement de la santé de l'ENfant*). Ces deux cohortes se ressemblent de par leur période d'inclusion, la disponibilité d'échantillons biologiques au cours de la grossesse et le type d'informations recueillies, mais diffèrent quelque peu dans leur recrutement. Un tableau récapitulatif des différences de protocole entre ces deux cohortes est présenté en Annexe 1 (Tableau 12).

2.1.1. La cohorte PELAGIE

Les femmes enceintes de la cohorte PELAGIE ont été recrutées entre avril 2002 et février 2006, par les gynécologues, échographistes et sages-femmes de trois départements en Bretagne (Ille-et-Vilaine, Côtes d'Armor, Finistère). La participation de ces professionnels de santé s'est faite sur la base du volontariat et on estime qu'environ 20% des praticiens ont accepté de participer. L'étude était proposée aux femmes enceintes lors de leur 1^{ère} visite médicale survenant au cours du premier trimestre de grossesse. A cette occasion, les professionnels remettaient aux femmes ayant accepté de participer, le questionnaire d'inclusion ainsi qu'un kit de prélèvement d'urines. Ce questionnaire était rempli par la patiente à son domicile puis envoyé par voie postale à l'équipe de recherches, accompagné d'un échantillon d'urines (premières urines du matin, recueillies chez >95% des femmes). Au cours de la période d'inclusion, 3592 femmes ont donné leur accord de participation. Les femmes ayant retourné le questionnaire et le prélèvement d'urines après 19 semaines d'aménorrhée (SA) ont été exclues. Au final, la cohorte est constituée de 3421 femmes enceintes.

A l'accouchement, 3399 (99%) des femmes incluses en début de grossesse ont été vues en maternité. Les informations concernant le déroulement de la grossesse et l'état de santé du nouveau-né ont été collectées par les sages-femmes et le pédiatre qui ont examiné l'enfant avant sa sortie de la maternité. Un échantillon de sang de cordon a été prélevé chez 2138 (62%) femmes et immédiatement centrifugé à la maternité puis stocké à -20°C au laboratoire. D'autres prélèvements tels qu'un fragment de placenta et une mèche de cheveux de la mère étaient également recueillis.

Par la suite, des suivis ont été mis en place aux 2 ans et aux 6 ans de l'enfant, principalement par questionnaires afin de recueillir diverses informations sur les habitudes de vie, le développement et la santé de l'enfant. Un sous-groupe d'enfants a bénéficié d'un suivi plus poussé à 6 ans incluant des tests neurocognitifs et des prélèvements biologiques. Le suivi à 12 ans est actuellement en cours.

2.1.2. La cohorte EDEN

Les femmes de la cohorte EDEN ont été incluses entre avril 2003 et mars 2006 dans deux Centres Hospitaliers Universitaires que sont les CHU de Nancy et de Poitiers. L'étude a été proposée à l'ensemble des femmes (hormis en cas de grossesse multiple, diabète maternel préexistant, intention de déménager dans les 3 ans et de non maîtrise de la langue française) venant en consultation pour le suivi de leur grossesse, avant 24 SA, dans l'un de ces deux CHU. Parmi les 3758 femmes éligibles, 2002 (53%) ont accepté de participer à l'étude et ont rempli un premier auto-questionnaire distribué lors de cette visite. Les femmes étaient ensuite revues pour un examen spécifique entre 24 et 28 SA, incluant entre autres un examen clinique, des questionnaires maternel et paternel et un prélèvement urinaire.

A l'accouchement, seules les femmes ayant donné naissance à un enfant vivant dans l'une des deux maternités des CHU de Nancy et Poitiers ont finalement été incluses dans la cohorte, portant ainsi le nombre final de couples mère-enfant à 1894 (95%). Un nouveau questionnaire était administré aux femmes et les informations concernant le déroulement de la grossesse et l'état de santé du nouveau-né ont été collectées par les sages-femmes et le pédiatre qui ont examiné l'enfant avant sa sortie de la maternité. Des échantillons biologiques ont également été recueillis à la maternité (sang de cordon, placenta, cheveux, lait, méconium).

Pour le suivi de ces enfants, plusieurs questionnaires ont été remplis par la mère à 4, 8 et 12 mois, puis tous les ans jusqu'à 5 ans et enfin à 8 ans, afin de recueillir diverses informations sur les habitudes de vie, le développement et la santé de l'enfant. Des examens cliniques de l'enfant ont également été réalisés à l'âge de 1, 3 et 5 ans, incluant notamment des mesures anthropométriques, un examen des organes génitaux du garçon (à 1 an) et des tests cognitifs et moteurs. Le suivi à 12 ans est également en cours.

2.2. MESURE DES EXPOSITIONS PRENATALES

2.2.1. Mesure de l'exposition aux PCB, pesticides organochlorés et PBDE

Les dosages de polluants organiques persistants ont été réalisés dans le sang de cordon ombilical recueilli à l'accouchement chez un sous-groupe d'enfants de la cohorte PELAGIE. Les POP étant des composés lipophiles et persistants, le sang est une matrice de choix pour évaluer l'exposition et le sang de cordon ombilical l'est d'autant plus pour évaluer l'exposition du fœtus et se restreindre ainsi aux molécules qui traversent le placenta [388].

Le choix des polluants organiques persistants à mesurer s'est fait à partir des données de la littérature. Les composés sélectionnés sont ceux suggérés comme possiblement toxiques pour la reproduction et le développement de l'enfant, ayant des niveaux détectés dans la population humaine, et/ou susceptibles de pouvoir être retrouvés dans la région Bretagne (anciennement utilisés, traces de contamination environnementale, etc...). La liste des composés recherchés est présentée dans le Tableau 9, cependant, seuls les composés détectés dans au moins 5% des échantillons analysés (molécules en gras) et la somme totale des PCB, seront retenus dans les analyses qui vont suivre.

Tableau 9 : Liste des polluants organiques persistants recherchés dans les échantillons de sang de cordon ombilical

Familles de composés	Molécules sélectionnées	Limites de détection
Pesticides organochlorés	alpha-hexachlorocyclohexane (α -HCH) bêta-hexachlorocyclohexane (β-HCH) gamma-hexachlorocyclohexane (γ-HCH ou Lindane) hexachlorobenzène (HCB) heptachlor heptachlor epoxide (HCE) aldrine dieldrine alpha-endosulfan bêta-endosulfan p,p'-DDE, p,p'-DDT, o,p'-DDE, o,p'-DDT	0.01-0.02 $\mu\text{g/l}$
Polychlorobiphényles (PCB)	74, 99, 101, 118, 138, 153, 170, 180, 183, 187, 194, 203	0.01-0.02 $\mu\text{g/l}$
Polybromodiphényléthers (PBDE)	28, 47, 66, 99, 100, 153, 154, 183, 209	0.01-0.02 $\mu\text{g/l}$ (sauf PBDE209 = 0.05 $\mu\text{g/l}$)
Polybromobiphényle (PBB)	153	0.02 $\mu\text{g/l}$
Hexabromocyclododecane (HBCD)	HBCD	0.1 $\mu\text{g/l}$

En gras, les composés détectés dans plus de 5% des échantillons.

Ces dosages de polluants organiques persistants ont été réalisés par le Centre de Toxicologie de Québec (CTQ) de l'Institut National de Santé Publique de Québec. Le CTQ répond aux exigences de qualité de la norme ISO/CEI 17025 et participe à des programmes de comparaison inter-laboratoires.

A partir de 2ml de sérum, le CTQ a réalisé les dosages de ces composés simultanément par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les concentrations sont rapportées en masse volumique ($\mu\text{g/l}$) et les limites de détection variant entre 0.01 $\mu\text{g/l}$ pour la plupart des composés à 0.05 $\mu\text{g/l}$ pour le PBDE209. Le profil lipidique a également été mesuré par une méthode enzymatique: les niveaux de cholestérol total (TC) et libre (FC), de triglycérides (TG) et de phospholipides (PL) dosés ont permis de calculer le taux de lipides totaux via la formule suivante : $1.677 \times (\text{TC} - 2 \text{ FC}) + \text{FC} + \text{TG} + \text{PL}$ [389].

2.2.1. Mesure de l'exposition aux éthers de glycol

Les dosages de métabolites des éthers de glycol ont été réalisés à partir des urines maternelles (1^{ères} urines du matin) recueillies chez un sous-groupe de femmes des cohortes PELAGIE et EDEN. Quelques différences dans le protocole de prélèvement existent entre les deux cohortes. Pour les femmes PELAGIE, le prélèvement urinaire était effectué avant 19SA et renvoyé par voie postale à l'équipe Inserm (un stabilisateur était utilisé pour éviter la dégradation des urines : acide chlorhydrique ou nitrique). A réception, les échantillons étaient stockés à -20°C jusqu'à analyse. Pour les femmes EDEN, le prélèvement urinaire était réalisé entre 24 et 28 SA, puis apporté le jour même au laboratoire lors de l'examen spécifique. Les prélèvements étaient ensuite stockés à -80°C .

Les métabolites d'EG ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). La détection était faite en mode d'ionisation chimique négative avec du méthane comme gaz réactant. L'acquisition était réalisée en mode full scan de 85 à 152 m/z. Cette méthode permet le dosage de 8 acides alkoxyacétyliques, métabolites urinaires des EG les plus utilisés en France au moment du recrutement des femmes (Tableau 10) : l'acide méthoxyacétique (MAA), l'acide méthoxyéthoxyacétique (MEAA), l'acide éthoxyacétique (EAA), l'acide éthoxy-éthoxyacétique (EEAA), l'acide 2-butoxyacétique (BAA), l'acide n-propoxyacétique (PrAA), l'acide phénoxyacétique (PhAA) et l'acide 2-méthoxypropionique (2-MPA). Cette méthode permet d'obtenir des coefficients de variation (CV) inférieurs à 10% à 0,10 mg/L [309]. La méthode est linéaire ($r^2=0.99$) entre 0,05 et 2,0 mg/L pour tous les acides alkoxyacétyliques avec une limite de détection (LD) égale à 0,05 mg/L.

Tableau 10 : Principaux produits contenant des éthers de glycol en 2000-2006 en France et leurs métabolites associés.

Sources : Afsset 2008 [334]

Produits	Ethers de glycol	Métabolites
Peintures, encres et vernis	PGME	2-MPA
	EGBE	BAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	DEGEE	EEAA, EAA
	TEGEE	EEAA, EAA
	EGnPE	PAA
Cosmétiques	EGPhE	PhAA
	EGBE	BAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	DEGEE	EEAA, EAA
Produits d'entretien	DEGEE	EEAA, EAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	EGBE	BAA
	PGME	2-MPA
	DEGME	MEAA, MAA
	TEGME	MEAA, MAA
	TEGDME	MAA
Biocides	PGME	2-MPA
	EGBE	BAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	DEGEE	EEAA, EAA
	EGPhE	PhAA
Médicaments	DEGEE	EEAA, EAA
	EGPhE	PhAA

Les dosages de métabolite d'EG ont été réalisés par le laboratoire de toxicologie et de génopathie du CHRU de Lille pour les échantillons de la cohorte PELAGIE, et par le LABOCEA à Ploufragan (Laboratoire public, Conseil, Expertise et Analyse en Bretagne) pour les échantillons de la cohorte EDEN. Une trentaine d'échantillons prélevés chez des femmes PELAGIE ont été envoyés pour dosages à ces deux laboratoires afin d'en assurer la comparabilité.

2.3. EVALUATION DES EVENEMENTS DE SANTE D'INTERET

2.3.1. Mesure des niveaux de stéroïdes dans le sang de cordon ombilical

Les dosages d'hormones stéroïdiennes ont été réalisés dans le sang de cordon ombilical des enfants inclus dans la cohorte PELAGIE. Deux stéroïdes ont été mesurés : la testostérone et l'œstradiol. Les concentrations de SHBG et d'AMH ont également été mesurées (AMH chez les garçons seulement). A partir de ces mesures, deux indices composites ont été calculés : la testostérone libre (Testostérone/SHBG) qui représente la fraction active de la testostérone, et l'indice aromatase (Testostérone/Œstradiol) qui traduit de l'activité de l'aromatase (cf section 1.1.2, page 19).

Deux séries de dosages ont été réalisées dont les méthodes analytiques utilisées pour mesurer les stéroïdes diffèrent (Tableau 11). La 1^{ère} série de dosages, utilisée en association avec les niveaux de POP, a été réalisée en 2009 par le Centre Hospitalier Universitaire de Rennes. Des méthodes radio immunologiques ont été utilisées pour mesurer les niveaux de testostérone, œstradiol, SHBG et AMH. La 2nd série de dosages, utilisée en association avec les métabolites d'EG, a été réalisée en 2013 par l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale. La testostérone et l'œstradiol ont été mesurées à partir de méthodes de spectrométrie de masse (GC-MS). La SHBG et l'AMH étaient dosées par méthodes radio immunologiques.

Tableau 11 : Méthodes analytiques utilisées pour mesurer les niveaux de stéroïdes ainsi que de SHBG et d'AMH dans le sang de cordon.

	1 ^{ère} série de dosage (POP)	2 nd série de dosage (EG)
Testostérone et œstradiol	Radio immunologique (RIA)	Spectrométrie de masse (GS-MS)
SHBG et AMH		Radio immunologique (RIA)

Comme mentionné précédemment (cf section 1.3.2.3, page 50), des études ont montré que l'utilisation de méthodes radio immunologiques pour mesurer les stéroïdes dans le sang de cordon n'était pas optimale, en particulier pour mesurer la testostérone [69]. Cette observation, relativement récente, a été rapportée après la réalisation de notre 1^{ère} série de dosages, c'est pourquoi la méthode de choix qui est celle de la spectrométrie de masse n'a été employée que pour la 2nd série.

Certains échantillons de sang de cordon étaient hémolysés et le degré d'hémolyse a été évalué visuellement et retranscrit en 3 catégories : pas d'hémolyse, hémolyse moyenne, hémolyse élevée.

2.3.2. Evaluation des malformations congénitales de l'appareil génital du garçon

A la naissance, les enfants PELAGIE et EDEN étaient examinés par la sage-femme ou le pédiatre avant leur sortie de la maternité. Au cours de cet examen, la présence de malformations congénitales, et plus particulièrement de malformations de l'appareil génital (hypospade et cryptorchidie), a été évaluée. Pour la cohorte EDEN, il était demandé à l'évaluateur de préciser la position du testicule et celle du méat urinaire.

Dans un premier temps, tous les cas de cryptorchidies et d'hypospades identifiés à la naissance ont été retenus. La cryptorchidie est définie comme l'absence d'un ou des deux testicules en position scrotale (que le testicule soit palpé ou non), et l'hypospade est définie comme la position anormale du méat urinaire (soit en position antérieure, moyenne ou postérieure ; cf Figure 8, page 54).

Dans un second temps, puisque l'on connaît les difficultés quant au diagnostic des malformations génitales à la naissance (en particulier la cryptorchidie), nous avons utilisé les données recueillies au cours du suivi des enfants pour confirmer ou non ces malformations repérées à la naissance. Les cryptorchidies confirmées concernaient les enfants ayant subi une opération chirurgicale ou pour lesquels le ou les testicules n'étaient pas présents dans les bourses à 1 an. Les hypospades confirmées concernent celles qui ont été confirmées lors d'un second examen ou ayant été opérées.

Les procédures de confirmation des cas étaient différentes entre les deux cohortes mais la période de suivi couverte est comparable. Pour la cohorte EDEN, deux sources d'information ont été utilisées : l'examen clinique de l'appareil génital à 1 an et les données recueillies par questionnaire à 4, 8, 12, et 24 mois qui portaient notamment sur les consultations et hospitalisations depuis la naissance et la présence de malformation congénitale. Pour la cohorte PELAGIE, il n'y a pas eu d'examen clinique à 1 an. De ce fait, les cas de malformations génitales ont été confirmés en contactant l'ensemble des chirurgiens pédiatriques de la région Bretagne pour savoir s'ils avaient vu en consultation (ou non) les enfants que nous avons identifiés à la naissance. Les comptes-rendus de consultation ou de chirurgie nous ont ainsi été transmis. Comme pour la cohorte EDEN, les données recueillies par questionnaire aux 2 ans de l'enfant ont également été utilisées comme source d'informations complémentaires.

Bien que les procédures de suivi soient différentes entre les deux cohortes, les cas confirmés de cryptorchidies concernent tous des enfants pour lesquels une descente spontanée du testicule n'a pas été observée au cours de la 1^{ère} année de vie et dont le diagnostic a été confirmé lors d'un second examen.

2.4. ANALYSE STATISTIQUE

2.4.1. Sélection des groupes d'études

Pour une question de coût des dosages biologiques et de disponibilité des prélèvements, il n'était pas possible de réaliser des mesures de biomarqueurs d'exposition et d'effet dans l'ensemble des échantillons collectés. De plus, cela permet de conserver une partie des échantillons pour de futurs projets. Les analyses portant sur l'impact des expositions prénatales (polluants organiques persistants et éthers de glycol) sur les niveaux d'hormones à la naissance ont été réalisées à partir de deux sous-groupes de femmes incluses dans la cohorte PELAGIE. L'étude du risque de malformation congénitale de l'appareil génitale du garçon en association avec l'exposition prénatale aux EG a été réalisée à partir d'un design d'étude cas-témoin nichée dans les cohortes EDEN et PELAGIE.

➤ POP et hormones sexuelles

Un premier sous-groupe de 601 (18%) femmes sélectionnées aléatoirement parmi les 3322 naissances vivantes et uniques de la cohorte PELAGIE a été constitué. Parmi ces 601 femmes, 394 (66%) prélèvements de sang cordon ombilical étaient disponibles et ont été utilisés pour mesurer les concentrations de POP. Un deuxième échantillon de sang de cordon ombilical était ensuite nécessaire pour réaliser les mesures de concentrations d'hormones. Ainsi, la population finale d'étude permettant d'évaluer les associations entre les niveaux d'exposition aux POP et les concentrations d'hormones dans le sang de cordon est composée de 282 enfants, soit 47% des enfants inclus dans ce sous-groupe.

➤ EG et hormones sexuelles.

Un second sous-groupe de 609 (18%) femmes sélectionnées aléatoirement parmi les 3421 femmes incluses dans la cohorte PELAGIE a été constitué. Parmi ces 609 femmes, toutes bénéficiaient d'un échantillon urinaire dans lequel les niveaux d'éthers de glycol ont été mesurés. Cependant, seules 361 (59%) échantillons de sang de cordon ombilical étaient disponibles pour y mesurer les concentrations d'hormones. Ainsi, après exclusion de 11 enfants (pour causes de grossesse multiple, malformation majeure ou âge gestationnel <35 SA), la population d'étude permettant d'évaluer les associations entre les niveaux d'exposition aux EG et les concentrations d'hormones dans le sang de cordon est composée de 350 enfants, soit 57% des enfants inclus dans ce sous-groupe.

➤ EG et malformations de l'appareil génital du garçon

Un design d'étude cas-témoin nichée dans les cohortes EDEN et PELAGIE a été mis en place pour l'étude du risque de malformation congénitale de l'appareil génital du garçon en association avec l'exposition prénatale aux EG. Chaque cas a été apparié à trois témoins selon la région d'inclusion (Bretagne, Poitiers, Nancy) et l'âge gestationnel au moment du prélèvement urinaire. La population d'étude inclut 70 cas et 209 témoins.

Une première analyse portant sur l'exposition aux éthers de glycol pendant la grossesse et le risque de malformations congénitales a déjà été publiée à partir des données de la cohorte PELAGIE [207]. Cette étude suggérait une augmentation du risque de malformations de l'appareil génital du garçon en association avec certains métabolites d'EG. Cependant, cette étude était limitée par son effectif ne permettant pas ainsi d'évaluer les associations avec l'ensemble des métabolites d'EG mesurées (problème de convergence statistique) ni même d'étudier le risque d'hypospades et de cryptorchidies pris indépendamment. De ce fait, afin d'augmenter la puissance statistique, nous avons choisi de combiner les données des cohortes PELAGIE et EDEN, comme cela a déjà été fait auparavant [390].

2.4.2. Traitement des données de biomarqueurs d'exposition

Les données de biomarqueurs d'exposition sont des variables quantitatives particulières puisque dans certains cas, on ne connaît pas la concentration exacte du polluant mesuré mais on sait simplement qu'elle ne dépasse pas la limite de détection (LD) inhérente à la méthode analytique employée. Or, plus le pourcentage de données <LD augmente et plus il sera difficile de traiter l'information sous sa forme continue. Ainsi, lorsque le pourcentage de donnée <LD était inférieur à 60%, une méthode d'imputation aléatoire reposant sur le maximum de vraisemblance a été utilisée. Cette méthode consiste à estimer les paramètres de la distribution attendue à partir de la distribution observée (%<LD + distribution des données >LD) puis, d'imputer une valeur, tirée aléatoirement dans la distribution attendue (et <LD), à chaque individu ayant une données <LD. Lorsque le pourcentage de données <LD était trop important, l'exposition a été catégorisée (<LD vs ≥LD ; <LD vs <médiane des valeurs détectées vs ≥ médiane des valeurs détectées).

2.4.3. Modélisation multivariée

Des modèles de régressions linéaires multivariés ont été utilisés pour étudier les associations entre les expositions d'intérêt et les concentrations d'hormones sexuelles mesurées dans le sang de cordon ombilical (variables continues). Des transformations de variables ont été appliquées pour normaliser les distributions des concentrations d'hormones. De par les différences existantes dans le développement du système reproducteur et les fonctions endocriniennes entre les sexes masculin et féminin, l'ensemble des analyses statistiques portant sur les niveaux d'hormones sexuelles dans le sang de cordon ombilical ont été stratifiées sur le sexe de l'enfant. Il est de plus suggéré que le placenta s'adapterait de manière différente à une modification de l'environnement maternel selon le sexe du fœtus ce qui justifie d'autant plus cette stratification [391]. Cependant, l'effet des polluants sur les niveaux d'hormones sexuelles peut également s'avérer identique dans les deux sexes, c'est pourquoi des analyses conjointes sont également réalisées, ce qui permet d'augmenter la puissance statistique de l'association testée.

Le risque de malformations de l'appareil génital du garçon en association avec l'exposition aux EG a été étudié à partir de modèles de régression logistique conditionnelle afin de tenir compte de l'appariement entre les cas et les témoins. Une pénalisation de Firth a été appliquée à ces modèles de régression logistique afin de réduire le biais inhérent aux petits échantillons (*small- and sparse-data bias*) [392]. Les analyses ont dans un premier temps été réalisées à partir de l'ensemble des cas de malformation congénitale de l'appareil génital du garçon identifié à la naissance puis, restreint aux cas confirmés lors du suivi postnatal.

Les stratégies d'ajustement propres à chacune des études sont détaillées dans les articles ci-après.

2.4.4. Evaluation de la forme de la relation

Comme évoqué précédemment, la relation observée entre l'exposition aux perturbateurs endocriniens et l'effet étudié peut être non-linéaire et non-monotone (cf section 1.2.5.3, page 45). Hors, les modèles de régression classiques supposent l'hypothèse de linéarité du risque lorsque l'exposition est introduite dans le modèle sous forme continue. Les expositions ont donc été systématiquement catégorisées pour permettre une évaluation de la forme de la relation à travers des terciles ou quartiles d'exposition. En complément, lorsque le pourcentage de détection était suffisant pour traiter les données d'exposition en continu, une visualisation de la forme de la relation a été obtenue à l'aide de splines. Un test de non-linéarité et un test d'association globale ont été réalisés. Lorsque la linéarité était respectée, un modèle de régression classique dans lequel la variable d'exposition était traitée sous sa forme continue a été réalisé.

2.4.5. Comparaisons multiples

Au vu du nombre de polluants chimiques étudiés, la problématique de la multiplicité des tests statistiques peut se poser. Brièvement, un test statistique repose sur deux types d'erreur : l'erreur de 1^{ère} espèce (risque α) qui consiste à fixer la probabilité de conclure à tort à une association et l'erreur de 2^{nde} espèce (risque β) qui consiste à fixer la probabilité de conclure à tort à une absence d'association. Lorsque plusieurs tests statistiques sont réalisés en association avec un même évènement, le risque global d'erreur de 1^{ère} espèce, et donc de conclure à tort à une association, augmente. Pour contrôler cette augmentation du risque α , des méthodes existent pour corriger le seuil de significativité du test (la p-value) telles que la correction de Bonferroni ou le calcul du *False Discovery Rate* (FDR). Cependant, la correction du risque α entraîne inéluctablement une augmentation du risque de 2^{nde} espèce et donc une diminution de la puissance statistique ($1-\beta$). Pour plusieurs raisons, nous avons fait le choix de préserver la puissance statistique au détriment de l'augmentation du risque α . Premièrement, parce que nos études ont été réalisées à titre exploratoire et non confirmatoire mais également du fait du non-respect de l'hypothèse d'indépendance entre les tests (fortes corrélations entre les expositions testées, stratification des analyses selon le sexe) sur laquelle repose les méthodes de correction de la p-value, et de la subtilité des effets attendus [393–395]. Comme il est recommandé, la stratégie d'analyse statistique a été définie *a priori*, les décisions prises sont systématiquement justifiées et l'ensemble des résultats sont rapportés (pas de *data-fishing*) [393,395].

CHAPITRE 3

RESULTATS

3.1. ARTICLE 1: EXPOSITIONS PRENATALES AUX POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS ET NIVEAUX D'HORMONES SEXUELLES DANS LE SANG DE CORDON OMBILICAL

3.1.1. Résumé en français

Introduction

Plusieurs polluants organiques persistants sont des perturbateurs endocriniens connus chez l'animal, capables de modifier la synthèse ou le métabolisme des hormones stéroïdiennes et d'interférer avec leurs récepteurs. Diverses études épidémiologiques ont rapporté des anomalies de la reproduction en association avec l'exposition aux POP et suggèrent l'implication de mécanismes de perturbation endocrinienne. Les stéroïdes sexuels sont impliqués dans la différenciation sexuelle du fœtus et une modification de l'équilibre hormonal pendant la grossesse pourrait avoir des conséquences sur la santé reproductive à l'âge adulte.

Objectif

Cette étude a pour objectif d'évaluer les variations des concentrations d'hormones sexuelles à la naissance en association avec l'exposition prénatale à divers POP mesurée à partir de biomarqueurs.

Méthodes

La population d'étude comprend 282 nouveau-nés inclus dans la cohorte PELAGIE. Les concentrations d'hormones sexuelles incluant la testostérone (T), l'œstradiol (E2), l'hormone anti-Müllerian (AMH) et la *sex hormone binding globulin* (SHBG) ont été mesurées par radio-immunologie dans le sang de cordon ombilical et la fraction de testostérone libre ($fT=T/SHBG$) et l'index aromatase ($AI=T/E2$) ont été calculés. Les niveaux de POP suivants ont également été mesurés dans le sang de cordon ombilical : α -endosulfan, β -hexachlorocyclohexane (β -HCH), γ -HCH, dieldrine, pp'-dichlorodiphényldichloroethylene (p,p'-DDE), hexachlorobenzène (HCB), heptachlor époxyde (HCE), ainsi que des PCBs (congénères 153, 187 et la somme des PCB anti-œstrogéniques PCB 118, 138, et 170) et un polybromodiphényléther (PBDE209). Les associations entre les niveaux de POP, traités en catégories, et les concentrations d'hormones ont été évaluées à partir de régressions linéaires multivariées. Ces analyses ont été stratifiées sur le sexe de l'enfant.

Résultats

L'augmentation des niveaux d'exposition aux PCB et à l'HCB est associée à une augmentation des concentrations de SHBG et une diminution de la fT. L'exposition aux PCB est également associée à une augmentation de l'AMH et une diminution de l'AI. La détection d'HCE est associée à une augmentation de la SHBG et une diminution de la fT chez les garçons et à une augmentation de l'E2 et une diminution de l'AI chez les filles. La détection d' α -endosulfan est également associée à une augmentation de la SHBG et de l'E2 et une diminution de l'AI. La détection de PBDE 209 est associée à une diminution de la T. Ces associations sont robustes d'après les analyses de sensibilité réalisées.

Conclusion

Ces résultats suggèrent que l'exposition à des substances, connues pour interférer avec les récepteurs des stéroïdes tels les POP, peut se traduire par une modification de l'équilibre hormonal à la naissance. L'impact de l'exposition prénatale aux POP et des modifications d'hormones observées, sur le développement des fonctions reproductives, devra être confirmé.

3.1.2. Exposure of pregnant women to persistent organic pollutants and cord sex hormone levels.

Statut : Publié

Warembourg C, Debost-Legrand A, Bonvallet N, Massart C, Garlantézec R, Monfort C, Gaudreau E, Chevrier C, Cordier S. Exposure of pregnant women to persistent organic pollutants and cord sex hormone levels. *Hum Reprod.* 2016 Jan;31(1):190-8

C. Warembourg ^{1,2,*}, A. Debost-Legrand ^{1,3,4}, N. Bonvallet ^{1,5}, C. Massart ⁶, R. Garlantézec ^{1,5}, C. Monfort ^{1,2}, E. Gaudreau ⁷, C. Chevrier ^{1,2}, S. Cordier ^{1,2}

¹ Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), U1085, Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset), F-35043 Rennes, France. ² Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France. ³ Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, Service de Santé Publique, F-63000 Clermont-Ferrand, France. ⁴ Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, EA 4681, PEPRADE, Université d'Auvergne, F- 63000 Clermont-Ferrand, France. ⁵ Ecole des hautes études en santé publique (EHESP), F-35043 Rennes, France. ⁶ Centre de Toxicologie du Québec of the National Institute of Public Health, Quebec, Canada., ⁷ Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Unité fonctionnelle d'hormonologie, Inserm U1414, Centre d'Investigation Clinique, F-35033 Rennes, France

*Correspondence address: Charline Warembourg, IRSET - INSERM U1085, Epidemiological research on environment, reproduction and development, EHESP - Av. du Pr. Léon Bernard, Bâtiment du LERES, F-35043 Rennes, France. Tel: +33 (0)2 23 23 31 90. charline.warembourg@inserm.fr

Abstract

Study question: Is prenatal exposure to persistent organic pollutants (POPs) associated with variations of sex hormone levels in cord blood?

Summary answer: Prenatal exposure to a number of POPs is associated with a disruption of hormone levels in cord blood, with sex specificities.

What is known already: Epidemiological studies have reported disorders of reproductive health, in relation with POPs exposure during early life and the endocrine disruption properties of these chemicals have been suggested as possible mechanisms.

Study design, size, duration: A subset of 282 mother-child pairs was selected from the prospective population-based PELAGIE birth cohort (n=3421, 2002-2006, Brittany, France). Pregnant women were recruited before 19 weeks of gestation and followed until delivery.

Participants/materials, setting, methods: Sex hormone levels including sex hormone-binding globulin (SHBG), estradiol (E2), total testosterone (T), free testosterone (fT=T/SHBG) and the aromatase index (AI=T/E2) were measured in 282 cord blood samples. Anti-Müllerian hormone (AMH) was measured in male newborns only. Pesticide concentrations of α -endosulfan, beta-hexachlorocyclohexane (β -HCH), gamma-HCH, dieldrin, pp'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE), hexachlorobenzene (HCB), heptachlor epoxide (HCE), as well as PCBs (congeners 153, 187 and the sum of anti-estrogenic PCBs 118, 138, and 170) and decabrominated diphenyl ether (BDE209) were also measured in cord blood. Associations between sex hormones and POPs exposure were explored using multiple linear regressions adjusted for potential confounders.

Main results and the role of chance: High PCB levels were associated with an increase of SHBG (p-trend<0.01 up to 0.002) and AMH (p-trend up to< 0.053) and a decrease of fT (p-trend< up to 0.052) and AI (p-trend up to <0.0102). High pesticide levels, particularly α -endosulfan and HCE, were associated with an increase of SHBG (p-trend up to< 0.053) and E2 (p-trend< up to 0.0105) and a decrease of fT (p-trend< up to 0.054) and AI (p<-trend up to 0.0102). Several of these associations were stronger, or specific, among male or female newborns. The associations were not altered in the sensitivity analyses.

Limitations, reasons for caution: The study population was of relatively small sample size, and some compounds rarely detected in cord blood. The high level of correlation between POPs makes it difficult to identify the most contributing POPs. Hormone measurements were performed at birth (in cord blood) and may not adequately represent the infant endocrine system. Multiple statistical testing may have led to false-positive associations.

Wider implications of the findings: Our results are in discordance with those reported in the only published study of the kind but in accordance with studies about prenatal exposure to other

endocrine disruptors such as phthalates. These findings may help understanding the pathways involved in adverse reproductive outcomes associated with POPs exposure.

Study funding/competing interest(s): The PELAGIE cohort is funded by Inserm, French Ministry of Health, French Ministry of Labor, InVS, ANR, ANSES, and French Ministry of Ecology. None of the authors has any competing interest to declare.

Keywords: Steroids; Hormones; Polychlorinated biphenyls; Organochlorine compounds; Newborns; Cohort studies; Endocrine disruptors

Introduction

Persistent organic pollutants (POPs), such as organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDE), are widespread and known endocrine disruptors (EDs). They are suspected to cause steroid-mediated health effects, and exposure during the period of intrauterine development is suspected to cause irreversible effects by influencing the functions of the endocrine and other physiological systems later in life (Grandjean et al., 2008; WHO and UNEP, 2012).

ED chemicals can interfere with endocrine systems by different mechanisms of action. They can act directly, by mimicking (agonist) or blocking (antagonist) the action of natural hormones by binding to their natural receptors, or indirectly by altering hormone production, transport or regulation. In the case of steroid hormones, this indirect action can appear via a protein involved in hormone production (e.g., aromatase, which synthesizes converts testosterone [T] in estradiol [E2]), via a carrier protein (e.g., sex-hormone-binding-globulin [SHBG], which has a high affinity for T and E2 transportation) or by affecting feedback regulations.

Actually, the estrogenic activity of organochlorine pesticides (e.g., dichlorodiphenyldichloroethylene [DDE], endosulfan) has been experimentally observed for quite some time (Kupfer, 1975), and it has been confirmed in vitro in human estrogen sensitive cells (Soto et al., 1994). This activity has been shown to have a direct impact on the enzymes (aromatase) involved in steroidogenesis (Letcher et al., 1999; Wójtowicz et al., 2007). According to their structure, a weak estrogenic or anti-estrogenic activity has also been demonstrated for PCBs (especially Arochlor mixtures) both in vivo, with a uterotrophic assay in rats, and in vitro (Jansen et al., 1993; Wolff et al., 1997). Hypotheses of the mechanisms behind these effects potentially include estrogen receptor binding to hydroxylated metabolites, impact on aromatase activity (Woodhouse and Cooke, 2004) and, more recently, down-regulation of a WNT gene involved in the development of the female reproductive tract and subsequent adult function (Ma and Sassoon, 2006). PBDEs can also act on endocrine functions with anti-androgenic properties, as was recently shown in some (Stoker et al., 2005; Lilienthal et al., 2006) but not all studies (He et al., 2008). This suggests congener-dependent effects of these compounds. Therefore, it is difficult to predict whether a compound or a mixture of compounds may or may not induce an adverse health effect.

Several animal studies have suggested that exposure to PCBs and DDE might induce adverse reproductive health outcomes that appear at all stages of life, including the modification of sex hormone levels or reproductive organs, early/late puberty onset, reduced fertility capacities or

hormone-related cancers (breast, prostate) (WHO and UNEP, 2012). In humans, exposure to POPs (especially PCBs, organochlorine pesticides, dioxins and furans) has been associated with markers of reproductive functions such as genital malformations (McGlynn et al., 2009), puberty onset (Toppari and Juul, 2010), fecundability (Chevrier et al., 2013), semen quality or adult sex hormone levels (Meeker and Hauser, 2010), but evidence is still inconclusive. Most of these studies did not assess exposure during the critical windows of the developing systems (i.e., fetal and infant periods).

The modification of hormone levels at birth can reflect an alteration of the intrauterine development and be predictive of future pathologies (Barker et al., 1993).

To our knowledge, only one study has investigated the sex-steroid hormone levels of newborns with regard to prenatal POP exposures (Cao et al., 2008). More recently, associations between prenatal exposure to PCB and sex hormone levels among 14-year-old boys in the Faroe cohort were reported (Grandjean et al., 2012).

During gestation, the placenta is a major endocrine organ, but it is not fully functional in regards to the mechanisms of steroidogenesis because it is devoid of the enzymatic complex necessary for the conversion of pregnenolone to androgens (which are themselves substrates for the synthesis of estrogens). Therefore, this step is performed by the fetal and maternal adrenal glands, and there is perfect cooperation between the placenta and the fetus leading to the concept of the fetoplacental unit.

The aim of this exploratory study was to investigate the possible effects of prenatal exposure to various POPs on cord blood levels of sex hormones, which represent the fetoplacental unit, among a French mother-child cohort (PELAGIE).

Materials and methods

Study population

The study population came from the PELAGIE mother-child cohort, which enrolled 3,421 pregnant women (participation rate of 80%), at 19th weeks or less of gestation, living in Brittany (France) between 2002 and 2006 (for more details, see (Chevrier et al., 2013)). The women completed a questionnaire at home, and medical data were obtained by midwives and pediatricians for 99% of the women. At the time of delivery, cord blood samples were collected from 2138 (62%) women and were immediately centrifuged at the maternity hospital and stored at -20 °C in our lab.

A random sample of 601 births (18%) was obtained from the liveborn singleton cohort (n=3322) to perform chemical measurements. Among these newborns, cord blood samples were available for 396 (66%) newborns, but only 282 (47%) samples had sufficient serum volumes to perform both exposure and outcome assessments (see Supplementary Figure I).

Ethical approval

All participants provided informed written consent and the appropriate ethics committees approved the study (Ethical board for human participation in research study on health, CCTIRS and the National commission on informatics and liberty, CNIL).

Chemical analyses of persistent organic pollutants in the cord blood serum

The levels of POPs were determined from the cord blood samples of the subcohort of participants at the Centre de Toxicologie de Québec of the National Institute of Public Health of Québec. Details about the 36 compounds measured and the GC/MS methods used (2 ml serum samples) were described elsewhere (Chevrier et al., 2013) and in the Supplementary Section I.

Only compounds detected in more than 5% of the samples were retained for the present study. They included 9 PCBs (congeners 118, 138, 153, 170, 180, 183, 187, 194 and 203), 7 organochlorine pesticides (p,p'-DDE, beta-hexachlorocyclohexane [β HCH], dieldrin, gamma-hexachlorocyclohexane [γ HCH], hexachlorobenzene [HCB], heptachlor epoxide [HCE], and alpha-endosulfan) and 1 PBDE (congener 209). Because PCBs are highly correlated (see Supplementary Table I), we chose to study the congener 153 as a marker of the total exposure to PCBs, the congener 187, which is suspected to have estrogenic activity, and the sum of congeners 118, 138 and 170, which are suspected to have anti-estrogenic activities (Wolff et al., 1997).

The concentrations are reported as wet weight (units of micrograms per liter), and the limits of detection ranged from 0.01 μ g/L for the majority of the compounds to 0.05 μ g/L for PBDE209. The total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), triglyceride (TG), and phospholipid (PL) levels were also measured in these samples by an enzymatic method (in g/L), which allowed us to calculate the total lipid level as $1.677*(TC-FC)+FC+TG+PL$ (Patterson et al., 1991).

Hormone level assessments in the cord blood serum

Assays were performed in the cord blood at the Hormonal Laboratory of the Hospital of Rennes (France). E2 and T levels were determined by chemiluminescent assays on the automated ADVIA-Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown NY, USA). SHBG and AMH were measured using the IRMA or ELISA kits from Beckman-Coulter, Villepinte, France. The intra- and inter-assay

coefficients of variation were <8% and <9%, <6% and <9%, <6.1% and <8%, and <12.3% and <14.2% for E2, T, SHBG and AMH, respectively. Hemolysis was present in several samples, and the degree of hemolysis was ranked by visual inspection according to three levels (none, moderate, or high).

In addition, we calculated the free testosterone index [$fT=(T*100)/SHBG$] and the aromatase index ($AI=T/E2$).

Statistical analysis

To evaluate possible nonlinear relations, we categorized exposure according to the frequency of detection: Pollutants that were detected in less than 50% of the samples were categorized into 2 classes, detected and undetected. Pollutants that were detected in 50 to 75% of the samples were categorized into 3 classes; either into terciles or in whichso that the 1st class was undetected (<LOD) and the 2nd and 3rd classes less than or greater than the median concentration of the samples where the pollutant was detected – except for heptachlor epoxide which was detected in 51% of samples and was categorized into 2 classes, (i.e., detected and /undetected). Finally, pollutants that were detected in more than 75% of the samples were categorized into 4 classes (i.e., in quartiles).

To reach normality of the hormone level distributions, some variable transformations were used (log transformation for E2, SHBG and fT; inverse transformation for T), and some outliers, defined as +/- 4 sd, were excluded (n=2 for E2, n=5 for SHBG, n=6 for T, n=4 for AI, and n=3 for fT).

The associations between each hormone and each pollutant were estimated using multivariate linear regressions. Tests for linear trends were performed in which each categorized exposure of interest was entered as an ordinal variable. Estimate coefficients and 95% confidence intervals are presented in figures (see Supplementary tables II and III for detailed results).

All the models were a priori adjusted for gestational age at birth (continuous), maternal age (continuous), parity (nulliparous; primiparous) and total lipids (continuous). We also adjusted for maternal pre-pregnancy body mass index (BMI; <25 vs ≥ 25 kg/m²) when studying SHBG and fT. In addition, we explored whether hormone levels were impacted by sample characteristics (i.e., storage duration and hemolysis level), and we therefore adjusted all the models for hemolysis levels (none; moderate; high). Interactions with newborn sex were tested, and stratified analyses were systematically performed. Missing values of covariates were replaced by the mode (n=3 for BMI) or the median (n=6 for total lipids). The statistical analyses were performed using SAS software (SAS/STAT version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC).

Due to the semi-exploratory goal of our study (no evident expected results but statistical strategy guided by biological considerations), we did not proposed p-value corrections and accepted the possibility of false discoveries. All statistical tests were pre-specified in advance (not post-hoc) and all results were reported as recommended (Rothman, 1990; Bender and Lange, 2001; Goeman and Solari, 2011).

Sensitivity analyses

Three sets of sensitivity analyses were performed. The first excluded 12 women with diseases during pregnancy (i.e., gestational diabetes or high blood pressure). The second used the full-adjusted models including, in addition to those mentioned above, the following covariates: smoking status during pregnancy (no; yes), birth weight (continuous), maternal educational level (< post-secondary; ≥ post-secondary), maternal pre-pregnancy body mass index (<25; ≥25 kg/m²), gestational diabetes (no; yes) and high blood pressure (no; yes). The missing values were replaced by the mode (n=4 for smoking status, n=3 for diabetes and n=1 for high blood pressure).

The last set of sensitivity analyses was a multi-pollutant approach. POPs, which were associated with at least one hormone in the single-pollutant approach, were introduced simultaneously in the model. We chose not to include highly correlated pollutants ($\rho[\text{Spearman}] \geq 0.70$), assuming that linear models cannot disentangle associations in highly correlated data.

Results

Description of the study population

Table I shows the main characteristics of the pregnant women and their newborns. We can notice a highly educated population with a low prevalence of risk factors for adverse pregnancy outcomes (e.g., tobacco, obesity, pathologies of pregnancy). Most of the newborns were born at term, with a mean birth weight of 3379 g (SD=± 470 g).

Characteristics associated with hormone levels

We observed significant variations in hormone levels associated with some maternal and newborn characteristics (data not shown): maternal age and parity were negatively correlated with E2 and SHBG and positively correlated with AI. Gestational age was negatively correlated with T, fT and SHBG, and BMI was associated with a decrease in SHBG and an increase in fT. There was no difference in hormone levels by newborn sex.

Table I. Maternal and newborn characteristics (N=282)

	N (%) or median (Q1; Q3)
Maternal characteristics	
Maternal age (years)	
< 25	33 (11.7)
25-30	116 (41.1)
30-35	101 (35.8)
≥ 35	32 (11.4)
Continuous	29.8 (27.2; 32.5)
Education level	
Primary/secondary	48 (17.0)
Passed baccalaureate examination	49 (17.4)
Post-secondary	185 (65.6)
Maternal pre-pregnancy body mass index (kg/m²)^a	
< 18.5	25 (9.0)
18.5-25	216 (77.4)
≥ 25	38 (13.6)
Continuous	21.5 (19.9; 23.4)
Smoking status^a	
Non smoker	202 (72.7)
Stopped smoking at the beginning of the pregnancy	34 (12.2)
Smoker at inclusion	42 (15.1)
Alcohol consumption^a	
Never	236 (85.5)
Occasionally	36 (13.0)
Regularly (once a day)	4 (1.5)
Parity	
0	122 (43.3)
1	105 (37.2)
≥ 2	55 (19.5)
Gestational high blood pressure^a	
No	266 (94.7)
Yes	15 (5.3)
Gestational diabetes^a	
No	267 (95.7)
Yes	12 (4.3)
Newborn characteristics	
Sex	
Boy	141 (50.0)
Girl	141 (50.0)
Gestational age (week)	
	40 (39; 40)
Birth weight (g)	
	3,395 (3,100; 3,680)
Z-score of birth weight	
	0.15 (-0.53; 0.77)
Testosterone (µg/l)	
	1.99 (1.69; 2.53)
Sex hormone binding globulin (nmol/l)	
	33.6 (26.7; 40.8)
Free Testosterone	
	21.7 (16.3; 31.6)
Anti-Müllerian hormone (µg/l)	
	34.7 (23.9; 43.2)
Estradiol (µg/l)	
	6.14 (4.74; 11.63)
Aromatase Index	
	0.33 (0.24; 0.41)

^a Missing data on body mass index (n=3), smoking status (n=4), alcohol consumption (n=6), high blood pressure (n=1) and diabetes (n=3).

Description of POPs exposure

PCB153, PCB187, the sum of the anti-estrogenic PCBs, β -HCH, p,p'-DDE, and HCE were detected in most of the cord blood samples (75–100%) (see Table II). The highest median concentrations were observed for p,p'-DDE (0.19 $\mu\text{g/L}$) and PCB153 (0.11 $\mu\text{g/L}$). Several POP levels were highly correlated ($\rho[\text{Spearman}]>0.7$) (see Supplementary Table I). The main characteristics associated with higher POP levels were older maternal age and an earlier year of inclusion. Higher levels of PCB were also observed among women with lower BMI and higher education level, whereas higher levels of organochlorine pesticides were observed among women with higher maternal BMI and nulliparous women.

Table II. Persistent organic pollutants levels measured in cord blood samples (N=282).

Cord blood biomarkers	LOD	N (%) > LOD	Cord blood concentration ($\mu\text{g/L}$)				Lipid-Adjusted concentration (ng/g lipid) ^a			
			Median	p75	p90	Max	Median	p75	p90	Max
PCB 153	0.01	282 (100.0)	0.110	0.150	0.210	0.730	28.06	44.84	70.00	331.82
PCB 187	0.01	206 (73.1)	0.013	0.019	0.026	0.200	3.02	4.92	8.97	90.91
Sum of PCB ^b	0.01	282 (100.0)	0.115	0.164	0.214	0.825	30.42	49.86	76.80	375.00
p-p'-DDE	0.02	229 (81.2)	0.185	0.300	0.480	12.000	44.41	83.23	155.56	1137.93
Beta HCH	0.01	279 (98.9)	0.041	0.062	0.088	0.260	11.27	17.94	30.00	108.33
Hexachlorobenzene	0.02	219 (77.7)	0.033	0.051	0.067	0.200	8.14	15.00	23.68	83.33
Heptachlor epoxide	0.01	142 (50.5)	0.010	0.010	0.020	0.040	3.33	4.76	7.41	12.50
Dieldrin	0.01	45 (16.0)	<LOD	<LOD	0.022	0.081	<LOD	<LOD	5.88	44.12
Gamma HCH	0.01	33 (11.7)	<LOD	<LOD	0.011	0.140	<LOD	<LOD	5.65	17.95
Alpha endosulfan	0.01	16 (5.7)	<LOD	<LOD	<LOD	0.046	<LOD	<LOD	<LOD	21.90
PBDE 209	0.05	84 (32.3)	<LOD	0.075	0.200	1.200	<LOD	17.31	56.14	537.50

HCH, hexachlorocyclohexane; LOD, limit of detection; PBDE 209, polybrominated diphenyl ether; PCB, polychlorinated biphenyl; p-p'-DDE, p-p'-dichlorodiphenyldichloroethylene

^a 1 missing concentration for heptachlor epoxide, 1 for dieldrin, gamma HCH and alpha endosulfan, 22 for PBDE209 and 6 for total lipids level

^b Sum of congeners 118, 138, 170. Concentrations below the LOD for PCB118 (n=6) and PCB170 (n=14) were replaced by LOD/2

POPs exposure and T, SHBG, fT, and AMH

Figure I shows the associations between POP exposures and T, SHBG, fT and AMH for male and female newborns combined and separately (except for AMH, which was only measured in males). The most common association observed was the significant increase in SHBG levels with several POPs, the strongest being for PCBs, followed by HCB, HCE and α -endosulfan. In parallel, we observed a significant decrease in fT levels with exposure to PCBs and HCB but not to HCE or α -endosulfan. We also found an increase in AMH levels with exposure to PCB187 and the sum of the anti-estrogenic PCBs among boys. No significant association was found for T levels.

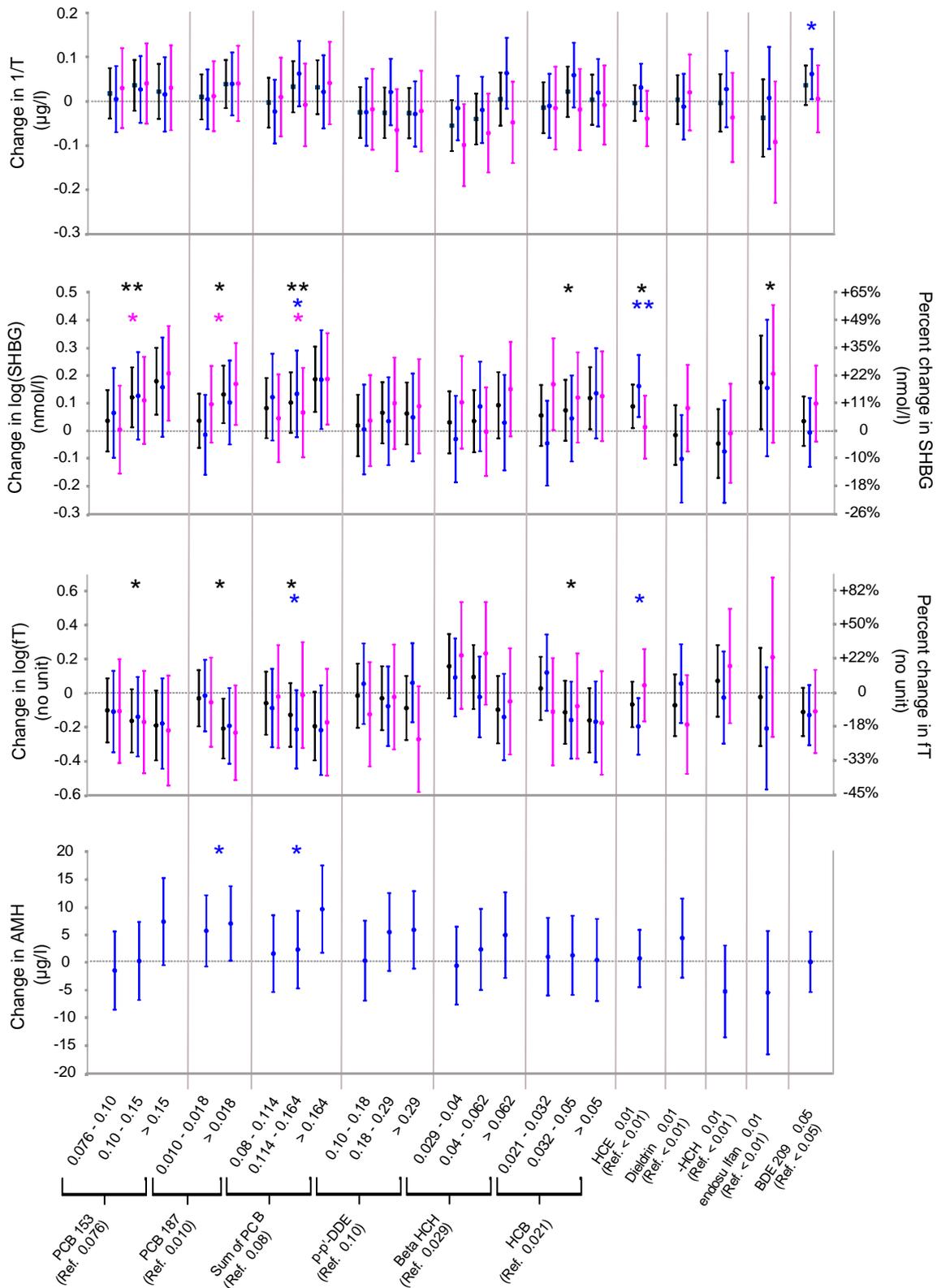


Figure I. Estimate coefficient and 95% confidence interval between prenatal exposures to persistent organic pollutants (in µg/l) and Testosterone (T), SHBG, free Testosterone (fT), and AMH. Adjusted for gestational age (continuous), maternal age (continuous), total lipid level (continuous), parity (2 categories), and hemolysis level (3 categories). Additionally adjusted for body mass index (2 categories) for SHBG and fT. Both sexes in black (n=282), boys in blue (n=141), and girls in pink (n=141). Levels of exposure were categorized according to the frequency of detection: in quartiles (>75% detected), in tertiles (50-75% detected) or detected/undetected (<50% detected). DDE, dichlorodiphenyldichloroethylene; HCB, hexachlorobenzene; HCE, heptachlor epoxide; HCH, hexachlorocyclohexane; PBDE, polybrominated diphenyl ether ; PCB, polychlorinated biphenyl; *p-trend < 0.05, **p-trend < 0.01

When we examined the associations by newborn sex, we primarily observed similar associations in both sexes, but we also observed some specificities. The increase in SHBG and the decrease in fT associated with exposure to HCE were specific to male newborns, whereas the increase in SHBG associated with exposure to PCB187 was specific to female newborns (see Figure I). Among boys, we can additionally mention a significant decrease in T with exposure to PBDE209 (see Figure I; inverse transformation of T leads to inverse interpretation).

POPs exposure and E2, and AI

Figure II shows the associations between POP exposures and E2 and AI levels for male and female newborns combined. We observed a significant increase in E2 with exposure to α -endosulfan and HCE but not with exposure to PCBs, even if a slight increase in E2 could be suggested for the highest categories of exposure. When we explored the associations with AI levels, significant decreases were observed for PCBs, HCE and α -endosulfan.

From the analysis stratified by newborn sex, we can note that the increases in E2 observed with exposure to HCE and α -endosulfan and the decrease in AI with exposure to HCE were specific to female newborns (see Figure II).

Sensitivity analyses

The first two sets of sensitivity analyses only marginally modified the results with a slight decrease in statistical power but no variation in the estimates (data not shown). When we excluded women with diabetes or high blood pressure, we additionally observed a significant increase in AMH with exposure to p,p'-DDE (data not shown). Finally, additional models that included PCB153, HCE, α -endosulfan and PBDE209 were tested simultaneously. Conclusions were similar to those from the single-pollutant approach except for the association between PCB153 and AI which was no longer significant (see Supplementary Tables IV and V). We chose not to include HCB in the model due to the high level of correlation with PCBs (see Supplementary Table I) but if we replace PCB153 by HCB, associations between HCB and hormone levels were somewhat weaker to those observed in the single-pollutant approach (data not shown).

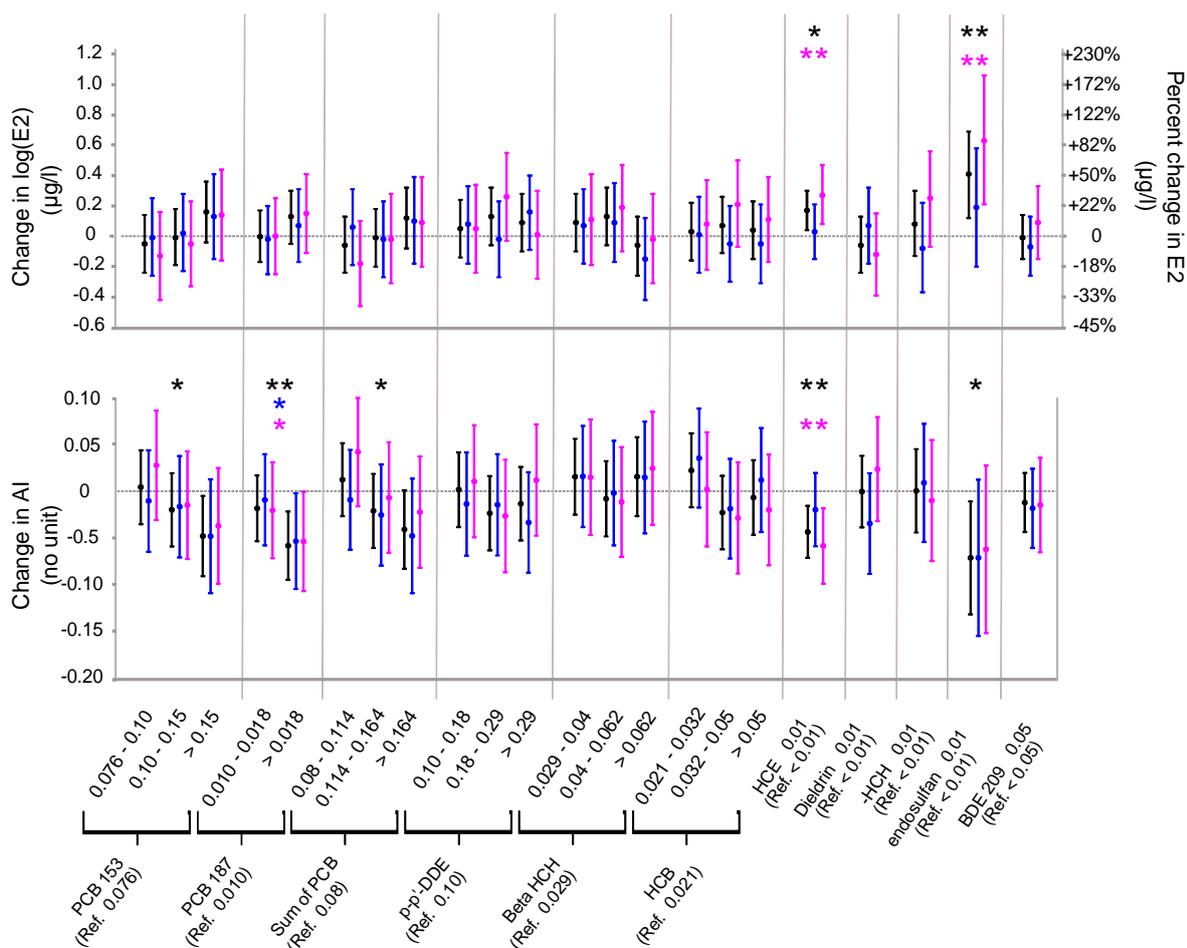


Figure II. Estimate coefficient and 95% confidence interval between prenatal exposures to persistent organic pollutants (in µg/l) and Estradiol (E2) and Aromatase Index (AI). Adjusted for gestational age (continuous), maternal age (continuous), total lipid level (continuous), parity (2 categories), and hemolysis level (3 categories). Both sexes in black (n=282), boys in blue (n=141), and girls in pink (n=141). Levels of exposure were categorized according to the frequency of detection: in quartiles (>75% detected), in terciles (50-75% detected) or detected/undetected (<50% detected). DDE, dichlorodiphenyldichloroethylene; HCB, hexachlorobenzene; HCE, heptachlor epoxide; HCH, hexachlorocyclohexane; PBDE, polybrominated diphenyl ether ; PCB, polychlorinated biphenyl; *p-trend < 0.05, **p-trend < 0.01.

Discussion

The most consistent findings observed were that higher prenatal exposures to several POPs were linked to higher levels of SHBG and lower levels of fT and AI measured in the cord blood. Increases in AMH – measured among male newborns only - were also observed with exposure to PCBs and p,p'-DDE. Most of the associations were observed in both sexes, but some POPs were specifically associated with hormonal levels in one sex, such as PCB187, HCE and α-endosulfan. No association was found with exposure to β-HCH, dieldrin or γ-HCH.

To our knowledge, only one study has explored the associations between prenatal exposure to PCBs (sum of congeners 28, 52, 101, 138, 153, and 180 measured in maternal blood) and sex hormones (T

and E2 measured in cord blood) from the Duisburg cohort in Germany (Cao et al., 2008). Contrary to our results, they observed a reduction of T among girls and a reduction of E2 among boys with similar levels of PCB exposure as that in our study (Cao et al., 2008).

One study evaluated the impact of prenatal exposures to PCB and p,p'-DDE and reproductive hormone levels in 14-year-old boys (Grandjean et al., 2012). They observed that an increase in prenatal PCB and p,p'-DDE exposures was associated with an increase in SHBG levels, a decrease in fT and a suggestive decrease in T. These results are in accordance with ours for PCB exposure but not for p,p'-DDE.

Some studies have evaluated the impact of prenatal exposures to ED compounds other than POPs on the sex hormones of newborns. They have been mainly concerned with prenatal exposure to phthalates, for which animal studies have shown anti-androgenic effects (Fisher, 2004). Main et al. (Main et al., 2006) explored the correlations between six phthalate monoesters measured in breast milk and the reproductive hormone levels of boys at 3 months of age. They observed patterns of modifications in hormone levels that were similar to ours: increasing levels of two phthalate monoesters were associated with increased levels of SHBG (positive correlations) and decreased levels of fT (negative correlations), but no association with T was present (Main et al., 2006). Lin et al. (Lin et al., 2011) also explored the correlations between several phthalate metabolites measured in maternal urine samples (third trimester of pregnancy) and reproductive hormones measured in cord blood. Among girls, they reported negative correlations with fT and the fT:E2 ratio but no correlation with E2. No association was observed among boys (Lin et al., 2011). More recently, a study from the Sapporo cohort in Japan reported a decrease in AI with prenatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalates (Araki et al., 2014).

Compared to other European birth cohorts, the median level of POP exposures in the PELAGIE cohort was similar for PCB153 (PELAGIE=110 ng/L; combined cohorts=140 ng/L) but was among the lowest for p,p'-DDE (PELAGIE=180 ng/L; combined cohorts=528 ng/L) (Govarts et al., 2012). This lower level of exposure to p,p'-DDE could explain the lack of concordance of our results with those observed in the Faroes cohort (Grandjean et al., 2012).

In our analysis, we adjusted for potential confounding factors based on biological considerations and those previously reported in the literature, including gestational age, maternal age, parity and BMI (Troisi et al., 2003; Keelan et al., 2012; Thompson and Lampl, 2013; Hickey et al., 2014). Variations in hormone levels with these selected factors were also observed from our sample. We chose not to adjust for birthweight in our first analysis because it could be on the causal pathway between POP exposures and steroid hormone levels. Finally, we did not take into account other potential

confounding factors such as the type of labor or placental weight because of the large amount of missing data (>50%).

One weakness of our study is that the hormone measurements were performed at birth (cord blood) and may not adequately represent the infant endocrine system because the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis is inhibited at the end of gestation, due to negative feedbacks controlled by placental hormones. After delivery, the HPG axis is and not reactivated after birth until 6 months of age, with a peak of sex steroid concentrations appears at approximately 3 months of age, representing the “mini-puberty” of infancy, and it is a recommended period for hormone measurements (Arbuckle et al., 2008). However, the modifications in hormone levels observed in the cord blood can be interpreted as an alteration of the placental endocrine functions rather than an alteration in the HPG axis of the newborn (Hill et al., 2014).

Despite the rather small sample size, the associations were robust because they were not altered in the sensitivity analysis, but we are aware that multiple testing could be a problem in our study and could lead to false positive discoveries. However, the goal of this study is more to provide clues to be confirmed in further studies rather than make definite conclusion. In this respect, and also because of the complexity of the data structure (i.e., high correlations, composite variables), we made the decision not to control for multiple testing (Goeman and Solari, 2011).

E2 and T were measured with an immunoassay method, but the validity of the measurement could be questionable, particularly for T, because of possible cross-reacting substances (Hollier et al., 2014). The comparison of the cord blood levels of T and E2 reported by several studies have shown lower concentrations of T with mass spectrometry than with an immunoassay, but the E2 levels did not differ dramatically between the two methods (Hollier et al., 2014). The possible measurement error of the T levels could explain the lack of association with POP exposures in our study with T and may influence the associations with fT and AI.

We must acknowledge that the compounds α -endosulfan, HCE, γ -HCH, dieldrin, and BDE209 were rarely detected in our study and that interpretation of observations related to these compounds are only tentative. Circulating hormone levels are regulated by a number of cascade reactions and feedback loops and because of species-, tissues- and timing-specificity of endocrine signaling, it is difficult from our observational study to provide evidence about the mechanistic pathways involved in the observed associations. Nonetheless, the decrease in AI observed with several prenatal POP exposures and the increase in E2 observed among samples with detected values of α -endosulfan and HCE can be interpreted as the result of induction of the aromatase enzyme (in placental or fetal compartment). The variations in SHBG could be secondary to an increase in E2 levels (Rosner, 1990)

or could reflect a direct effect of the compounds on SHBG synthesis by the fetal liver (potentially through the interaction with aryl hydrocarbon receptor) (Borlak et al., 2002; Hammond, 2011). Finally, the increase in AMH levels with prenatal exposures to PCBs and, to a lesser extent, p,p'-DDE, and the decrease in T with BDE209, can be the consequence of an alteration of Sertoli and Leydig cells functions respectively (Josso et al., 1993). All of these mechanistic hypotheses are only suggestive and we cannot exclude that other unmeasured hormones (steroids but also insulin, gonadotropin or thyroid hormones) or binding proteins (albumin, transcortin) could also been involved in the observed associations.

Conclusion

Prenatal exposure to a number of POPs is associated with a disruption of hormone levels in cord blood with sex specificities. These findings may help understanding the pathways involved in disorders of human reproductive health associated with prenatal exposure to POPs. They support the necessity of a follow-up of puberty onset or adult reproductive functions in the PELAGIE cohort.

Acknowledgements

We are grateful to the gynecologists, obstetricians, ultrasonographers, midwives, pediatricians, and families who participated in the study. Thanks to Bernard Jégou and Nathalie Bonvallot for their help.

Author's roles

C.W. contributed to statistical analyses, interpretation of data, and drafted the paper. A.D.L assisted in statistical analyses and interpretation of data. C.Ma. was responsible for hormone measurements. R.G.contributed to the interpretation of data. C.Mo. contributed to the initiation of the cohort study and acquisition of data. E.G. was responsible for pollutant measurements. N.B. contributed to the interpretation of results by evaluating potential biologic mechanisms. C.C. initiated the pollutant measurements and assisted in the paper drafting. S.C. initiated the cohort study, contributed to the interpretation of data and assisted in the paper drafting. All authors have revised the article critically and approved the final version.

Funding

The PELAGIE cohort is funded by Inserm, French Ministry of Health, French Ministry of Labor, InVS, ANR, ANSES, and French Ministry of Ecology.

Conflict of interest

Nothing to declare.

References

- Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Nakajima T, Naito H, Ito S, Sasaki S, Cho K, Ikeno T, Nonomura K, et al. Association between Maternal Exposure to di(2-ethylhexyl) Phthalate and Reproductive Hormone Levels in Fetal Blood: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *PLoS One* 2014;9:e109039.
- Arbuckle TE, Hauser R, Swan SH, Mao CS, Longnecker MP, Main KM, Whyatt RM, Mendola P, Legrand M, Rovet J, et al. Meeting report: measuring endocrine-sensitive endpoints within the first years of life. *Environ Health Perspect* 2008;116:948–951.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341:938–941.
- Bender R, Lange S. Adjusting for multiple testing--when and how? *J Clin Epidemiol* 2001;54:343–349.
- Borlak J, Dangers M, Thum T. Aroclor 1254 modulates gene expression of nuclear transcription factors: implications for albumin gene transcription and protein synthesis in rat hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;181:79–88.
- Cao Y, Winneke G, Wilhelm M, Wittsiepe J, Lemm F, Fürst P, Ranft U, Imöhl M, Kraft M, Oesch-Bartlomowicz B, et al. Environmental exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls reduce levels of gonadal hormones in newborns: results from the Duisburg cohort study. *Int J Hyg Environ Health* 2008;211:30–39.
- Chevrier C, Warembourg C, Gaudreau E, Monfort C, Blanc A Le, Guldner L, Cordier S. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, seafood consumption, and time-to-pregnancy. *Epidemiology* 2013;24:251–260.
- Fisher JS. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 2004;127:305–315.
- Goeman JJ, Solari A. Multiple Testing for Exploratory Research. *Stat Sci* 2011;26:584–597. Institute of Mathematical Statistics.
- Govarts E, Nieuwenhuijsen M, Schoeters G, Ballester F, Bloemen K, Boer M de, Chevrier C, Eggesbø M, Guxens M, Krämer U, et al. Birth weight and prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE): a meta-analysis within 12 European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect* 2012;120:162–170.
- Grandjean P, Bellinger D, Bergman A, Cordier S, Davey-Smith G, Eskenazi B, Gee D, Gray K, Hanson M, Hazel P van den, et al. The faroes statement: human health effects of developmental exposure to chemicals in our environment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:73–75.
- Grandjean P, Grønlund C, Kjær IM, Jensen TK, Sørensen N, Andersson A-M, Juul A, Skakkebaek NE, Budtz-Jørgensen E, Weihe P. Reproductive hormone profile and pubertal development in 14-year-old boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls. *Reprod Toxicol* 2012;34:498–503. Elsevier Inc.
- Hammond GL. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biol Reprod* 2011;85:431–441.
- He Y, Murphy MB, Yu RMK, Lam MHW, Hecker M, Giesy JP, Wu RSS, Lam PKS. Effects of 20 PBDE metabolites on steroidogenesis in the H295R cell line. *Toxicol Lett* 2008;176:230–238.

Hickey M, Hart R, Keelan JA. The relationship between umbilical cord estrogens and perinatal characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:946–952.

Hill M, Pašková A, Kančeva R, Velíková M, Kubátová J, Kancheva L, Adamcová K, Mikešová M, Žižka Z, Koucký M, et al. Steroid profiling in pregnancy: a focus on the human fetus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;139:201–222.

Hollier LP, Keelan JA, Hickey M, Maybery MT, Whitehouse AJO. Measurement of androgen and estrogen concentrations in cord blood: accuracy, biological interpretation, and applications to understanding human behavioral development. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:64.

Jansen HT, Cooke PS, Porcelli J, Liu T-C, Hansen LG. Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: In vitro and in vivo studies. *Reprod Toxicol* 1993;7:237–248.

Josso N, Lamarre I, Picard JY, Berta P, Davies N, Morichon N, Peschanski M, Jeny R. Anti-müllerian hormone in early human development. *Early Hum Dev* 1993;33:91–99.

Keelan JA, Mattes E, Tan H, Dinan A, Newnham JP, Whitehouse AJO, Jacoby P, Hickey M. Androgen concentrations in umbilical cord blood and their association with maternal, fetal and obstetric factors. *PLoS One* 2012;7:e42827.

Kupfer D. Effects of pesticides and related compounds on steroid metabolism and function. *CRC Crit Rev Toxicol* 1975;4:83–124.

Letcher RJ, Holsteijn I van, Drenth HJ, Norstrom RJ, Bergman A, Safe S, Pieters R, Berg M van den. Cytotoxicity and aromatase (CYP19) activity modulation by organochlorines in human placental JEG-3 and JAR choriocarcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;160:10–20.

Lilienthal H, Hack A, Roth-Härer A, Grande SW, Talsness CE. Effects of developmental exposure to 2,2,4,4,5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environ Health Perspect* 2006;114:194–201.

Lin L-C, Wang S-L, Chang Y-C, Huang P-C, Cheng J-T, Su P-H, Liao P-C. Associations between maternal phthalate exposure and cord sex hormones in human infants. *Chemosphere* 2011;83:1192–1199.

Ma R, Sassoon DA. PCBs exert an estrogenic effect through repression of the Wnt7a signaling pathway in the female reproductive tract. *Environ Health Perspect* 2006;114:898–904.

Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, Schmidt IM, Suomi A-M, Virtanen HE, Petersen DVH, et al. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 2006;114:270–276.

McGlynn KA, Guo X, Graubard BI, Brock JW, Klebanoff MA, Longnecker MP. Maternal pregnancy levels of polychlorinated biphenyls and risk of hypospadias and cryptorchidism in male offspring. *Environ Health Perspect* 2009;117:1472–1476.

Meeker JD, Hauser R. Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and male reproduction. *Syst Biol Reprod Med* 2010;56:122–131.

Patterson DG, Isaacs SG, Alexander LR, Turner WE, Hampton L, Bernert JT, Needham LL. Determination of specific polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in blood and adipose tissue by isotope dilution-high-resolution mass spectrometry. *IARC Sci Publ* 1991;299–342.

Rosner W. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: Recent advances. *Endocr Rev* 1990;11:80–91.

Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1990;1:43–46.

Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 1994;102:380–383.

Stoker TE, Cooper RL, Lambright CS, Wilson VS, Furr J, Gray LE. In vivo and in vitro anti-androgenic effects of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207:78–88.

Thompson AL, Lampl M. Prenatal and postnatal energetic conditions and sex steroids levels across the first year of life. *Am J Hum Biol* 2013;25:643–654.

Toppari J, Juul A. Trends in puberty timing in humans and environmental modifiers. *Mol Cell Endocrinol* 2010;324:39–44.

Troisi R, Potischman N, Roberts J, Siiteri P, Daftary A, Sims C, Hoover RN. Associations of maternal and umbilical cord hormone concentrations with maternal, gestational and neonatal factors (United States). *Cancer Causes Control* 2003;14:347–355.

WHO, UNEP. State of the science of endocrine disrupting chemicals. 2012; World Health Organization.

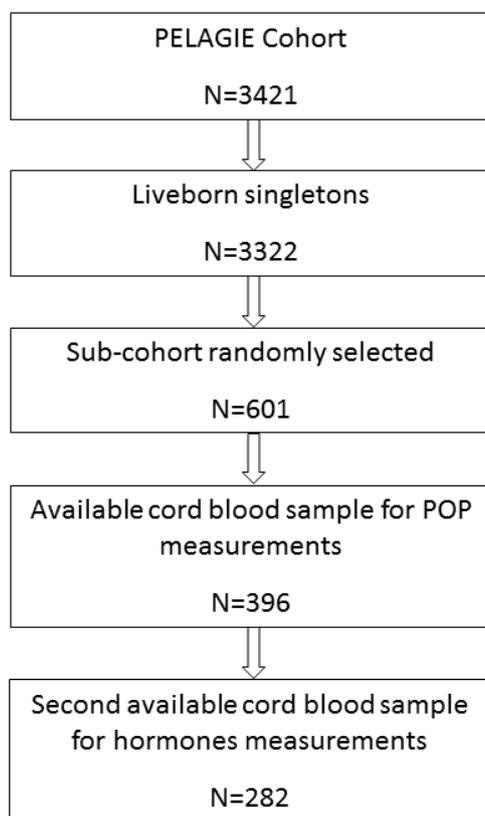
Wójtowicz AK, Milewicz T, Gregoraszcuk EŁ. DDT and its metabolite DDE alter steroid hormone secretion in human term placental explants by regulation of aromatase activity. *Toxicol Lett* 2007;173:24–30.

Wolff MS, Camann D, Gammon M, Stellman SD. Proposed PCB congener groupings for epidemiological studies. *Environ Health Perspect* 1997;105:13–14.

Woodhouse AJ, Cooke GM. Suppression of aromatase activity in vitro by PCBs 28 and 105 and Aroclor 1221. *Toxicol Lett* 2004;152:91–100.

Supplementary data

Supplementary Figure I. Flow diagram of the study sample. PELAGIE cohort, Brittany, France, 2002-2006



Supplementary Section I. Chemical analyses of POP in cord blood serum samples

Plasma samples (2 mL) were extracted on a Strata-X 100 m (100 mg/ 3 mL; Phenomenex; Torrance, California, USA) solid phase extraction (SPE) column. A mixture of ¹³C-labeled internal standards, plasma sample, formic acid and deionized water was slowly applied to the column. After drying the column with pressurized nitrogen, the sample was extracted using 3 mL of dichloromethane. The extracts (taken up in 0.5 mL hexane) were cleaned up through a column containing activated florisil (1 g) and the compounds were eluted using a mixture of hexane/dichloromethane (3:1) and dichloromethane. The solvent was evaporated, taken up in 20 µL of hexane and analyzed for PCBs and organochlorine pesticides on an Agilent 6890 Network gas chromatograph (GC) coupled with an Agilent 5973 Network mass spectrometer (MS) (Agilent Technologies; Mississauga, Ontario, Canada). The GC was fitted with an Agilent 60 m DB-XXL column (0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). We added 125 µL of hexane to the fraction analyzed for the PCBs and organochlorine pesticides to measure all PBDEs including PBDE209 on an Agilent 6890 Network GC coupled with an Agilent 5975 Inert XL MS. The GC was fitted with an Agilent 15 m DB-XXL column (0.25 mm i.d., 0.1 µm film thickness). For both analytical instruments, the carrier gas was helium, and all injections were in splitless mode. The MS was operated in single ion monitoring (SIM), using negative chemical ionization (NCI) with methane (99.97 %) as the reagent gas.

Supplementary Table I. Spearman correlation coefficients between persistent organic pollutants.

	PCB 153	PCB 187	Sum of PCB ^a	p-p'- DDE	Beta HCH	Hexachlo- robenzene	Heptachlor epoxide	Dieldrin	Gamma HCH	Alpha endosulfan	PBDE 209
PCB 153	1	0.89**	0.97**	0.52**	0.63**	0.70**	0.32**	0.22*	0.06	-0.01	0.12
PCB 187		1	0.84**	0.48**	0.55**	0.54**	0.23**	0.19*	0.03	-0.01	0.11
Sum of PCB ^a			1	0.53**	0.66**	0.73**	0.36**	0.24**	0.09	-0.04	0.11
p-p'-DDE				1	0.45**	0.46**	0.18*	0.11*	-0.03	-0.09	0.03
Beta HCH					1	0.67**	0.43**	0.26**	-0.04	0.005	0.13*
Hexachlorobenzene						1	0.43**	0.33**	0.21*	-0.13*	0.03
Heptachlor epoxide							1	0.37**	0.10	-0.02	0.13*
Dieldrin								1	-0.005	-0.04	-0.01
Gamma HCH									1	0.05	0.04
Alpha endosulfan										1	0.17*
PBDE 209											1

HCH, hexachlorocyclohexane; PBDE 209, polybrominated diphenyl ether; PCB, polychlorinated biphenyl; p-p'-DDE, p-p'-dichlorodiphenyldichloroethylene

** p<0.0001

* p<0.05

^a Sum of congeners 118, 138, 170. Concentrations below the limit of detection (LOD) for PCB118 (n=6) and PCB170 (n=14) were replaced by LOD/2

Supplementary Table II. Associations between prenatal exposures to persistent organic pollutants and Testosterone (T), sex hormone binding globulin (SHBG), free Testosterone (fT), and anti-Müllerian hormone (AMH).

	1/T			Ln(SHBG)			Ln(fT)			AMH		
	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (nmol/l)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a
PCB153												
Overall			P-trend=0.38			P-trend=0.002			P-trend=0.05			
≤ 0.076 µg/L	73	2.45	0	73	28.31	0	73	30.08	0	-	-	-
0.076 – 0.10 µg/L	63	2.35	0.02 (-0.04; 0.07)	63	29.37	0.04 (-0.07; 0.15)	63	27.14	-0.10 (-0.29; 0.09)	-	-	-
0.10 – 0.15 µg/L	75	2.25	0.04 (-0.02; 0.09)	79	31.96	0.12 (0.01; 0.23)	79	25.52	-0.16 (-0.35; 0.02)	-	-	-
> 0.15 µg/L	65	2.33	0.02 (-0.04; 0.08)	62	33.88	0.18 (0.06; 0.30)	64	24.85	-0.19 (-0.40; 0.01)	-	-	-
Boys			P-trend=0.59			P-trend=0.06			P-trend=0.17			P-trend=0.11
≤ 0.076 µg/L	39	2.63	0	40	29.79	0	39	33.74	0	40	32.71	0
0.076 – 0.10 µg/L	32	2.60	0.005 (-0.07; 0.08)	32	31.80	0.07 (-0.10; 0.23)	32	30.24	-0.11 (-0.35; 0.13)	32	31.02	-1.69 (-8.75; 5.36)
0.10 – 0.15 µg/L	39	2.46	0.03 (-0.05; 0.10)	40	33.83	0.13 (-0.03; 0.28)	40	29.33	-0.14 (-0.37; 0.09)	40	32.73	0.02 (-7.01; 7.06)
> 0.15 µg/L	29	2.53	0.02 (-0.07; 0.10)	28	34.90	0.16 (-0.02; 0.34)	28	28.20	-0.18 (-0.44; 0.09)	29	39.84	7.1 (-0.75; 14.99)
Girls			P-trend=0.49			P-trend=0.01			P-trend=0.16			
≤ 0.076 µg/L	34	2.37	0	33	27.07	0	34	28.34	0	-	-	-
0.076 – 0.10 µg/L	31	2.21	0.03 (-0.06; 0.12)	31	27.21	0.005 (-0.15; 0.16)	31	25.47	-0.11 (-0.41; 0.20)	-	-	-
0.10 – 0.15 µg/L	36	2.16	0.04 (-0.05; 0.13)	39	30.25	0.11 (-0.05; 0.27)	39	23.90	-0.17 (-0.47; 0.13)	-	-	-
> 0.15 µg/L	36	2.21	0.03 (-0.07; 0.13)	34	33.34	0.21 (0.04; 0.38)	36	22.73	-0.22 (-0.54; 0.10)	-	-	-
P-interaction Sex			p=0.97			p=0.82			p=0.98			
PCB187												
Overall			P-trend=0.17			P-trend=0.02			P-trend=0.02			
≤ 0.01 µg/L	134	2.44	0	135	29.34	0	135	28.96	0	-	-	-
0.01 – 0.018 µg/L	71	2.38	0.01 (-0.04; 0.06)	72	30.44	0.04 (-0.06; 0.13)	72	28.05	-0.03 (-0.20; 0.13)	-	-	-
> 0.018 µg/L	71	2.23	0.04 (-0.02; 0.09)	70	33.47	0.13 (0.03; 0.24)	72	23.49	-0.21 (-0.38; -0.03)	-	-	-
Boys			P-trend=0.30			P-trend=0.23			P-trend=0.11			P-trend=0.04
≤ 0.01 µg/L	72	2.66	0	74	31.45	0	73	32.46	0	74	30.96	0
0.01 – 0.018 µg/L	34	2.63	0.004 (-0.06; 0.07)	34	31.02	-0.01 (-0.16; 0.13)	34	31.95	-0.02 (-0.23; 0.19)	34	36.44	5.48 (-0.95; 11.90)
> 0.018 µg/L	33	2.41	0.04 (-0.03; 0.11)	32	34.86	0.10 (-0.05; 0.25)	32	26.75	-0.19 (-0.42; 0.03)	33	37.76	6.80 (0.07; 13.53)
Girls			P-trend=0.36			P-trend=0.02			P-trend=0.11			
≤ 0.01 µg/L	62	2.33	0	61	27.28	0	62	27.23	0	-	-	-
0.01 – 0.018 µg/L	37	2.27	0.01 (-0.07; 0.09)	38	30.04	0.10 (-0.04; 0.23)	38	25.77	-0.05 (-0.32; 0.21)	-	-	-
> 0.018 µg/L	38	2.13	0.04 (-0.04; 0.12)	38	32.34	0.17 (0.02; 0.32)	40	21.56	-0.23 (-0.51; 0.04)	-	-	-
P-interaction Sex			p=0.97			p=0.40			p=0.96			

	1/T				Ln(SHBG)				Ln(FT)				AMH	
	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (nmol/l)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a		
Sum of PCB (118, 138,170)														
Overall			P-trend=0.19			P-trend=0.003			P-trend=0.04					
≤0.08 µg/L	70	2.44	0	71	28.13	0	70	29.72	0	40	30.99	0		
0.08 – 0.114 µg/L	70	2.46	-0.003 (-0.06; 0.05)	69	30.55	0.08 (-0.03; 0.19)	70	27.99	-0.06 (-0.25; 0.12)	35	32.34	1.35 (-5.58; 8.28)		
0.114 – 0.164 µg/L	68	2.26	0.03 (-0.03; 0.09)	72	31.17	0.10 (-0.01; 0.21)	72	26.12	-0.13 (-0.32; 0.06)	38	33.08	2.09 (-4.91; 9.09)		
>0.164 µg/L	68	2.26	0.03 (-0.03; 0.09)	65	33.91	0.19 (0.07; 0.30)	67	24.45	-0.20 (-0.40; 0.01)	28	40.38	9.39 (1.51; 17.27)		
Boys			P-trend=0.23			P-trend=0.04			P-trend=0.05			P-trend=0.03		
≤0.08 µg/L	39	2.65	0	40	29.24	0	39	34.72	0	40	30.99	0		
0.08 – 0.114 µg/L	35	2.82	0.02 (-0.05; 0.08)	35	33.04	0.12 (-0.03; 0.28)	35	31.78	-0.09 (-0.32; 0.14)	35	32.34	1.35 (-5.58; 8.28)		
0.114 – 0.164 µg/L	37	2.27	0.06 (-0.01; 0.14)	38	33.44	0.13 (-0.02; 0.29)	38	28.02	-0.21 (-0.44; 0.02)	38	33.08	2.09 (-4.91; 9.09)		
>0.164 µg/L	28	2.51	0.02 (-0.06; 0.10)	27	35.20	0.19 (0.01; 0.36)	27	27.90	-0.22 (-0.48; 0.04)	28	40.38	9.39 (1.51; 17.27)		
Girls			P-trend=0.45			P-trend=0.03			P-trend=0.30					
≤0.08 µg/L	31	2.31	0	31	27.23	0	31	26.41	0	-	-	-		
0.08 – 0.114 µg/L	35	2.26	0.01 (-0.08; 0.10)	34	28.50	0.05 (-0.11; 0.20)	35	25.85	-0.02 (-0.32; 0.28)	-	-	-		
0.114 – 0.164 µg/L	31	2.34	-0.01 (-0.10; 0.09)	34	29.10	0.07 (-0.10; 0.23)	34	26.07	-0.01 (-0.32; 0.30)	-	-	-		
>0.164 µg/L	40	2.11	0.04 (-0.05; 0.13)	38	32.85	0.19 (0.02; 0.35)	40	22.23	-0.17 (-0.49; 0.14)	-	-	-		
P-interaction Sex			p=0.23			p=0.86			p=0.83					
p-p'-DDE														
Overall			P-trend=0.37			P-trend=0.19			P-trend=0.35					
≤0.10 µg/L	71	2.25	0	73	29.68	0	73	27.82	0	-	-	-		
0.10 – 0.18 µg/L	67	2.38	-0.03 (-0.08; 0.03)	67	30.27	0.02 (-0.09; 0.13)	67	27.38	-0.02 (-0.20; 0.17)	-	-	-		
0.18 – 0.29 µg/L	68	2.39	-0.03 (-0.08; 0.03)	69	31.69	0.07 (-0.04; 0.18)	69	26.95	-0.03 (-0.22; 0.16)	-	-	-		
>0.29 µg/L	70	2.39	-0.03 (-0.08; 0.03)	68	31.61	0.06 (-0.05; 0.18)	70	25.45	-0.09 (-0.28; 0.10)	-	-	-		
Boys			P-trend=0.68			P-trend=0.49			P-trend=0.87			P-trend=0.06		
≤0.10 µg/L	39	2.52	0	41	31.57	0	40	30.40	0	41	31.51	0		
0.10 – 0.18 µg/L	31	2.69	-0.02 (-0.10; 0.05)	31	31.75	0.01 (-0.16; 0.17)	31	32.08	0.05 (-0.18; 0.29)	31	31.60	0.09 (-7.11; 7.29)		
0.18 – 0.29 µg/L	33	2.40	0.02 (-0.05; 0.10)	33	32.71	0.04 (-0.12; 0.19)	33	28.12	-0.08 (-0.31; 0.15)	33	36.76	5.25 (-1.78; 12.28)		
>0.29 µg/L	36	2.72	-0.03 (-0.10; 0.04)	35	33.17	0.05 (-0.11; 0.21)	35	32.25	0.06 (-0.17; 0.29)	36	37.16	5.65 (-1.33; 12.63)		
Girls			P-trend=0.47			P-trend=0.22			P-trend=0.15					
≤0.10 µg/L	32	2.11	0	32	27.83	0	33	27.96	0	-	-	-		
0.10 – 0.18 µg/L	36	2.20	-0.02 (-0.11; 0.07)	36	29.89	0.04 (-0.13; 0.20)	36	24.67	-0.13 (-0.43; 0.18)	-	-	-		
0.18 – 0.29 µg/L	35	2.45	-0.07 (-0.16; 0.03)	36	30.75	0.10 (-0.07; 0.27)	36	27.30	-0.02 (-0.33; 0.28)	-	-	-		
>0.29 µg/L	34	2.22	-0.02 (-0.11; 0.07)	33	30.43	0.09 (-0.08; 0.26)	35	21.30	-0.27 (-0.58; 0.04)	-	-	-		
P-interaction Sex			p=0.27			p=0.87			p=0.42					

	1/T				Ln(SHBG)				Ln(FT)				AMH		
	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a	P-trend	N	LSmeans (nmol/l)	Beta (95% CI) ^b	P-trend	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^b	P-trend	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a
Beta HCH															
Overall															
≤ 0.029 µg/L	68	2.24	P-trend=0.74 0		69	29.55	P-trend=0.14 0		68	26.04	P-trend=0.24 0		-	-	-
0.029 – 0.04 µg/L	68	2.55	-0.05 (-0.11; 0.003)		70	30.48	0.03 (-0.08; 0.14)		70	30.45	0.16 (-0.03; 0.34)		-	-	-
0.04 – 0.062 µg/L	72	2.46	-0.04 (-0.10; 0.02)		73	30.62	0.04 (-0.08; 0.15)		73	28.59	0.09 (-0.09; 0.28)		-	-	-
> 0.062 µg/L	68	2.21	0.005 (-0.06; 0.06)		65	32.43	0.09 (-0.03; 0.21)		68	23.59	-0.10 (-0.30; 0.10)		-	-	-
Boys															
≤ 0.029 µg/L	36	2.66	P-trend=0.18 0		37	31.86	P-trend=0.41 0		36	30.97	P-trend=0.18 0		37	32.86	P-trend=0.17 0
0.029 – 0.04 µg/L	37	2.77	-0.02 (-0.09; 0.06)		38	30.94	-0.03 (-0.19; 0.13)		38	33.91	0.09 (-0.14; 0.32)		38	32.04	-0.82 (-7.85; 6.21)
0.04 – 0.062 µg/L	35	2.80	-0.02 (-0.09; 0.06)		35	34.82	0.09 (-0.07; 0.25)		35	30.24	-0.02 (-0.26; 0.21)		35	34.98	2.12 (-5.18; 9.42)
> 0.062 µg/L	31	2.27	0.06 (-0.02; 0.14)		30	32.83	0.03 (-0.14; 0.20)		30	26.88	-0.14 (-0.40; 0.11)		31	37.57	4.71 (-3.03; 12.45)
Girls															
≤ 0.029 µg/L	32	2.00	P-trend=0.48 0		32	27.81	P-trend=0.23 0		32	22.57	P-trend=0.69 0		-	-	-
0.029 – 0.04 µg/L	31	2.49	-0.10 (-0.19; -0.01)		32	30.84	0.10 (-0.06; 0.27)		32	28.13	0.22 (-0.09; 0.53)		-	-	-
0.04 – 0.062 µg/L	37	2.33	-0.07 (-0.16; 0.02)		38	27.74	-0.002 (-0.16; 0.16)		38	28.46	0.23 (-0.07; 0.53)		-	-	-
> 0.062 µg/L	37	2.21	-0.05 (-0.14; 0.04)		35	32.34	0.15 (-0.02; 0.32)		38	21.47	-0.05 (-0.36; 0.26)		-	-	-
P-interaction Sex			p=0.30				0.12				p=0.51				
Hexachlorobenzene															
Overall															
≤ 0.021 µg/L	71	2.36	P-trend=0.63 0		71	28.92	P-trend=0.04 0		71	28.91	P-trend=0.04 0		-	-	-
0.021 – 0.032 µg/L	65	2.44	-0.01 (-0.07; 0.04)		67	30.59	0.06 (-0.05; 0.17)		67	29.67	0.03 (-0.16; 0.21)		-	-	-
0.033 – 0.05 µg/L	69	2.24	0.02 (-0.04; 0.08)		71	31.17	0.07 (-0.03; 0.18)		71	25.80	-0.11 (-0.30; 0.07)		-	-	-
> 0.05 µg/L	71	2.34	0.003 (-0.05; 0.06)		68	32.57	0.12 (0.01; 0.23)		70	24.59	-0.16 (-0.35; 0.03)		-	-	-
Boys															
≤ 0.021 µg/L	41	2.64	P-trend=0.30 0		42	31.31	P-trend=0.09 0		41	31.66	P-trend=0.06 0		42	33.84	P-trend=0.91 0
0.021 – 0.032 µg/L	33	2.72	-0.01 (-0.08; 0.06)		34	29.96	-0.04 (-0.20; 0.11)		34	35.66	0.12 (-0.10; 0.34)		34	34.65	0.81 (-6.21; 7.83)
0.033 – 0.05 µg/L	33	2.29	0.06 (-0.01; 0.13)		33	32.76	0.05 (-0.11; 0.20)		33	26.99	-0.16 (-0.38; 0.07)		33	34.89	1.05 (-6.09; 8.18)
> 0.05 µg/L	32	2.52	0.02 (-0.06; 0.10)		31	35.88	0.14 (-0.03; 0.30)		31	26.73	-0.17 (-0.41; 0.07)		32	34.04	0.20 (-7.21; 7.61)
Girls															
≤ 0.021 µg/L	30	2.19	P-trend=0.86 0		29	26.63	P-trend=0.25 0		30	27.55	P-trend=0.31 0		-	-	-
0.021 – 0.032 µg/L	32	2.26	-0.02 (-0.11; 0.08)		33	31.53	0.17 (0.003; 0.33)		33	24.67	-0.11 (-0.42; 0.20)		-	-	-
0.033 – 0.05 µg/L	36	2.28	-0.02 (-0.11; 0.07)		38	30.06	0.12 (-0.04; 0.28)		38	25.49	-0.08 (-0.39; 0.23)		-	-	-
> 0.05 µg/L	39	2.23	-0.01 (-0.10; 0.08)		37	30.20	0.13 (-0.04; 0.29)		39	23.09	-0.18 (-0.48; 0.13)		-	-	-
P-interaction Sex			p=0.54				p=0.10				p=0.39				

		1/T			Ln(SHBG)			Ln(FT)			AMH	
	N	LSmeans ($\mu\text{g/l}$)	Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (nmol/l)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans ($\mu\text{g/l}$)	Beta (95% CI) ^a
Heptachlorepoixide												
Overall			p=0.85			p=0.03			p=0.32			-
Undetected	137	2.34	0	138	29.49	0	138	27.83	0	-	-	-
Detected	138	2.36	-0.004 (-0.04; 0.04)	138	32.23	0.09 (0.01; 0.17)	140	26.00	-0.07 (-0.20; 0.07)	-	-	-
Boys			p=0.25			p=0.005			p=0.02			p=0.85
Undetected	74	2.67	0	75	29.72	0	74	34.00	0	75	34.05	0
Detected	65	2.46	0.03 (-0.02; 0.08)	65	34.96	0.16 (0.05; 0.27)	65	27.94	-0.20 (-0.36; -0.03)	66	34.55	0.50 (-4.68; 5.67)
Girls			p=0.22			p=0.81			p=0.68			-
Undetected	63	2.16	0	63	29.38	0	64	24.33	0	-	-	-
Detected	73	2.35	-0.04 (-0.10; 0.02)	73	29.80	0.01 (-0.10; 0.13)	75	25.44	0.04 (-0.17; 0.26)	-	-	-
P-interaction Sex			p=0.15			p=0.05			p=0.05			-
Dieldrin												
Overall			p=0.90			p=0.78			p=0.43			-
Undetected	231	2.35	0	233	30.94	0	234	27.19	0	-	-	-
Detected	44	2.33	0.003 (-0.05; 0.06)	43	30.48	-0.01 (-0.12; 0.09)	44	25.30	-0.07 (-0.25; 0.11)	-	-	-
Boys			p=0.74			p=0.21			p=0.64			p=0.25
Undetected	118	2.55	0	119	32.75	0	118	30.15	0	120	33.75	0
Detected	21	2.63	-0.01 (-0.09; 0.06)	21	29.62	-0.10 (-0.26; 0.06)	21	31.85	0.05 (-0.18; 0.29)	21	37.92	4.17 (-2.96; 11.30)
Girls			p=0.64			p=0.30			p=0.21			-
Undetected	113	2.27	0	114	29.03	0	116	25.99	0	-	-	-
Detected	23	2.17	0.02 (-0.07; 0.11)	22	31.52	0.08 (-0.07; 0.24)	23	21.59	-0.19 (-0.47; 0.10)	-	-	-
P-interaction Sex			p=0.54			p=0.13			p=0.14			-
Gamma HCH												
Overall			p=0.91			p=0.47			p=0.51			-
Undetected	243	2.34	0	243	30.99	0	245	26.63	0	-	-	-
Detected	32	2.37	-0.004 (-0.07; 0.06)	33	29.62	-0.05 (-0.17; 0.08)	33	28.58	0.07 (-0.14; 0.28)	-	-	-
Boys			p=0.53			p=0.43			p=0.84			p=0.20
Undetected	123	2.57	0	124	32.52	0	123	30.47	0	125	34.66	0
Detected	16	2.40	0.03 (-0.06; 0.11)	16	30.19	-0.07 (-0.26; 0.11)	16	29.64	-0.03 (-0.30; 0.24)	16	29.19	-5.47 (-13.77; 2.84)
Girls			p=0.47			p=0.92			p=0.35			-
Undetected	120	2.23	0	119	29.62	0	122	24.60	0	-	-	-
Detected	16	2.43	-0.04 (-0.14; 0.06)	17	29.36	-0.01 (-0.19; 0.17)	17	28.80	0.16 (-0.18; 0.49)	-	-	-
P-interaction Sex			p=0.58			p=0.60			p=0.51			-

	1/T			Ln(SHBG)			Ln(FT)			AMH		
	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (nmol/l)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a
Alpha endosulfan												
Overall			p=0.40			p=0.04			p=0.87			
Undetected	259	2.32	0	260	30.28	0	262	26.89	0	-	-	-
Detected	16	2.55	-0.04 (-0.12; 0.05)	16	36.08	0.18 (0.01; 0.34)	16	26.24	-0.02 (-0.31; 0.26)	-	-	-
Boys			p=0.90			p=0.21			p=0.25			p=0.31
Undetected	131	2.56	0	132	31.97	0	131	30.87	0	133	34.66	0
Detected	8	2.52	0.01 (-0.11; 0.12)	8	37.34	0.16 (-0.09; 0.40)	8	25.06	-0.21 (-0.57; 0.15)	8	28.96	-5.69 (-16.82; 5.44)
Girls			p=0.18			p=0.10			p=0.38			
Undetected	128	2.20	0	128	28.88	0	131	24.43	0	-	-	-
Detected	8	2.76	-0.09 (-0.23; 0.04)	8	35.50	0.21 (-0.04; 0.46)	8	30.13	0.21 (-0.26; 0.68)	-	-	-
P-interaction Sex			p=0.44			p=0.90			p=0.39			
PBDE209												
Overall			p=0.12			p=0.43			p=0.12			
Undetected	171	2.41	0	174	30.88	0	174	28.10	0	-	-	-
Detected	83	2.22	0.04 (-0.01; 0.08)	83	32.00	0.04 (-0.05; 0.12)	84	25.12	-0.11 (-0.25; 0.03)	-	-	-
Boys			p=0.03			p=0.93			p=0.15			p=0.96
Undetected	81	2.74	0	82	32.03	0	81	31.88	0	83	32.60	0
Detected	50	2.35	0.06 (0.005; 0.12)	50	31.85	-0.01 (-0.13; 0.12)	50	27.99	-0.13 (-0.31; 0.05)	50	32.47	-0.13 (-5.60; 5.33)
Girls			p=0.89			p=0.15			p=0.38			
Undetected	90	2.25	0	92	30.26	0	93	25.34	0	-	-	-
Detected	33	2.22	0.01 (-0.07; 0.08)	33	33.41	0.10 (-0.04; 0.24)	34	22.73	-0.11 (-0.35; 0.14)	-	-	-
P-interaction Sex			p=0.32			p=0.29			p=0.94			

CI, confidence interval; HCH, hexachlorocyclohexane; LSmeans, least-squares means; PBDE, polybrominated diphenyl ether; PCB, polychlorinated biphenyl; p-p'-DDE, p-p'-dichlorodiphenyldichloroethylene

^a Adjusted for gestational age (continuous), maternal age (continuous), total lipid level (continuous), parity (2 categories), hemolysis level (3 categories)

^b Adjusted for gestational age (continuous), maternal age (continuous), total lipid level (continuous), parity (2 categories), hemolysis level (3 categories) and body mass index (2 categories)

Supplementary Table III. Associations between prenatal exposures to persistent organic pollutants and Estradiol (E2) and Aromatase Index (AI).

	Ln(Estradiol)			AI		
	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^a
PCB153						
Overall			P-trend=0.15			P-trend=0.02
≤ 0.076 µg/L	73	8.77	0	73	0.33	0
0.076 – 0.10 µg/L	63	8.31	-0.05 (-0.24; 0.14)	63	0.34	0.004 (-0.04; 0.04)
0.10 – 0.15 µg/L	78	8.72	-0.01 (-0.19; 0.18)	78	0.31	-0.02 (-0.06; 0.02)
> 0.15 µg/L	66	10.29	0.16 (-0.04; 0.36)	64	0.28	-0.05 (-0.09; -0.01)
Boys			P-trend=0.38			P-trend=0.14
≤ 0.076 µg/L	39	10.14	0	39	0.33	0
0.076 – 0.10 µg/L	32	10.07	-0.01 (-0.26; 0.25)	32	0.32	-0.01 (-0.06; 0.04)
0.10 – 0.15 µg/L	40	10.38	0.02 (-0.23; 0.28)	40	0.31	-0.02 (-0.07; 0.04)
> 0.15 µg/L	29	11.59	0.13 (-0.15; 0.41)	29	0.28	-0.05 (-0.11; 0.01)
Girls			P-trend=0.36			P-trend=0.17
≤ 0.076 µg/L	34	7.88	0	34	0.34	0
0.076 – 0.10 µg/L	31	6.92	-0.13 (-0.42; 0.16)	31	0.36	0.03 (-0.03; 0.09)
0.10 – 0.15 µg/L	38	7.51	-0.05 (-0.33; 0.23)	38	0.32	-0.01 (-0.07; 0.04)
> 0.15 µg/L	37	9.07	0.14 (-0.16; 0.44)	35	0.30	-0.04 (-0.10; 0.02)
P-interaction Sex			p=0.87			p=0.64
PCB187						
Overall			P-trend=0.18			P-trend=0.002
≤ 0.01 µg/L	135	8.69	0	135	0.34	0
0.01 – 0.018 µg/L	71	8.66	-0.003 (-0.17; 0.17)	70	0.32	-0.02 (-0.05; 0.02)
> 0.018 µg/L	74	9.86	0.13 (-0.05; 0.30)	73	0.28	-0.06 (-0.09; -0.02)
Boys			P-trend=0.62			P-trend=0.05
≤ 0.01 µg/L	73	10.39	0	73	0.33	0
0.01 – 0.018 µg/L	34	10.14	-0.02 (-0.25; 0.20)	34	0.32	-0.01 (-0.06; 0.04)
> 0.018 µg/L	33	11.14	0.07 (-0.17; 0.31)	33	0.27	-0.05 (-0.10; -0.002)
Girls			P-trend=0.28			P-trend=0.05
≤ 0.01 µg/L	62	7.51	0	62	0.35	0
0.01 – 0.018 µg/L	37	7.51	0.001 (-0.25; 0.25)	36	0.33	-0.02 (-0.07; 0.03)
> 0.018 µg/L	41	8.70	0.15 (-0.11; 0.41)	40	0.30	-0.05 (-0.11; -0.001)
P-interaction Sex			p=0.96			p=0.72
Sum of PCB (118, 138,170)						
Overall			P-trend=0.22			P-trend=0.03
≤ 0.08 µg/L	70	8.89	0	70	0.33	0
0.08 – 0.114 µg/L	70	8.41	-0.06 (-0.24; 0.13)	69	0.34	0.01 (-0.03; 0.05)
0.114 – 0.164 µg/L	71	8.78	-0.01 (-0.20; 0.18)	71	0.31	-0.02 (-0.06; 0.02)
> 0.164 µg/L	69	10.06	0.12 (-0.08; 0.32)	68	0.29	-0.04 (-0.08; 0.001)
Boys			P-trend=0.64			P-trend=0.11
≤ 0.08 µg/L	39	10.17	0	39	0.33	0
0.08 – 0.114 µg/L	35	10.80	0.06 (-0.19; 0.31)	35	0.32	-0.01 (-0.06; 0.04)
0.114 – 0.164 µg/L	38	10.00	-0.02 (-0.27; 0.23)	38	0.30	-0.03 (-0.08; 0.03)
> 0.164 µg/L	28	11.30	0.10 (-0.18; 0.39)	28	0.28	-0.05 (-0.11; 0.01)
Girls			P-trend=0.33			P-trend=0.23
≤ 0.08 µg/L	31	8.05	0	31	0.33	0
0.08 – 0.114 µg/L	35	6.71	-0.18 (-0.46; 0.10)	34	0.37	0.04 (-0.02; 0.10)
0.114 – 0.164 µg/L	33	7.92	-0.02 (-0.31; 0.28)	33	0.32	-0.01 (-0.07; 0.05)
> 0.164 µg/L	41	8.84	0.09 (-0.20; 0.39)	40	0.30	-0.02 (-0.08; 0.04)
P-interaction Sex			p=0.46			p=0.45
p-p'-DDE						
Overall			P-trend=0.26			P-trend=0.31
≤ 0.10 µg/L	73	8.53	0	72	0.32	0
0.10 – 0.18 µg/L	67	8.97	0.05 (-0.14; 0.24)	67	0.32	0.002 (-0.04; 0.04)
0.18 – 0.29 µg/L	70	9.69	0.13 (-0.06; 0.32)	68	0.30	-0.02 (-0.06; 0.02)
> 0.29 µg/L	70	9.32	0.09 (-0.10; 0.28)	71	0.31	-0.01 (-0.05; 0.03)
Boys			P-trend=0.35			P-trend=0.24
≤ 0.10 µg/L	41	10.10	0	40	0.32	0
0.10 – 0.18 µg/L	31	10.93	0.08 (-0.18; 0.33)	31	0.31	-0.01 (-0.07; 0.04)
0.18 – 0.29 µg/L	33	9.87	-0.02 (-0.27; 0.23)	33	0.31	-0.01 (-0.07; 0.04)
> 0.29 µg/L	35	11.81	0.16 (-0.09; 0.40)	36	0.29	-0.03 (-0.09; 0.02)
P-interaction Sex			P-trend=0.64			P-trend=0.99

	N	LSmeans (µg/l)	Ln(Estradiol)		AI	
			Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^a
Girls						
≤ 0.10 µg/L	32	7.33	0	32	0.33	0
0.10 – 0.18 µg/L	36	7.71	0.05 (-0.24 ; 0.34)	36	0.34	0.01 (-0.05 ; 0.07)
0.18 – 0.29 µg/L	37	9.48	0.26 (-0.03 ; 0.55)	35	0.30	-0.03 (-0.09 ; 0.03)
> 0.29 µg/L	35	7.43	0.01 (-0.28 ; 0.30)	35	0.34	0.01 (-0.05 ; 0.07)
P-interaction Sex			p=0.14			p=0.44
Beta HCH						
Overall			P-trend=0.64			P-trend=0.76
≤ 0.029 µg/L	68	8.80	0	68	0.31	0
0.029 – 0.04 µg/L	69	9.60	0.09 (-0.10 ; 0.28)	68	0.32	0.02 (-0.03 ; 0.06)
0.04 – 0.062 µg/L	74	10.05	0.13 (-0.06 ; 0.32)	73	0.30	-0.01 (-0.05 ; 0.03)
> 0.062 µg/L	69	8.25	-0.06 (-0.26 ; 0.13)	69	0.32	0.02 (-0.03 ; 0.06)
Boys			P-trend=0.36			P-trend=0.82
≤ 0.029 µg/L	36	10.63	0	36	0.30	0
0.029 – 0.04 µg/L	38	11.35	0.07 (-0.18 ; 0.31)	38	0.31	0.02 (-0.03 ; 0.07)
0.04 – 0.062 µg/L	35	11.64	0.09 (-0.17 ; 0.35)	35	0.29	-0.002 (-0.06 ; 0.05)
> 0.062 µg/L	31	9.14	-0.15 (-0.42 ; 0.12)	31	0.31	0.01 (-0.05 ; 0.07)
Girls			P-trend=0.99			P-trend=0.61
≤ 0.029 µg/L	32	7.43	0	32	0.32	0
0.029 – 0.04 µg/L	31	8.28	0.11 (-0.19 ; 0.41)	30	0.33	0.01 (-0.05 ; 0.08)
0.04 – 0.062 µg/L	39	8.97	0.19 (-0.10 ; 0.47)	38	0.31	-0.01 (-0.07 ; 0.05)
> 0.062 µg/L	38	7.31	-0.02 (-0.31 ; 0.28)	38	0.34	0.02 (-0.04 ; 0.09)
P-interaction Sex			p=0.94			p=0.76
Hexachlorobenzene						
Overall			P-trend=0.58			P-trend=0.32
≤ 0.021 µg/L	71	8.79	0	70	0.32	0
0.021 – 0.032 µg/L	66	9.07	0.03 (-0.16 ; 0.22)	67	0.34	0.02 (-0.02 ; 0.06)
0.033 – 0.05 µg/L	71	9.46	0.07 (-0.11 ; 0.26)	71	0.29	-0.02 (-0.06 ; 0.02)
> 0.05 µg/L	72	9.16	0.04 (-0.15 ; 0.23)	70	0.31	-0.01 (-0.05 ; 0.03)
Boys			P-trend=0.64			P-trend=0.91
≤ 0.021 µg/L	41	10.75	0	41	0.29	0
0.021 – 0.032 µg/L	34	10.84	0.01 (-0.24 ; 0.26)	34	0.33	0.04 (-0.02 ; 0.09)
0.033 – 0.05 µg/L	33	10.26	-0.05 (-0.30 ; 0.20)	33	0.28	-0.02 (-0.07 ; 0.03)
> 0.05 µg/L	32	10.22	-0.05 (-0.31 ; 0.21)	32	0.31	0.01 (-0.04 ; 0.07)
Girls			P-trend=0.33			P-trend=0.33
≤ 0.021 µg/L	30	7.18	0	29	0.34	0
0.021 – 0.032 µg/L	32	7.75	0.08 (-0.22 ; 0.37)	33	0.34	0.002 (-0.06 ; 0.06)
0.033 – 0.05 µg/L	38	8.89	0.21 (-0.07 ; 0.50)	38	0.31	-0.03 (-0.09 ; 0.03)
> 0.05 µg/L	40	8.00	0.11 (-0.17 ; 0.39)	38	0.32	-0.02 (-0.08 ; 0.04)
P-interaction Sex			p=0.69			p=0.78
Heptachlorepoxyde						
Overall			p=0.01			p=0.002
Undetected	138	8.39	0	137	0.34	0
Detected	141	9.95	0.17 (0.04 ; 0.30)	140	0.29	-0.04 (-0.07 ; -0.02)
Boys			p=0.75			p=0.32
Undetected	74	10.41	0	74	0.32	0
Detected	66	10.72	0.03 (-0.15 ; 0.21)	66	0.30	-0.02 (-0.06 ; 0.02)
Girls			p=0.007			p=0.005
Undetected	64	6.98	0	63	0.36	0
Detected	75	9.16	0.27 (0.08 ; 0.47)	74	0.30	-0.06 (-0.10 ; -0.02)
P-interaction Sex			p=0.08			p=0.19
Dieldrin						
Overall			p=0.55			p=0.99
Undetected	234	9.21	0	232	0.31	0
Detected	45	8.71	-0.06 (-0.24 ; 0.13)	45	0.31	-0.0003 (-0.04 ; 0.04)
Boys			p=0.60			p=0.21
Undetected	119	10.47	0	119	0.31	0
Detected	21	11.19	0.07 (-0.18 ; 0.32)	21	0.28	-0.03 (-0.09 ; 0.02)
Girls			p=0.37			p=0.40
Undetected	115	8.21	0	113	0.32	0
Detected	24	7.26	-0.12 (-0.39 ; 0.15)	24	0.34	0.02 (-0.03 ; 0.08)
P-interaction Sex			p=0.29			p=0.16

	N	LSmeans (µg/l)	Ln(Estradiol)		AI	
			Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^a
Gamma HCH						
Overall			p=0.43			p=0.99
Undetected	246	9.04	0		244	0.31
Detected	33	9.84	0.08 (-0.13; 0.30)		33	0.31
Boys			p=0.60			p=0.78
Undetected	124	10.62	0		124	0.30
Detected	16	9.83	-0.08 (-0.37; 0.22)		16	0.31
Girls			p=0.12			p=0.76
Undetected	122	7.73	0		120	0.33
Detected	17	9.89	0.25 (-0.07; 0.56)		17	0.32
P-interaction Sex			p=0.25			p=0.78
Alpha endosulfan						
Overall			p=0.005			p=0.02
Undetected	263	8.74	0		261	0.32
Detected	16	13.13	0.41 (0.12; 0.69)		16	0.25
Boys			p=0.34			p=0.09
Undetected	132	10.44	0		132	0.31
Detected	8	12.60	0.19 (-0.20; 0.58)		8	0.24
Girls			p=0.004			p=0.17
Undetected	131	7.42	0		129	0.33
Detected	8	13.99	0.63 (0.21; 1.06)		8	0.27
P-interaction Sex			p=0.37			p=0.58
PBDE209						
Overall			p=0.93			p=0.45
Undetected	174	9.23	0		174	0.31
Detected	84	9.17	-0.01 (-0.15; 0.14)		83	0.30
Boys			p=0.51			p=0.40
Undetected	82	10.86	0		82	0.31
Detected	50	10.17	-0.07 (-0.26; 0.13)		50	0.29
Girls			p=0.46			p=0.57
Undetected	92	7.89	0		92	0.33
Detected	34	8.65	0.09 (-0.15; 0.33)		33	0.31
P-interaction Sex			p=0.56			p=0.64

CI, confidence interval; HCH, hexachlorocyclohexane; LSmeans, least-squares means; PBDE, polybrominated diphenyl ether; PCB, polychlorinated biphenyl; p-p'-DDE, p-p'-dichlorodiphenyldichloroethylene

^a Adjusted for gestational age (continuous), maternal age (continuous), total lipid level (continuous), parity (2 categories), hemolysis level (3 categories)

Supplementary Table IV. Associations between prenatal exposures to POP, with a multi-pollutant approach, and Testosterone (T), SHBG, free Testosterone (fT) and AMH.

	1/T				Ln(SHBG)				Ln(fT)				AMH	
	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (nmol/l)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a		
PCB153														
Overall			p-trend=0.31			p-trend=0.007			p-trend=0.08					
≤ 0.076 µg/L	70	2.47	0	70	31.34	0	70	28.12	0		29.35	-	-	
0.076 – 0.10 µg/L	61	2.42	0.01 (-0.05; 0.07)	61	33.07	0.05 (-0.06; 0.17)	61	25.67	-0.09 (-0.28; 0.10)		27.12	-	-	
0.10 – 0.15 µg/L	71	2.32	0.03 (-0.03; 0.09)	75	35.44	0.12 (0.01; 0.24)	75	24.53	-0.14 (-0.33; 0.05)		29.54	-	-	
> 0.15 µg/L	51	2.28	0.03 (-0.04; 0.11)	50	37.56	0.18 (0.04; 0.32)	51	23.12	-0.20 (-0.43; 0.03)		35.88	-	-	
Boys			p-trend=0.98			p-trend=0.41			p-trend=0.63			p-trend=0.22		
≤ 0.076 µg/L	37	2.51	0	38	34.28	0	37	27.87	0		29.35	0		
0.076 – 0.10 µg/L	31	2.63	-0.02 (-0.10; 0.06)	31	35.77	0.04 (-0.12; 0.21)	31	27.04	-0.03 (-0.27; 0.21)		27.12	-2.23 (-9.57; 5.11)		
0.10 – 0.15 µg/L	39	2.48	0.003 (-0.08; 0.09)	40	36.13	0.05 (-0.12; 0.23)	40	27.08	-0.03 (-0.28; 0.22)		29.54	0.19 (-7.65; 8.04)		
> 0.15 µg/L	24	2.53	-0.003 (-0.10; 0.09)	23	37.37	0.09 (-0.12; 0.29)	23	25.74	-0.08 (-0.38; 0.22)		35.88	6.53 (-2.70; 15.77)		
Girls			p-trend=0.21			p-trend=0.006			p-trend=0.10					
≤ 0.076 µg/L	33	2.59	0	32	30.72	0	33	27.99	0		-	-		
0.076 – 0.10 µg/L	30	2.39	0.03 (-0.06; 0.12)	30	32.17	0.05 (-0.12; 0.21)	30	24.43	-0.14 (-0.44; 0.16)		-	-		
0.10 – 0.15 µg/L	32	2.40	0.03 (-0.06; 0.13)	35	35.40	0.14 (-0.02; 0.31)	35	23.96	-0.16 (-0.46; 0.15)		-	-		
> 0.15 µg/L	27	2.15	0.08 (-0.04; 0.20)	27	40.67	0.28 (0.08; 0.48)	28	20.23	-0.32 (-0.70; 0.05)		-	-		
Heptachlorepoixide														
Overall			p=0.58			p=0.18			p=0.74					
Undetected	131	2.34	0	132	33.23	0	132	25.61	0		-	-		
Detected	122	2.41	-0.01 (-0.06; 0.03)	124	35.34	0.06 (-0.03; 0.15)	125	24.99	-0.02 (-0.17; 0.12)		-	-		
Boys			p=0.40			p=0.01			p=0.04			p=0.69		
Undetected	70	2.63	0	71	32.81	0	70	29.81	0		31.09	0		
Detected	61	2.45	0.03 (-0.04; 0.09)	61	39.21	0.18 (0.04; 0.31)	61	24.31	-0.20 (-0.40; -0.01)		29.96	-1.23 (-7.39; 4.94)		
Girls			p=0.16			p=0.57			p=0.42					
Undetected	61	2.23	0	61	35.17	0	62	22.86	0		-	-		
Detected	61	2.52	-0.05 (-0.12; 0.02)	63	33.92	-0.04 (-0.16; 0.09)	64	25.19	0.10 (-0.14; 0.33)		-	-		
Alpha endosulfan														
Overall			p=0.57			p=0.02			p=0.41					
Undetected	238	2.30	0	241	30.80	0	242	26.89	0		-	-		
Detected	15	2.45	-0.03 (-0.12; 0.07)	15	38.13	0.21 (0.04; 0.39)	15	23.80	-0.12 (-0.41; 0.17)		-	-		
Boys			p=0.97			p=0.04			p=0.14			p=0.37		
Undetected	123	2.53	0	124	31.42	0	123	30.91	0		33.13	0		
Detected	8	2.54	-0.002 (-0.12; 0.12)	8	40.95	0.27 (0.01; 0.52)	8	23.45	-0.28 (-0.65; 0.09)		27.81	-5.31 (-16.94; 6.32)		
Girls			p=0.49			p=0.09			p=0.97					
Undetected	115	2.23	0	117	30.81	0	119	23.89	0		-	-		
Detected	7	2.53	-0.05 (-0.20; 0.10)	7	38.72	0.23 (-0.04; 0.50)	7	24.10	0.01 (-0.49; 0.50)		-	-		

	1/T			Ln(SHBG)			Ln(FT)			AMH		
	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (nmol/l)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^b	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a
PBDE209												
Overall												
Undetected	170	2.48	p=0.11 0	173	33.98	p=0.70 0	173	26.59	p=0.17 0	-	-	-
Detected	83	2.27	0.04 (-0.01 ; 0.08)	83	34.57	0.02 (-0.07 ; 0.10)	84	24.07	-0.10 (-0.24 ; 0.04)	-	-	-
Boys			p=0.05			p=0.46			p=0.32			p=0.81
Undetected	81	2.75	0	82	36.71	0	81	28.17	0	83	30.13	0
Detected	50	2.36	0.06 (0.001 ; 0.12)	50	35.05	-0.05 (-0.17 ; 0.08)	50	25.73	-0.09 (-0.27 ; 0.09)	50	30.82	0.69 (-4.93 ; 6.31)
Girls			p=0.98			p=0.33			p=0.53			
Undetected	89	2.37	0	91	33.41	0	92	24.96	0	-	-	-
Detected	33	2.37	0.001 (-0.08 ; 0.08)	33	35.71	0.07 (-0.07 ; 0.20)	34	23.07	-0.08 (-0.33 ; 0.17)	-	-	-

CI, confidence interval; LSmeans, least-squares means; PBDE, polybrominated diphenyl ether; PCB, polychlorinated biphenyl

^a Adjusted for co-exposures, gestational age (continuous), maternal age (continuous), total lipid level (continuous), parity (2 categories), hemolysis level (3 categories)

^b Adjusted for co-exposures, gestational age (continuous), maternal age (continuous), total lipid level (continuous), parity (2 categories), hemolysis level (3 categories) and body mass index (2 categories)

Supplementary Table V. Associations between prenatal exposures to POP, with a multi-pollutant approach, and Estradiol (E2) and Aromatase Index (AI).

	Ln(Estradiol)			AI		
	N	LSmeans (µg/l)	Beta (95% CI) ^a	N	LSmeans (no unit)	Beta (95% CI) ^a
PCB153						
Overall			p-trend=0.75			p-trend=0.33
≤ 0.076 µg/L	70	10.67	0	70	0.29	0
0.076 – 0.10 µg/L	61	10.49	-0.02 (-0.21 ; 0.17)	61	0.29	0.002 (-0.04 ; 0.04)
0.10 – 0.15 µg/L	74	10.69	0.001 (-0.19 ; 0.20)	74	0.27	-0.02 (-0.06 ; 0.02)
> 0.15 µg/L	52	11.14	0.04 (-0.19 ; 0.28)	51	0.27	-0.02 (-0.07 ; 0.03)
Boys			p-trend=0.23			p-trend=0.13
≤ 0.076 µg/L	37	10.89	0	37	0.29	0
0.076 – 0.10 µg/L	31	11.66	0.07 (-0.19 ; 0.33)	31	0.27	-0.01 (-0.07 ; 0.04)
0.10 – 0.15 µg/L	40	11.91	0.09 (-0.19 ; 0.37)	40	0.26	-0.02 (-0.08 ; 0.04)
> 0.15 µg/L	24	13.45	0.21 (-0.12 ; 0.54)	24	0.23	-0.06 (-0.13 ; 0.01)
Girls			p-trend=0.47			p-trend=0.87
≤ 0.076 µg/L	33	11.11	0	33	0.29	0
0.076 – 0.10 µg/L	30	9.89	-0.12 (-0.40 ; 0.17)	30	0.31	0.02 (-0.04 ; 0.08)
0.10 – 0.15 µg/L	34	10.77	-0.03 (-0.32 ; 0.26)	34	0.27	-0.02 (-0.08 ; 0.04)
> 0.15 µg/L	28	9.44	-0.16 (-0.51 ; 0.19)	27	0.31	0.02 (-0.05 ; 0.10)
Heptachlorepoxyde						
Overall			p=0.02			p=0.02
Undetected	132	9.85	0	131	0.30	0
Detected	125	11.72	0.17 (0.02 ; 0.32)	125	0.26	-0.04 (-0.07 ; -0.01)
Boys			p=0.91			p=0.62
Undetected	70	11.87	0	70	0.27	0
Detected	62	12.01	0.01 (-0.21 ; 0.23)	62	0.26	-0.01 (-0.06 ; 0.04)
Girls			p=0.009			p=0.01
Undetected	62	8.85	0	61	0.32	0
Detected	63	11.95	0.30 (0.08 ; 0.52)	63	0.26	-0.06 (-0.11 ; -0.02)
Alpha endosulfan						
Overall			p=0.01			p=0.01
Undetected	242	8.85	0	241	0.32	0
Detected	15	13.05	0.39 (0.09 ; 0.69)	15	0.24	-0.08 (-0.14 ; -0.02)
Boys			p=0.20			p=0.07
Undetected	124	10.43	0	124	0.30	0
Detected	8	13.67	0.27 (-0.14 ; 0.68)	8	0.22	-0.08 (-0.17 ; 0.01)
Girls			p=0.02			p=0.16
Undetected	118	7.85	0	117	0.33	0
Detected	7	13.47	0.54 (0.07 ; 1.01)	7	0.26	-0.07 (-0.17 ; 0.03)
PBDE209						
Overall			p=0.68			p=0.67
Undetected	173	10.91	0	173	0.28	0
Detected	84	10.58	-0.03 (-0.18 ; 0.12)	83	0.27	-0.01 (-0.04 ; 0.02)
Boys			p=0.38			p=0.62
Undetected	82	12.48	0	82	0.27	0
Detected	50	11.42	-0.09 (-0.29 ; 0.11)	50	0.26	-0.01 (-0.05 ; 0.03)
Girls			p=0.44			p=0.58
Undetected	91	9.81	0	91	0.30	0
Detected	34	10.78	0.09 (-0.14 ; 0.33)	33	0.29	-0.01 (-0.06 ; 0.04)

CI, confidence interval; LSmeans, least-squares means; PBDE, polybrominated diphenyl ether; PCB, polychlorinated biphenyl

^a Adjusted for co-exposures, gestational age (continuous), maternal age (continuous), total lipid level (continuous), parity (2 categories), hemolysis level (3 categories)

3.2. ARTICLE 2 : EXPOSITIONS PRENATALES AUX ETHERS DE GLYCOL ET RISQUES DE CRYPTORCHIDIES ET D'HYPOSPADES

3.2.1. Résumé en français

Introduction

Les éthers de glycol (EG) sont des solvants oxygénés utilisés dans de nombreux produits à usages professionnel ou domestique. Plusieurs d'entre eux, et plus particulièrement leurs métabolites, sont connus pour être toxique pour la reproduction et le développement. Des études épidémiologiques suggèrent également des effets sur les fonctions de reproduction de l'homme mais peu se sont intéressées au risque de malformation de l'appareil génital en cas d'expositions prénatales.

Objectif

Cette étude a pour objectif d'évaluer le risque de cryptorchidie et d'hypospade en association avec l'exposition prénatale aux éthers de glycol mesurée à partir de biomarqueurs urinaires.

Méthodes

Une étude cas-témoins nichée dans deux cohortes de naissances françaises (n=5300 femmes enceintes) a été mise en œuvre. Les concentrations de cinq métabolites d'EG ont été mesurées dans les urines maternelles collectées pendant la grossesse (<28 semaines d'aménorrhée). A la naissance, 70 cas de malformations génitales ont été identifiés, dont 28 ont été confirmés au cours du suivi des enfants jusqu'à 2 ans. Chaque cas a été apparié, sur la région d'inclusion et l'âge gestationnel au moment du prélèvement d'urines, à trois témoins. Les odds ratio (OR) et leurs intervalles de confiance (IC) ont été estimés à partir de régressions logistiques conditionnelles multivariées auxquelles une pénalisation de Firth a été appliquée pour réduire le biais lié aux petits échantillons.

Résultats

Le pourcentage de détection des métabolites d'EG varient de 8% pour l'acide éthoxyacétique (EAA) à 93% pour l'acide phénoxyacétique (PhAA). Parmi les malformations confirmées, une augmentation significative du risque d'hypospade est observée en association avec les concentrations d'acide méthoxyacétique (MAA) supérieures à 0.15mg/l en comparaison aux concentrations inférieures à 0.05mg/l (OR [IC 95%]=7.5 [1.1, 121.5]). La détection d'acide 2-méthoxypropionique (2-MPA) semble également associée à une augmentation du risque d'hypospade (OR [IC 95%]=4.5 [1.0, 28.1]) et la détection d'EAA à une augmentation du risque des deux malformations combinées (OR [IC 95%]=6.5

[1.0, 68.8]). Les associations obtenues en incluant l'ensemble des cas identifiés à la naissance sont plus atténuées et une diminution du risque de malformations génitales est observée avec la détection d'acide éthoxyéthoxyacétique.

Conclusion

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature animale. Une augmentation du risque de malformations génitales, en particulier d'hypospade, est observée en association avec les trois métabolites d'EG connus pour leur toxicité testiculaire et leurs effets tératogènes chez l'animal. Nous ne pouvons cependant pas exclure que ces associations résultent de co-expositions à d'autres substances chimiques miscibles aux EG. Des études permettant l'identification des sources d'expositions aux EG précurseurs de MAA, EEA et 2-MPA (en tant que métabolites minoritaires) sont nécessaires afin d'envisager la mise en place de recommandations permettant de réduire l'exposition des femmes enceintes.

3.2.2. *Prenatal exposure to glycol ethers and cryptorchidism and hypospadias:
a nested case-control study*

Statut : En révision dans *Human Reproduction*

C. Warembourg (1,2)*, J. Botton (3,4), N. Lelong (5), F. Rouget (1,2,6), B. Khoshnood (5), F. Le Gléau (7), C. Monfort (1,2), L. Labat (8), F. Pierre (9), B. Heude (3), R. Slama (10), L. Multigner (1,2), M.A. Charles (3), S. Cordier (1), R. Garlantézec (1,2,11)

1) Inserm UMR 1085 Irset, Epidemiological Research on Environment, Reproduction and Development, F-35000 Rennes, France

2) Université de Rennes I, F-35043 Rennes, France

3) Inserm, Paris Descartes 5 University, UMR 1153, Research Center in Epidemiology and Biostatistics Paris Sorbonne Cité, Team: Early Origin of the Child's Health and Development, F-94807 Villejuif Cedex, France

4) Faculty of Pharmacy, University Paris Saclay, F-92296 Châtenay-Malabry, France

5) Inserm UMR 1153, Obstetrical, Perinatal and Pediatric Epidemiology Research Team (Epopé), Center for Epidemiology and Statistics Sorbonne Paris Cité, DHU Risks in pregnancy, Paris Descartes University, F-75014 Paris, France

6) Brittany Registry of congenital malformations, Department of Pediatrics, Rennes university Hospital, F-35000 Rennes, France

7) LABOCEA Laboratory, F-29280 Plouzané, France

8) Assistance publique-hopitaux de Paris, Groupe Cochin, Laboratoire Pharmacologie Toxicologie, F-75004 Paris, France

9) Centre Hospitalo-Universitaire de Poitiers, Service de Gynécologie Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Université de Poitiers, UFR Médecine – Pharmacie, CS 90577, F-86021 Poitiers Cedex, France

10) Team of environmental epidemiology, Inserm, CNRS, Univ. Grenoble-Alpes, IAB – Institute of Advanced Biosciences joint research center (U1209), F-38700 Grenoble, France.

11) Centre Hospitalo-Universitaire de Rennes, Service de Santé Publique et d'Epidémiologie, F-35033 Rennes, France

*Correspondence address: charline.warembourg@gmail.com

Abstract

Study question: Is prenatal exposure to glycol ethers (GE) associated with the occurrence of hypospadias and cryptorchidism?

Summary answer: Three of the five GE metabolites studied were associated with an increased risk of male genital anomalies.

What is known already: Glycol ethers (GE) are oxygenated solvents frequently found in occupational and consumer products. Some of them are well-known testicular toxicants but few human studies have considered the possible effect of GE exposure on the risk of congenital anomalies of the male genital tract, and those studies rarely used exposure biomarkers.

Study design, size, duration: We conducted a case-control study nested in two joint mother–child cohorts (5303 pregnant women). Cases of cryptorchidism (n=50) and hypospadias (n=21) were identified at birth, and confirmation was sought during a 2-year follow-up period. Each case was matched to three randomly selected controls within the cohorts for region of inclusion and gestational age at urine sampling.

Participants/materials, setting, methods: Concentrations of five GE acidic metabolites were measured in spot maternal urine samples collected during pregnancy. Odds ratios (OR) were estimated with multivariate conditional logistic regressions including a Firth's penalization.

Main results and the role of chance: Detection rates of urinary GE metabolites ranged from 8% for ethoxyacetic acid (EAA) to 93% for phenoxyacetic acid (PhAA). Among confirmed cases, a significantly higher risk of hypospadias was associated with a urinary concentration of methoxyacetic acid (MAA) greater than 0.15 mg/l compared to less than 0.05 mg/l (OR [95% confidence interval, CI]=7.5[1.1, 121.5]). A higher risk of male genital anomalies was weakly associated with detection of 2-methoxypropionic acid (2-MPA) (OR [95% CI]=4.5[1.0, 28.1]) and a higher risk of hypospadias with detection of EAA (OR[95% CI]=6.5[1.0, 68.8]). Results obtained with all cases identified at birth were weaker. We observed no evidence of increased risk for cryptorchidism alone.

Limitations, reasons for caution: Exposure to GE was assessed prospectively, but from spot urine samples, which may have resulted in exposure misclassification. GE may be correlated with other chemicals, including other solvents, that could explain the observed associations.

Wider implications of the findings: The three GE metabolites associated with an increased risk of male genital anomalies were those known for their developmental and testicular toxicity from animal studies. In view of the toxicological plausibility of our results, this study raises concern about the potential developmental toxicity of GE on the male genital system.

Study funding/competing interest(s): This study was funded by the French Agency for Medicines and Health Products Safety (ANSM).

Key words: Cryptorchidism; Hypospadias; Maternal exposure; Glycol Ether; Solvents

Introduction

Cryptorchidism and hypospadias are congenital anomalies of the male genitalia, the first characterized by unilateral or bilateral undescended testis and the second by a misplaced urethral opening. The incidence of these genital anomalies may have increased during the 20th century in some geographic areas (Skakkebaek et al., 2016). The involvement of prenatal exposure to chemicals including some endocrine disruptors (e.g. some pesticides or phthalates) in the occurrence of these birth defects has been suggested (Skakkebaek, 2002; Sharpe, 2003). These anomalies are, however, multifactorial and associated with known genetic factors (Skakkebaek et al., 2016).

Organic solvents are chemicals widely present in occupational and consumer products. Prenatal exposure to organic solvents has been associated with both spontaneous abortion and congenital anomalies (especially oral cleft and central nervous system anomalies) (Lindbohm, 1995; McMartin et al., 1998). Only a few studies have assessed the risk of male genital anomalies at birth in relation to prenatal exposure to organic solvents (García and Fletcher, 1998; Pierik et al., 2004; Garlantézec et al., 2009; Vaktskjold et al., 2011; Cordier et al., 2012). They all reported higher risks of male genital anomalies associated with maternal solvent exposure, although this risk was statistically significant in only one study (Garlantézec et al., 2009). Most published studies have not focused on specific chemical classes of solvents and used indirect exposure assessment methods, such as job exposure matrices (Pierik et al., 2004; Garlantézec et al., 2009; Vaktskjold et al., 2011).

Solvents of specific concern are glycol ethers (GE), a family of oxygenated solvents that includes more than 80 ethylene and propylene glycols. They are low volatiles and highly miscible in water and oil. These properties and their low level of acute toxicity has favoured their inclusion in numerous products used occupationally and domestically, including water-based paints, cleaning products, cosmetics, and even some pharmaceutical products. Several GE are wellknown to cause developmental and testicular toxicity (Inserm, 1999, 2006; Multigner et al., 2005). The toxic effects of GE are thought to be mediated by their alkoxy acid metabolites, which are excreted in urine and can be used as exposure biomarkers (Table I) (Johanson, 1996).

Only one previous prospective study has used alkoxy acid metabolites as a specific urinary biomarker to evaluate associations between prenatal exposure to GE and the risk of male genital anomalies (Cordier et al., 2012): it showed an association close to significance with detectable level of ethoxyacetic acid (EAA). Due to its small sample size, however, it had limited statistical power and did not allow subtypes of genital anomalies (i.e., cryptorchidism and hypospadias) to be studied.

Our aim was to evaluate the associations between prenatal exposure to GE assessed by urinary biomarkers and male genital anomalies by combining data from the earlier study (Cordier et al., 2012) with results from another French cohort, to increase statistical power and limit the random sampling fluctuation.

Methods

Study population

We conducted a nested case-control study within the EDEN (Etude des Déterminants pré et postnatals du développement et de la santé de l'ENfant) and PELAGIE (Perturbateurs Endocriniens: Étude Longitudinale sur les Anomalies de la Grossesse, l'Infertilité et l'Enfance) French mother-child cohorts, both established to study pre- and post-natal determinants of child health and development (Garlantézec et al., 2009; Heude et al., 2015). In the EDEN cohort, 2002 pregnant women were enrolled before the end of 24 weeks of gestation (WG) at two university hospitals, one located in central France (Poitiers) and the other in eastern France (Nancy), from April 2003 to March 2006. The PELAGIE cohort enrolled 3421 pregnant women in three districts of Brittany, in western France, from April 2002 to February 2006, before the end of 19 WG. Women completed a questionnaire about their socio-demographic characteristics, occupation, and lifestyle and provided a urinary sample (first morning void requested, 90% obtained) at inclusion in the PELAGIE cohort and between 24 and 28 WG for the EDEN cohort. Most women (96% for EDEN and 99% for PELAGIE) were followed up through delivery. Trained medical staff collected data about the health of the women and their babies. Data according to both cohorts are provided in the Supplemental file including, prevalence of male genital anomalies (see Supplemental Table I), maternal and newborn characteristics (see Supplemental Table II), and levels of exposure (see Supplemental Table III).

Assessment of male genital anomalies

Staff paediatricians of the maternity wards completed forms reporting the results of the routine clinical examination for congenital anomalies among the live births, paying specific attention to male genital anomalies. A first step was to consider all cases identified at birth of cryptorchidism, defined by the absence of one or both testes in a scrotal position (palpated or not), and hypospadias, in anterior (glanular or subcoronal), middle (ventral surface), or posterior (penoscrotal, scrotal, or perineal) locations. In a second step, we used postnatal data to define the confirmed cases: cryptorchidism for which the teste were still undescended at 1 year of age or that required orchiopexy, and hypospadias confirmed by a medical consultation or requiring surgery (see Supplemental Material). Among 5303 newborns in the two cohorts, 70 (1.3%) boys had a male genital anomaly (i.e., cryptorchidism or hypospadias) identified at birth and 29 of these were subsequently confirmed with postnatal data. The confirmed cases in the PELAGIE cohort (n=12) are those included in the previously published study (Cordier et al., 2012).

Nested case-control design

Chemical analyses of the urinary samples were carried out with a nested case-control design. Each case of male genital anomalies was randomly matched to three male controls without congenital anomalies, by region of inclusion (Poitiers, Nancy, and Brittany) and gestational age at urinary sampling (in gestational weeks). Because the urine for one control was unusable, the study population included 70 cases and 209 controls.

Exposure assessment

Chemical analyses were performed at the Toxicology and Genopathy Laboratory at the Lille University Hospital for the PELAGIE samples and at the LABOCEA (Laboratoire public Conseil, Expertise et Analyse en Bretagne) for EDEN samples; both laboratories followed the same method (Labat et al., 2008). GE metabolites (i.e. alkoxy acids) were analysed by gas chromatography-mass spectrometry. This method allowed the simultaneous measurement of eight alkoxy acids of the main GE in use in France at the time of urine collection (Table I) (Afsset, 2008). The method is linear ($r^2 = 0.99$) from 0.05 to 2.0 mg/l for all the alkoxy acids and yields coefficients of variation $<10\%$ at 0.10 mg/L with a limit of detection (LD) of 0.05 mg/l. After a duplicate analysis of 29 PELAGIE urine samples in both laboratories, we retained only five of the eight metabolites for the pooled analysis — those with good concordance between laboratories for quantification ($>70\%$): methoxyacetic acid (MAA), ethoxyacetic acid (EAA), ethoxyethoxyacetic acid (EEAA), phenoxyacetic acid (PhAA), and 2-methoxypropionic acid (2-MPA).

Statistical analyses

Levels of exposure were treated in categories according to their detection rate: metabolites detected in less than 50% of the samples were categorized in two classes ($<LD$; $\geq LD$), those detected in half to two thirds of the samples into three classes ($<LD$; from LD to median level among detected values; \geq median level among detected values), and those detected in more than two thirds of the samples in concentration tertiles.

Male genital anomalies were studied first as a whole (i.e. both cryptorchidism and hypospadias) and then distinguishing cryptorchidism and hypospadias; finally, we restricted analyses to anomalies confirmed during follow-up. Because of the small sample size, we used exact conditional logistic regressions for univariate analyses and Firth's penalization applied to the multivariate conditional logistic regressions to calculate adjusted odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI), estimated from profile likelihoods (Firth, 1993; Greenland et al., 2000). These methods tend to reduce the small-sample bias (which generally leads to overestimating the true value) encountered with maximum likelihood methods in cases with small samples and sparse data (Greenland et al., 2000).

Table I. Products that contain GE in France 2000-2006* and their main metabolites (Sources: AFSSET 2008).

	GE ^a	Metabolites
Paints, varnishes, inks	PGME	2-MPA^b
	EGBE	BAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	DEGEE	EEAA, EAA
	TEGEE	EEAA, EAA
	EGnPE	PAA
Biocides	PGME	2-MPA^b
	EGBE	BAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	DEGEE	EEAA, EAA
	EGPhE	PhAA
Cleaning agents	DEGEE	EEAA, EAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	EGBE	BAA
	PGME	2-MPA^b
	DEGME	MEAA, MAA
	TEGME	MEAA, MAA
	TEGDME	MAA
Cosmetics	EGPhE	PhAA
	EGBE	BAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	DEGEE	EEAA, EAA
Drugs	EGDME	MAA
	DEGDME	MAA
	DEGEE	EEAA, EAA
	EGPhE	PhAA
	EGDME	MAA
	DEGDME	MAA

Bold text corresponds to metabolites included in the present study.

DEGBE, diethylene glycol butylether; DEGDME, diethylene glycol dimethyl ether; DEGEE, diethylene glycol ethylether; DEGME, diethylene glycol methylether; EGBE, ethylene glycol butylether; EGDME, ethylene glycol dimethyl ether; EGNPE, ethylene glycol n-propylether; EGPhE, ethylene glycol phenylether; PGME, propylene glycol methylether; TEGDME, triethylene glycol dimethylether; TEGEE, triethylene glycol ethylether; TEGME, triethylene glycol methylether. 2-MPA, 2-methoxypropionic acid; BAA, 2-butoxyacetic acid; EAA, ethoxyacetic acid; EEAA, ethoxyethoxyacetic acid; MAA, methoxyacetic acid; MEAA, methoxyethoxyacetic acid; PAA, n-propoxyacetic acid; PhAA, phenoxyacetic acid;

*Ethylene glycol methylether (EGME) and ethylene glycol ethylether (EGEE), mainly metabolized in MAA and EAA respectively, have been banned in France before the initiation of the cohorts. EGDME and DEGDME have been regulated in 2004.

^a GEs are presented for products by most to least frequently used.

^b Metabolite derived from minor β isomer of PGME.

The following covariates were tested as potential risk factors for male genital anomalies: preterm birth (<37 vs ≥37 weeks of gestation), maternal age (<25; 25-35; ≥35 years), maternal pre-pregnancy body mass index (BMI; continuous coding), educational level (from none through completion of high school; post-secondary), smoking status (no; yes) and alcohol consumption (no; yes) at the beginning of pregnancy, folic acid supplementation (no; yes), and maternal gestational or pre-existing diabetes (no; yes). In addition, sampling and storage conditions were tested for their association with GE metabolites, including creatinine level (continuous), storage duration at -20° (PELAGIE) or -80°C (EDEN) (continuous), transportation time before freezing (0, 1 or at least 2 days), and the day of the week (Monday to Sunday) and time of sampling (<7; 7-8; 8-10; >10 am). Multivariate models were adjusted for 1) covariates associated with the risk of male genital anomalies at an exact P-value <0.20 and 2) sampling conditions associated with GE metabolites at P<0.20.

Statistical analyses were performed with SAS software (SAS® Institute Inc. 9.3) and, for conditional logistic regressions with Firth's penalized likelihood logistic regression, with LogXact (LogXact® 10 Cytel Inc.).

Ethics

All women provided informed consent for the collection of data and biological samples, and the appropriate ethics committee approved the establishment of each cohort.

Results

Description of the study population

Table II presents the characteristics of mothers included in the study according to case status. Women were 30 years old on average, mainly of French origin, and had a high educational level. We observed no significant differences between maternal or newborn characteristics between all cases and controls; however, the mothers of confirmed cases had a higher educational level than mothers of controls and unconfirmed cases (P<0.05). Among the 70 boys with genital anomalies reported at birth, 49 had a cryptorchidism, 20 had hypospadias and one had both anomalies; 29 (41%) of these anomalies were confirmed, including 14 (28%) of the cases of cryptorchidism and 15 (71%) of the cases of hypospadias. For cryptorchidism, we observed a slightly higher proportion of confirmed cases among boys whose testes were not palpated at birth (43% compared to 23% for cases with palpated testes); for hypospadias, confirmed cases were more frequent for cases with middle hypospadias (100%), compared to anterior hypospadias (70%).

Table II. Description of the study population (n=279)

	All controls (N=209)	All cases identified at birth (N=70)	Confirmed cases (n=29)
Maternal characteristics	Percent or Mean ± SD	Percent or Mean ± SD	Percent or Mean ± SD
Maternal age (years)			
<25	27 (12.9)	4 (5.7)	1 (3.5)
25 – 35	143 (68.4)	57 (81.4)	26 (89.7)
≥ 35	39 (18.7)	9 (12.9)	2 (6.9)
Mean ± SD	29.8 ± 4.8	29.9 ± 4.2	29.0 ± 3.4
Maternal birth country ^a			
France	196 (95.2)	68 (98.6)	29 (100.0)
Other	10 (4.9)	1 (1.5)	0 (0.0)
Educational level ^a			
High school or less	92 (45.1)	31 (44.3)	7 (24.1)
Postsecondary school	112 (54.9)	39 (55.7)	22 (75.9)
Body mass index (kg/m ²) ^a			
<25	149 (72.3)	54 (78.3)	22 (78.6)
≥25	57 (27.7)	15 (21.7)	6 (21.4)
Mean ± SD	23.4 ± 5.0	22.5 ± 4.3	22.3 ± 4.6
Smoking status during pregnancy			
No smoker	157 (75.1)	49 (70.0)	20 (69.0)
Smoker	52 (24.9)	21 (30.0)	9 (31.0)
Alcohol consumption during pregnancy ^a			
Never	134 (66.7)	39 (57.4)	16 (59.3)
Occasional or regular	67 (33.3)	29 (42.7)	11 (40.7)
Parity ^a			
Primiparous	103 (49.3)	28 (40.0)	15 (51.7)
Multiparous	106 (50.7)	42 (60.0)	14 (48.3)
Folic acid supplementation ^a			
Never	181 (86.6)	58 (82.9)	23 (79.3)
Before or at the beginning of the pregnancy	28 (13.4)	12 (17.1)	6 (20.7)
Diabetes ^a			
No	200 (97.1)	67 (95.7)	29 (100.0)
Yes	6 (2.9)	3 (4.3)	0 (0.0)

High blood pressure ^a			
No	188 (91.3)	63 (91.3)	26 (89.7)
Yes	18 (8.7)	6 (8.7)	3 (10.3)
Newborn characteristics			
Gestational age (weeks of gestation)			
<37 (preterm birth)	17 (8.1)	6 (8.6)	2 (6.9)
≥37	192 (91.9)	64 (91.4)	27 (93.1)
Mean ± SD	39.1 ± 2.1	39.1 ± 1.9	39.3 ± 2.1
Mode of delivery ^a			
Vaginal	169 (81.6)	54 (78.3)	24 (82.8)
Caesarean	38 (18.4)	15 (21.7)	5 (17.2)
Birth weight ^a			
Mean ± SD	3281.8 ± 451.6	3257.1 ± 489.9	3255.7 ± 443.8

NA, not applicable.

^a Missing values on educational level (n=5), body mass index (n=4), alcohol consumption (n=10), maternal birth country (n=4), diabetes (n=3), high blood pressure (n=4), Mode of delivery (n=3), birth weight (n=14).

Levels of exposure

As shown in Table III, the detection rates of GE metabolites in urine varied widely, ranging from 8% for EAA to 94% for PhAA. PhAA was the metabolite with the highest median concentration (0.36 mg/l). Levels of the different metabolites were weakly correlated (Spearman's rho ranged from 0.1 to 0.3).

Table III. Levels of glycol ether metabolites among controls (n=209).

mg/l	LD	N (%) >LD	P25	P50	P75	P90	Max
MAA	0.05	145 (69.4)	<0.05	0.10	0.20	0.31	0.96
EAA	0.05	17 (8.1)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.17
EEAA	0.05	88 (42.1)	<0.05	<0.05	0.09	0.31	7.60
PhAA	0.05	196 (93.8)	0.14	0.36	1.17	5.00	91.75
2-MPA	0.05	34 (16.3)	<0.05	<0.05	<0.05	0.07	0.48

GE metabolites and male genital anomalies (identified at birth)

The multivariate analyses of all cases identified at birth showed significantly lower risks of male genital anomalies, especially hypospadias, associated with detectable levels of EEAA (Table IV). No other association reached statistical significance.

GE metabolites and confirmed male genital anomalies

When only confirmed cases and their controls were included in the analysis, we observed an association of borderline significance between detected 2-MPA and any male genital anomalies (Table V). We observed a significantly higher risk of hypospadias with the highest level of MAA, with a dose-response trend. A higher risk of hypospadias was also observed with detected EAA but this association was of borderline significance. No evidence of an association was observed between the different metabolites and the risk of cryptorchidism.

When we compared both sets of results (i.e. all cases vs. confirmed cases only), we found that the risk estimates observed with MAA, EAA, and 2-MPA pointed in the same direction in both but were notably stronger for the confirmed cases. In opposite, the estimates for EEAA metabolites were unstable.

Table IV. Adjusted associations between GE metabolites and the risk of male genital anomalies identified at birth

mg/l	Any genital anomalies (n=70) ^a			Cryptorchidism (n=50)			Hypospadias (n=21)		
	N cases/ N controls	OR [95% CI] ^b	N cases/ N controls	OR [95% CI] ^b	N cases/ N controls	OR [95% CI] ^b	N cases/ N controls	OR [95% CI] ^b	
MAA									
<LD	22/64	Ref.	17/38	Ref.	6/26	Ref.			
0.05-0.15	23/73	1.09 (0.49 ; 2.38)	16/53	0.71 (0.28 ; 1.75)	7/23	1.51 (0.41 ; 5.69)			
≥0.15	25/72	1.03 (0.44 ; 2.42)	17/58	0.50 (0.18 ; 1.35)	8/14	3.18 (0.74 ; 15.63)			
EAA									
<LD	60/192	Ref.	43/136	Ref.	18/58	Ref.			
≥ LD	10/17	1.60 (0.67 ; 3.68)	7/13	1.43 (0.49 ; 4.02)	3/5	1.74 (0.38 ; 6.75)			
EEAA									
<LD	51/121	Ref.	33/80	Ref.	19/44	Ref.			
≥ LD	19/88	0.36 (0.18 ; 0.71)	17/69	0.49 (0.22 ; 1.05)	2/19	0.17 (0.02 ; 0.86)			
PhAA									
<0.21	25/72	Ref.	19/50	Ref.	7/24	Ref.			
0.21-0.75	23/67	0.91 (0.47 ; 1.77)	17/42	0.99 (0.44 ; 2.18)	6/26	0.85 (0.23 ; 2.89)			
≥0.75	22/70	0.78 (0.38 ; 1.56)	14/57	0.48 (0.19 ; 1.14)	8/13	1.66 (0.50 ; 5.62)			
2-MPA^c									
<LD	57/175	Ref.	40/121	Ref.	18/56	Ref.			
≥ LD	13/34	1.07 (0.48 ; 2.30)	10/28	0.79 (0.31 ; 1.92)	3/7	1.68 (0.25 ; 10.86)			

^a One boy presented both cryptorchidism and hypospadias

^b Adjusted for maternal age (<25; 25-25; ≥35), educational level (secondary ; post-secondary), alcohol consumption at inclusion (no; yes), body mass index (continuous), and creatinine level (continuous)

^c Additionally adjusted for transport duration (0; 1; ≥2 days) and storage duration (continuous)

Table V. Adjusted associations between GE metabolites and the risk of male genital anomalies confirmed during the follow-up.

mg/l	Any genital anomalies (n=29)		Cryptorchidism (n=14)		Hypospadias (n=15)	
	N cases/ N controls	OR [95% CI] ^a	N cases/ N controls	OR [95% CI] ^a	N cases/ N controls	OR [95% CI] ^a
MMA						
<LD	8/30	Ref.	5/9	Ref.	3/21	Ref.
0.05-0.15	8/24	1.74 (0.52 ; 6.34)	3/11	0.36 (0.02 ; 2.84)	5/13	3.16 (0.60 ; 27.45)
≥0.15	13/32	1.72 (0.49 ; 6.53)	6/21	0.27 (0.03 ; 1.76)	7/11	7.50 (1.05 ; 121.49)
EAA						
<LD	23/80	Ref.	11/38	Ref.	12/42	Ref.
≥ LD	6/6	2.38 (0.67 ; 8.88)	3/3	1.51 (0.23 ; 9.92)	3/3	6.48 (0.99 ; 68.83)
EEAA						
<LD	20/58	Ref.	6/27	Ref.	14/31	Ref.
≥ LD	9/28	0.96 (0.33 ; 2.92)	8/14	3.85 (0.59 ; 117.78)	1/14	0.38 (0.04 ; 2.14)
PhAA						
<0.21	11/29	Ref.	5/12	Ref.	6/17	Ref.
0.21-0.75	9/29	0.72 (0.21 ; 2.21)	5/12	3.03 (0.36 ; 37.61)	4/17	0.83 (0.15 ; 3.96)
≥0.75	9/28	0.57 (0.19 ; 1.60)	4/17	0.32 (0.04 ; 1.61)	5/11	1.06 (0.23 ; 4.60)
2-MPA^b						
<LD	22/75	Ref.	10/35	Ref.	12/40	Ref.
≥ LD	7/11	4.50 (0.97 ; 28.11)	4/6	2.47 (0.21 ; 34.10)	3/5	4.19 (0.38 ; 90.35)

^a Adjusted for maternal age (<25; 25-25; ≥35), educational level (secondary ; post-secondary), alcohol consumption at inclusion (no; yes), body mass index (continuous), and creatinine level (continuous)

^b Additionally adjusted for transport duration (0; 1; ≥2 days) and storage duration (continuous)

Discussion

In our prospective study based on urinary assessment of exposure, the detection of MAA, EAA, and 2-MPA, but not PhAA and EEAA, were associated with higher risks of confirmed male genital anomalies, especially hypospadias.

The study population came from two birth cohorts both designed in part to evaluate the effect of prenatal exposure to environmental contaminants on developmental anomalies. The women enrolled were fairly homogenous, mostly white, highly educated, and with few risk factors for adverse pregnancy outcomes. However, the study designs of the initial cohorts differ in some ways, including in their recruitment and the timing of urine sampling. We attempted to reduce these differences by matching cases and their controls for region of inclusion and gestational age at urine sampling. The accurate assessment of male genital anomalies with a follow-up covering the preferred period for surgery and the most likely period for spontaneous descent of testis justifies confidence about the identification of the confirmed cases. The diagnosis of cryptorchidism is clinically difficult to make with certainty at birth, since the testis might be in a high scrotal position or might be retractile, both situations that could result in misdiagnosis (Kolon et al., 2014). Similarly, overestimation of hypospadias is possible when diagnosis is only based on neonatal examination (borderline between incomplete prepuce and hypospadias) and is not confirmed by a specialist (Dolk et al., 2004). A higher proportion of misdiagnosis among the cases defined at birth might well have decreased the specificity of the case definition and may explain the generally weaker associations observed.

The method of choice for monitoring occupational exposure to GE is the use of urinary alkoxy acids, which capture all routes of exposure (Laitinen and Pulkkinen, 2005; Multigner et al., 2005). This method can be extended to the general population to capture all sources of exposure, including domestic. Nonetheless, measurement of the metabolites in a first-morning spot urine sample is a limitation: because they have half-lives that range from less than 24 to 80 hours, the sample represents exposure only over the previous few days or weeks. Furthermore, the timing of urinary sampling did not fully correspond to the critical window for male genital tract development (i.e., 8-12 WG for abdominal testis descent and genital tubercle development and third trimester for inguinoscrotal testis descent), especially for the EDEN cohort (median gestational age at urinary sampling = 26 WG) (Klonisch et al., 2004; Hughes and Acerini, 2008). However, these measurements may represent regular exposure when products are used daily in the workplace or at home (e.g., personal care products). Accordingly, a previous study in the PELAGIE cohort showed that GE metabolite levels or detection were associated with the occupations most strongly linked to solvent

exposure (healthcare workers, cleaners, and hairdressers) and with self-reported use of occupational products containing solvents (Garlantézec et al., 2012). We could therefore assume that the levels of occupational exposure did not vary substantially through the pregnancy (at least until maternity leave starts, generally around 32 WG in France).

We observed a dose-response trend between exposure to MAA and hypospadias and apparently higher risks of male genital anomalies, especially hypospadias, associated with detection of EAA and 2-MPA, among confirmed cases only. In the previous PELAGIE study, including some of the cases in this study, the risk estimates observed with MAA and EAA pointed in the same direction; the small number of cases prevented analysis for 2-MPA and EEAA and by subtypes of male genital anomalies (Cordier et al., 2012). The only other epidemiological studies that have studied the risk of male genital anomalies in relation to solvents have used indirect assessment of exposure to solvents overall (rather than analysis by chemical classes of solvent); they also suggested higher risks with solvent exposure (García and Fletcher, 1998; Pierik et al., 2004; Garlantézec et al., 2009; Vaktskjold et al., 2011).

To our knowledge and despite evidence of developmental toxicity of some GE in animal toxicology studies in species ranging from rodents to nonhuman primates, neither cryptorchidism nor hypospadias have been documented in these animal studies. However, unilateral testicular hypoplasia has been reported in rodents exposed to MAA and delay in preputial separation in those exposed to 2-MPA (NIOSH, 1983; Carney et al., 1999).

The main toxic effects of GE, including teratogenicity, have been related to alkoxy acid metabolites (Inserm, 1999, 2006). Alkoxy acid metabolites do not present the same degree of toxicity: among ethylene GE derivatives, short-chained alkoxy acid metabolites (MAA, EAA) are reported to present greater developmental and reproductive toxicity than those with long chains (Inserm, 1999, 2006). Among propylene GE derivatives, developmental and reproductive toxicity has been identified for 2-MPA, the acidic metabolite of 1-propylene glycol 2-methyl ether (1PG2ME), a minor isomer of propylene glycol monomethyl ether (PGME) (Inserm, 1999, 2006).

The mechanisms of GE toxicity are not fully understood. Various modes of action have been proposed (mostly based on studies dealing with MAA and EAA), involving interference with DNA synthesis, the Krebs cycle, core histone acetylation, and apoptosis (Inserm, 1999, 2006; Wade et al., 2008; Dayan and Hales, 2014). Alkoxies are also reported to disrupt nuclear receptor signalling, as by reducing endogenous oestrogen receptor alpha (ER α) and attenuating oestrogen-stimulated endogenous gene expression in MCF-7 cells and the mouse uterus (Henley et al., 2009) and by increasing expression of oestrogen-receptor beta (ER β) in rat and mouse pachytene spermatocytes

(Selva et al., 2004; Tirado et al., 2004) and of androgen receptor (AR) in rat Sertoli cells (Tirado et al., 2003). More recently, microarray analysis of a Leydig cell line that stably expresses AR has shown that MAA affects the expression of androgen-responsive genes via complex interactions, both positive and negative, between testosterone- and MAA-responsive genes, including HOX developmental genes (Bagchi et al., 2011). Although these studies were conducted to explain adult-testis GE toxicity, they offer an interesting complementary hypothesis about alkoxy acid-induced male genital anomalies, given that both androgens and HOX transcription factor genes are believed to play a major role in testis descent and male differentiation of the genital tubercle (Wang et al., 2007; Kalfa et al., 2009).

In our study, we did not observe a higher risk of male genital anomalies (but rather lower risk) associated with PhAA or EEAA, two metabolites for which animal studies report conflicting results concerning reproductive and developmental toxicity (Inserm, 1999, 2006). One limitation of our study is the imprecision of the estimates, for both the significant and some nonsignificant associations (e.g. OR>2 among confirmed cases of cryptorchidism), due to the rarity of the event. To reduce the small-sample and sparse-data bias, estimates were obtained from Firth penalized regression, and confidence intervals were calculated from profile likelihood function. Because we did not correct for multiple testing, there is a risk of significant associations due to chance. However, the biological plausibility of the associations we observed, reinforced among the confirmed cases justifies confidence in the results.

Because of their recognized reproductive and developmental toxicity, several GE were strictly regulated by the European Union and France before (EGME, EGEE) or during (EGDME, DEGDME, TEGDME) the establishment of the cohorts, from the mid-1990s to 2004 (Afsset, 2008). All of these were important sources of MAA and EAA exposures and are no longer authorized in consumer products. Nonetheless, the MAA and EAA urinary concentrations observed in this study may reflect exposure from still authorized GE that also produce these alkoxy acid metabolites such as, respectively, TEGME and DEGME, and TEGEE and DEGEE. In 2008, the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) assessed human exposure to GE in France (Afsset, 2008). They reported the presence of GE that generate MAA as a minor metabolite in industrial cleaning agents (TEGME and DEGME) but also in consumer car cleaning products (DEGME). For the GE that generate EAA as a minor metabolite, they identified DEGEE in several consumer products (paint, inks, cleaning agents, cosmetics, and drugs) and TEGEE in one consumer paint. On the other hand, 2-MPA urinary concentrations only reflect exposure to 1PG2ME, which is a minor isomer of PGME, a GE used in various industrial and consumer products including paint, inks and

varnishes, cleaning agents, biocides, and drugs (Afsset, 2008). According to EU regulations, 1PG2ME should not exceed 0.5% in consumer products.

Conclusion

Our results provide some further evidence in favour of an association between prenatal exposure to some GE and congenital anomalies of the male genital tract, especially hypospadias. Nevertheless, although the associations observed in our study between GE and hypospadias are biologically plausible, they may also be surrogates of exposure to chemical mixtures, including other solvents. This point calls for work to identify the sources of GE exposure and co-exposure and to promote large scale studies with objective exposure assessment in the general population.

Authors' roles

CW contributed to the study design, statistical analyses, interpretation of data, and drafting the manuscript. JB and RS contributed to the study design and interpretation of data. NL, FR, and BK were responsible for the assessment of male genital anomalies. LM contributed to the selection of glycol ether, interpretation of data, and assisted in drafting the manuscript. FLG and LL contributed to the measurement of the glycol ethers. FP contributed to the acquisition of medical data. MAC and BH established the EDEN cohort and contributed to the interpretation of data. CM and FR contributed to the establishment of the PELAGIE cohort and the acquisition of data. SC established the PELAGIE cohort, contributed to the interpretation of data, and assisted in drafting the manuscript. RG initiated the study, contributed to the interpretation of data and assisted in drafting the manuscript. All authors have revised the manuscript critically and approved the final version.

Acknowledgements

We are grateful to the gynaecologists, obstetricians, ultrasonographers, midwives, paediatricians, and families who participated in the study. We acknowledge the help from members of the PELAGIE cohort study and the EDEN Mother-Child Cohort Study Group. Thanks to Jo Ann Cahn for her careful revision of the article.

Funding

This study is funded by the French Agency for Medicines and Health Products Safety (ANSM). The PELAGIE cohort is funded by Inserm, the French Ministries of Health, Labour, and Ecology, InVS, ANR, and ANSES. The EDEN cohort is funded by FRM, Inserm, IReSP, INPES, Nestlé, the French Ministry of Health, ANR, Paris-Sud University, InVS, ANSES, ALFEDIAM and MGEN.

Conflict of interest

None declared.

References

Afsset. Les éthers de glycol - Synthèse des connaissances sur les expositions de la population générale en France. Saisine Afsset n°2003/016. 2008; Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2003et0016Ra-3.pdf>.

Bagchi G, Zhang Y, Stanley KA, Waxman DJ. Complex modulation of androgen responsive gene expression by methoxyacetic acid. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:42.

Carney EW, Crissman JW, Liberacki AB, Clements CM, Breslin WJ. Assessment of adult and neonatal reproductive parameters in Sprague-Dawley rats exposed to propylene glycol monomethyl ether vapors for two generations. *Toxicol Sci* 1999;50:249–258.

Cordier S, Garlantézec R, Labat L, Rouget F, Monfort C, Bonvallot N, Roig B, Pulkkinen J, Chevrier C, Multigner L. Exposure during pregnancy to glycol ethers and chlorinated solvents and the risk of congenital malformations. *Epidemiology* 2012;23:806–812.

Dayan C, Hales BF. Effects of ethylene glycol monomethyl ether and its metabolite, 2-methoxyacetic acid, on organogenesis stage mouse limbs in vitro. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2014;101:254–261.

Dolk H, Vrijheid M, Scott JES, Addor M-C, Botting B, Vigan C de, Walle H de, Garne E, Loane M, Pierini A, et al. Toward the effective surveillance of hypospadias. *Environ Health Perspect* 2004;112:398–402.

Firth D. Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika* 1993;80:27–38.

García AM, Fletcher T. Maternal occupation in the leather industry and selected congenital malformations. *Occup Environ Med* 1998;55:284–286.

Garlantézec R, Monfort C, Rouget F, Cordier S. Maternal occupational exposure to solvents and congenital malformations: a prospective study in the general population. *Occup Environ Med* 2009;66:456–463.

Garlantézec R, Multigner L, Labat L, Bonvallot N, Pulkkinen J, Dananché B, Monfort C, Rouget F, Cordier S. Urinary biomarkers of exposure to glycol ethers and chlorinated solvents during pregnancy: determinants of exposure and comparison with indirect methods of exposure assessment. *Occup Environ Med* 2012;69:62–70.

Greenland S, Schwartzbaum JA, Finkle WD. Problems due to small samples and sparse data in conditional logistic regression analysis. *Am J Epidemiol* 2000;151:531–539.

Henley D V, Mueller S, Korach KS. The short-chain fatty acid methoxyacetic acid disrupts endogenous estrogen receptor-alpha-mediated signaling. *Environ Health Perspect* 2009;117:1702–1706.

Heude B, Forhan A, Slama R, Douhaud L, Bedel S, Saurel-Cubizolles M-J, Hankard R, Thiebaugeorges O, Agostini M De, Annesi-Maesano I, et al. Cohort Profile: The EDEN mother-child cohort on the prenatal and early postnatal determinants of child health and development. *Int J Epidemiol* 2015;

Hughes IA, Acerini CL. Factors controlling testis descent. *Eur J Endocrinol* 2008;S75-82.

Inserm. Ethers de glycol : Quels risques pour la santé ? 1999; Les éditions Inserm, France.

Inserm. Éthers de glycol : Nouvelles données toxicologiques. 2006; Les éditions Inserm, France.

Johanson G. An overview of glycol ethers metabolism and toxicokinetics. *Occup Hyg* 1996;2:5–24.

Kalfa N, Philibert P, Sultan C. Is hypospadias a genetic, endocrine or environmental disease, or still an unexplained malformation? *Int J Androl* 2009;32:187–197.

- Klonisch T, Fowler PA, Hombach-Klonisch S. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Dev Biol* 2004;270:1–18.
- Kolon TF, Herndon CDA, Baker LA, Baskin LS, Baxter CG, Cheng EY, Diaz M, Lee PA, Seashore CJ, Tasian GE, et al. Evaluation and treatment of Cryptorchidism: AUA guideline. *J Urol* 2014;192:346–349.
- Labat L, Humbert L, Dehon B, Multigner L, Garlantezec R, Nisse C, Lhermitte M. Dosage des métabolites urinaires des éthers de glycol par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. *Ann Toxicol Anal* 2008;20:227–232.
- Laitinen J, Pulkkinen J. Biomonitoring of 2-(2-alkoxyethoxy)ethanols by analysing urinary 2-(2-alkoxyethoxy)acetic acids. *Toxicol Lett* 2005;156:117–126.
- Lindbohm ML. Effects of parental exposure to solvents on pregnancy outcome. *J Occup Environ Med* 1995;37:908–914.
- McMartin KI, Chu M, Kopecky E, Einarson TR, Koren G. Pregnancy outcome following maternal organic solvent exposure: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Am J Ind Med* 1998;34:288–292.
- Multigner L, Catala M, Cordier S, Delaforge M, Fenaux P, Garnier R, Rico-Lattes I, Vasseur P. The INSERM expert review on glycol ethers: findings and recommendations. *Toxicol Lett* 2005;156:29–37.
- NIOSH. Written communication. Interim report on ethylene glycol monomethyl ether submitted by E.H. Blair of the Dow Chemical Company to the Environmental Protection Agency under Section 8(e) of the Toxic Substances Control Act (January 29, 1982). In *Glycol Ether*. 1983;
- Pierik FH, Burdorf A, Deddens JA, Juttman RE, Weber RFA. Maternal and paternal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a case-control study in newborn boys. *Environ Health Perspect* 2004;112:1570–1576.
- Selva DM, Tirado OM, Toràn N, Suárez-Quian CA, Reventos J, Munell F. Estrogen receptor beta expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene. *Biol Reprod* 2004;71:1461–1468.
- Sharpe RM. The “oestrogen hypothesis”- where do we stand now? *Int J Androl* 2003;26:2–15.
- Skakkebaek NE. Endocrine disrupters and testicular dysgenesis syndrome. *Horm Res* 2002;57 Suppl 2:43.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson A-M, Eisenberg ML, Jensen TK, Jørgensen N, Swan SH, Sapro KJ, et al. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev* 2016;96:55–97.
- Tirado OM, Martinez ED, Rodriguez OC, Danielsen M, Selva DM, Reventós J, Munell F, Suárez-Quian CA. Methoxyacetic acid dysregulation of androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat testis. *Biol Reprod* 2003;68:1437–1446.
- Tirado OM, Selva DM, Toràn N, Suárez-Quian CA, Jansen M, McDonnell DP, Reventós J, Munell F. Increased expression of estrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration. *J Androl* 2004;25:84–94.
- Vaktskjold A, Talykova L V, Nieboer E. Congenital anomalies in newborns to women employed in jobs with frequent exposure to organic solvents--a register-based prospective study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011;11:83.
- Wade MG, Kawata A, Williams A, Yauk C. Methoxyacetic acid-induced spermatocyte death is associated with histone hyperacetylation in rats. *Biol Reprod* 2008;78:822–831.
- Wang Y, Barthold J, Kanetsky PA, Casalunovo T, Pearson E, Manson J. Allelic variants in HOX genes in cryptorchidism. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007;79:269–275.

Supplementary data

Supplemental material: Post-natal data collected during the 2-year follow-up period to confirm cases of male genital anomalies

The follow-up procedures used to confirm the cases of genital anomalies differed slightly in each cohort. For the children enrolled in the EDEN cohort, a clinical examination of the position of the testis was performed at the age of 1 year. In addition, we used data collected by questionnaires (at 4, 8, 12, and 24 months of age) that asked specifically about consultations and hospitalizations since birth and about male genital anomalies. For the children enrolled in the PELAGIE cohort, we contacted paediatric surgeons of the Brittany region about cases identified at birth and collected surgical reports. Additional data were obtained by questionnaire at 2 years of age (same type of questions as in the EDEN cohort).

Supplemental Table I. Prevalence of male genital anomalies in each cohort.

	Any male genital anomaly	Cryptorchidism	Hypospadias
N (%) identified at birth			
EDEN	48 (2.5%)	39 (2.1%)	10 (0.5%)
PELAGIE	22 (0.6%)	11 (0.3%)	11 (0.3%)
TOTAL	70 (1.3%)	50 (0.9%)	21 (0.4%)
N (%) of confirmed cases			
EDEN	17 (0.9%)	11 (0.6%)	6 (0.3%)
PELAGIE	12 (0.4%)	3 (0.1%)	9 (0.3%)
TOTAL	29 (0.3%)	14 (0.3%)	15 (0.3%)
% of confirmed cases among cases identified at birth			
EDEN	35%	28%	60%
PELAGIE	55%	27%	82%
TOTAL	41%	28%	71%

Supplemental Table II. Comparison of maternal and newborn characteristics among control included in the EDEN and the PELAGIE cohorts.

	EDEN	PELAGIE	p-value
Maternal characteristics	Percent or Mean \pm SD	Percent or Mean \pm SD	
Maternal age (years)			
<25	22 (15.4)	5 (7.6)	0.21
25 – 35	93 (65.0)	50 (75.8)	
\geq 35	28 (19.6)	11 (16.7)	
Mean \pm SD	29.6 \pm 5.2	30.2 \pm 4.0	0.31
Maternal birth country ^a			
France	132 (93.6)	64 (98.5)	0.13
Other	9 (6.4)	1 (1.5)	
Educational level ^a			
High school or less	64 (46.4)	28 (42.4)	0.60
Postsecondary school	74 (53.6)	38 (57.6)	
Body mass index (kg/m ²) ^a			
<25	98 (70.0)	51 (77.3)	0.28
\geq 25	42 (30.0)	15 (22.7)	
Mean \pm SD	23.5 \pm 4.4	23.2 \pm 6.1	0.25
Smoking status during pregnancy			
No smoker	115 (80.4)	42 (63.6)	0.01
Smoker	28 (19.6)	24 (36.4)	
Alcohol consumption during pregnancy ^a			
Never	83 (61.5)	51 (77.3)	0.03
Occasional or regular	52 (38.5)	15 (22.7)	
Parity ^a			
Primiparous	66 (46.2)	37 (56.1)	0.18
Multiparous	77 (53.8)	29 (43.9)	
Folic acid supplementation ^a			
Never	127 (88.8)	54 (81.8)	0.17
Before or at the beginning of the pregnancy	16 (11.2)	12 (18.2)	
Diabetes ^a			
No	138 (96.5)	62 (98.4)	0.45
Yes	5 (3.5)	1 (1.6)	
High blood pressure ^a			
No	132 (92.3)	56 (88.9)	0.42
Yes	11 (7.7)	7 (11.1)	

Newborn characteristics			
Gestational age (weeks of gestation)			
<37 (preterm birth)	131 (91.6)	61 (92.4)	0.84
≥37	12 (8.4)	5 (7.6)	
Mean ± SD	39.0 ± 2.3	39.2 ± 1.6	0.93
Mode of delivery ^a			
Vaginal	118 (82.5)	51 (79.7)	0.63
Caesarean	25 (17.5)	13 (20.3)	
Birth weight ^a			
Mean ± SD	3273.7 ± 397.7	3297.5 ± 544.9	0.64

Supplemental Table III. Distributions of GE metabolites among controls included in the EDEN (n=143) and PELAGIE (n=66) cohorts.

		N (%) > LD	Q1	Q2	Q3	P95
MAA	EDEN	131 (92%)	0.08	0.14	0.24	0.42
	PELAGIE	14 (21%)	<LD	<LD	<LD	0.20
EAA	EDEN	15 (10%)	<LD	<LD	<LD	0.08
	PELAGIE	2 (3%)	<LD	<LD	<LD	<LD
EEAA	EDEN	77 (54%)	<LD	0.06	0.12	0.62
	PELAGIE	11 (17%)	<LD	<LD	<LD	0.13
PhAA	EDEN	136 (95%)	0.15	0.46	1.72	8.93
	PELAGIE	60 (91%)	0.11	0.28	0.74	2.38
2-MPA	EDEN	32 (22%)	<LD	<LD	<LD	0.17
	PELAGIE	2 (3%)	<LD	<LD	<LD	<LD

3.3. ARTICLE 3 : EXPOSITIONS PRENATALES AUX ETHERS DE GLYCOL ET NIVEAUX D'HORMONES SEXUELLES DANS LE SANG DE CORDON OMBILICAL

3.3.1. Résumé en français

Introduction

Les éthers de glycol (EG) sont des solvants oxygénés utilisés dans de nombreux produits à usages professionnel ou domestique. Plusieurs EG, et plus particulièrement leurs métabolites, sont connus pour leur toxicité testiculaire et leurs effets sur la fertilité et le développement. Des études récentes chez l'animal rapportent que l'acide méthoxyacétique (MAA) altère l'expression de certains récepteurs des hormones stéroïdiennes suggérant un potentiel mécanisme d'action de perturbation endocrinienne.

Objectif

Cette étude a pour objectif d'évaluer les variations des concentrations d'hormones sexuelles à la naissance en association avec l'exposition prénatale aux EG mesurée à partir de biomarqueurs urinaires.

Méthodes

La population d'étude comprend 350 nouveau-nés inclus dans la cohorte PELAGIE. Les concentrations de testostérone (T) et d'œstradiol (E2) ont été mesurées dans le sang de cordon ombilical par spectrométrie de masse, et l'hormone anti-Müllerian (AMH) et la *sex hormone binding globulin* (SHBG) par radio-immunologie. La fraction de testostérone libre (fT) et l'index aromatase (AI=T/E2) ont été calculés. Les concentrations de huit métabolites d'EG ont été mesurées dans les urines maternelles collectées pendant la grossesse (<19 semaines d'aménorrhée). Les associations entre les niveaux d'EG et les concentrations d'hormones ont été évaluées à partir de régressions linéaires multivariées. Ces analyses ont été stratifiées sur le sexe de l'enfant.

Résultats

Le pourcentage de détection des métabolites d'EG varient de 4% pour l'acide éthoxyacétique (EAA) à 98% pour l'acide butoxyacétique (BAA). Des relations non monotones sont observées entre les concentrations d'acide méthoxyéthoxyacétique (MEAA) et les concentrations d'E2 et l'AI. Une diminution de la testostérone est observée avec la détection de MAA. Les concentrations d'acide

phenoxyacetic (PhAA) sont associées à une diminution de la SHBG et de l'AI chez les garçons et une augmentation de la SHBG chez les filles, comme la détection d'acide éthoxyéthoxyacétique (EEAA). Ces associations sont robustes d'après les analyses de sensibilité réalisées.

Conclusion

Ces résultats suggèrent que l'exposition prénatale à certains éthers de glycol, notamment aux précurseurs de MAA, MEAA, EEAA et PhAA, modifie l'équilibre hormonal du fœtus, de façon différente selon le sexe du fœtus. Les études sur la toxicité des éthers de glycol, et leurs potentielles capacités à interférer avec le système endocrinien, méritent d'être poursuivies, particulièrement pour le PhAA qui est mesuré chez la quasi-totalité des femmes incluses (son précurseur est largement utilisé dans les cosmétiques).

3.3.2. Prenatal exposure to glycol ethers and cord sex hormone levels

Statut : En préparation

Charline Warembourg (1), Anne-Claire Binter (1), Frank Giton (2), Jean Fiet (2), Christine Monfort (1), Cécile Chevrier (1), Luc Multigner (1), Sylvaine Cordier (1), Ronan Garlantézec (1)

(1) Inserm UMR 1085 Irset, Epidemiological Research on Environment, Reproduction and Development, F-35000 Rennes, France; University of Rennes 1, France

(2) Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Biological Center of Investigations, University Hospital Group, Sud Henri Mondor, Faculté de Médecine, Créteil, France

Introduction

Glycol ethers (GE) are oxygenated solvents. They are low volatile and highly miscible in water and oils and these properties explained their presence in a large number of products used occupationally and domestically, including water-based paints, cleaning agents, cosmetics, and drugs. Several GE are well-known reproductive and developmental toxicants and their toxic effects are thought to be mediated by their alkoxy acid metabolites.

Animal studies reported adverse effects on the male and female gonads, resulting in decreased fertility, and increased rate of fetal deaths and congenital anomalies. In addition, it was demonstrated that ethylene glycol methyl ether (EGME), and especially its metabolite (methoxyacetic acid, MAA), can disrupt nuclear receptor signaling of steroid hormones in adult rat testis (Tirado et al., 2003, 2004). Studies in humans are limited but reported similar effects: occupational exposures to GE, mainly in the semiconductor industry, have been associated with lower semen quality and decrease fertility among men (Welch et al., 1988; Ratcliffe et al., 1989; Veulemans et al., 1993; Samuels et al., 1995; Multigner et al., 2007), menstrual cycle disorders and increased time-to-pregnancy among women (Eskenazi et al., 1995; Chen et al., 2002; Hsieh et al., 2005; Garlandezec et al., 2013), and increased risk of miscarriages and congenital anomalies (Schenker et al., 1995; Correa et al., 1996; Cordier et al., 1997, 2012; Lorente et al., 2000; Brender et al., 2002; Chevrier et al., 2006) including a suggesting risk of male genital anomalies (Cordier et al 2012)

It is now established that the fetal environment play a crucial role in the origins of diseases and it has been suggested that variations in hormonal levels during this critical period of development can affect the programming of endocrine signaling pathways and result in irreversible effects that may appear later in life (Zambrano et al., 2014). From the last decades, there is growing concern about the role of prenatal exposure to chemicals in the occurrence of hormonally-mediated reproductive health outcomes (e.g., sexual differentiation, male genital malformations, fertility, and cancer) but only a few studies have used sex hormone levels at birth as an early marker of effect. The accurate measurement of the fetal hormonal levels presents ethical challenge but umbilical cord blood has been suggested as a promising biological matrix, with the advantage to be easily collected at birth and representative of late gestation circulating fetal hormones (Hollier et al., 2014).

The aim of this study was to explore the associations between prenatal exposure to GE, measured by urinary biomarkers, and levels of sex hormones measured in cord blood of newborns enrolled in a prospective mother-child cohort.

Methods

Study population

The study population came from the PELAGIE mother-child cohort which enrolled 3,421 pregnant women (participation rate of 80%) at the beginning of their pregnancy from three districts of Brittany (western France) between 2002 and 2006. Women were recruited by gynecologists and ultrasonographers at prenatal care visit and were invited to complete a questionnaire at home about sociodemographic characteristics, lifestyle and reproductive history. They sent to our lab the completed questionnaire together with a first-morning-void urinary sample (before 19 weeks of gestation) in a 10mL test tube (95×16mm polypropylene, with wing plug) including a stabilizer (hydrochloric acid [HCl] or nitric acid [HNO₃]). Upon arrival at the laboratory, urine samples were frozen at -20°C. At the time of delivery, staff pediatricians of the maternity wards completed forms reporting medical data about the pregnancy and the newborn health (n=3399 [99%]) and a cord blood sample was collected from 2138 (62%) women and immediately centrifuged before storage at -20°C in our lab.

A random sample of 609 (18%) births was selected from the entire cohort (n=3421) to perform chemical measurements. Among these newborns, cord blood samples were available for 361 (59%) of them and we additionally excluded newborns from multiple pregnancy (n=3), with a major congenital anomaly (n=6), or gestational age <35 weeks (n=2) leading to a final study population of n=350 newborns.

Exposure assessment

GE metabolites in maternal urine were measured by gas chromatography coupled to mass spectrometry, and detection was performed in negative ionization mode with methane in full-scan acquisition between 85 and 152 m/z. These measurements were performed by the Toxicology and Genopathy Laboratory at the university hospital of Lille (France). We focused on eight alkoxyacetic acids as the main metabolites of GE in use in Europe at the time of sampling: methoxyacetic acid (MAA), methoxyethoxyacetic acid (MEAA), ethoxyacetic acid (EAA), ethoxyethoxyacetic acid (EEAA), 2-butoxyacetic acid (BAA), n-propoxyacetic acid (PAA), phenoxyacetic acid (PhAA), and 2-methoxypropionic acid (2 MPA). The method is linear ($r^2 = 0.99$) from 0.05 to 2.0 mg/L for all of the alkoxyacetic acids, yields coefficients of variation < 10% at 0.10 mg/L, and had a limit of detection (LOD) of 0.05 mg/L (Labat et al., 2008). We explored whether the levels of GE metabolites were affected by sampling characteristics including creatinine level

(continuous), gestational age at sampling (continuous), transportation time at room temperature (0; 1 or at least 2 days), duration of storage at -20°C (continuous) and the type of stabilizer (HCl or HNO₃). The BAA detection rate decreased with the number of days at room temperature when HCl was used as stabilizer and we therefore presented BAA results only for women whose samples were stabilized by HNO₃.

Hormone measurements

Assays were performed in the cord blood at the Surgery Research Center of the Medical School of Creteil (France). Estradiol (E2) and testosterone (T) levels were determined by gas-chromatography and mass-spectrometry. Sex hormone binding protein (SHBG) and Anti-Müllerian hormone (AMH) were measured using the IRMA kits from Beckman-Coulter, Villepinte, France. The limits of detection were 0.002ng/ml for E2, 0.02ng/ml for T, 0.28µg/ml for SHBG, and 0.08ng/ml for AMH.

Calculated free testosterone (fT) were determined with theoretical association constants of testosterone for SHBG ($K_s = 1 \times 10^9$ L/mol) and albumin ($K_a = 3.6 \times 10^4$ L/mol) (Giton et al., 2007), and a constant mean value of albumin 30g/l (Keelan et al., 2012). In addition, we calculated the aromatase index (AI) as T/E2 ratio.

AMH and SHBG (and therefore fT) could not be measured because of insufficient volume for n=11 and n=8 samples, respectively. Hemolysis was present in some samples, and the degree of hemolysis was ranked by visual inspection according to three levels (none, moderate or high).

Statistical analyses

A log-transformation was applied to all hormone distributions to reach normality. To evaluate possible nonlinear relation between GE metabolites and hormone levels, each metabolite was categorized according to the detection rate: those detected in less than 50% were treated in two categories (i.e., undetected vs detected) whereas those detected in more than 50% were treated in three categories (i.e., terciles).

Multivariate linear regressions were used to estimate the associations between GE metabolites and hormones levels. All models were a priori adjusted for gestational age at birth (continuous), newborn sex, maternal age (continuous), and parity (nulliparous, primiparous). We also adjusted for pre-pregnancy body mass index (BMI; <25 versus ≥ 25 kg/m²) for SHBG and fT. Because we observed variations in GE metabolites and hormone levels according to some sampling characteristics we additionally adjusted all models for creatinine level, the type of stabilizer (HCl or HNO₃) and the

degree of hemolysis of the cord blood sample (none, moderate, high). Interactions with newborn sex were tested and stratified analyses were systematically performed.

For the most detected GE metabolites (i.e., >60%), we additionally evaluated the dose-response relation using restricted cubic spline regressions, adjusted for the same covariates, to produce graphical representation and test for both overall association and nonlinear component of the association (Desquilbet and Mariotti, 2010). Levels of exposure were log-transformed and concentrations under the LOD were imputed by a simple distribution based imputation method (Jin et al., 2011). Statistical analyses were performed with SAS software (SAS/STAT version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC).

Due to the semi-exploratory goal of our study, we did not propose p-value corrections and accepted the possibility of false discoveries. As recommended, all statistical tests were pre-specified in advance (not post hoc) and all results were reported (Rothman, 1990; Bender and Lange, 2001; Goeman and Solari, 2011).

Sensitivity analyses

Three sets of sensitivity analyses were performed. The first used fully-adjusted models including, in addition to those mentioned above, the following covariates: smoking status at the beginning of the pregnancy (no; yes), birthweight (continuous), maternal education (<post-secondary; \geq post-secondary), maternal pre-pregnancy BMI (<25 versus \geq 25), gestational diabetes (no; yes), and high gestational or preexisting blood pressure (no; yes). The second excluded outliers, defined as $\pm 4SD$, of the normalized hormone distribution. And finally, the third excluded all cord blood samples with a high degree of hemolysis (n=33) and all urinary samples with HCl used as stabilizer (n=88).

Results

Description of the study population

Table 1 shows the main characteristics of the pregnant women and their newborns. At the beginning of their pregnancy, women were on average 30 years old, most of them had a high level of education (i.e., 63% post-secondary school), 28% were smoking at the beginning of their pregnancy and 10% drank alcohol occasionally or regularly. Few women had gestational or preexisting diabetes and high blood pressure.

Table 1. Characteristics of the study population (n=350)

	N (%)
Maternal characteristics	
Maternal age	
<25	33 (9.4)
25-30	136 (38.9)
30-35	138 (39.4)
>35	43 (12.3)
Mean ± SD	30.2 ± 4.0
Maternal pre-pregnancy BMI ^a	
<18.5	28 (8.0)
18.5 – 25	263 (75.4)
>25	58 (16.6)
Mean ± SD	22.3 ± 3.5
Educational level ^a	
High school or less	131 (37.5)
Postsecondary school	218 (62.5)
Parity	
Primiparous	149 (42.6)
Multiparous	201 (57.4)
Smoking status at inclusion ^a	
No smoker	251 (71.9)
Smoker	98 (28.1)
Alcohol consumption at inclusion ^a	
Never	309 (89.6)
Occasional or regular	36 (10.4)
Diabetes (gestational or preexisting)^a	
No	332 (96.2)
Yes	13 (3.8)
High blood pressure (gestational or preexisting)^a	
No	326 (93.9)
Yes	21 (6.1)
Newborn characteristics	
Sex	
Boys	168 (48.0)
Girls	182 (52.0)
Gestational age (weeks of gestation)	
<37 (preterm birth)	1 (0.3)
≥37	349 (99.7)
Mean ± SD	39.6 ± 1.1
Birth weight	
Mean ± SD	3474.3 ± 414.7

BMI, body mass index

^a Missing values on body mass index (n=1), educational level (n=1), smoking status (n=1), alcohol consumption (n=5), diabetes (n=5) and high blood pressure (n=3)

Levels of exposure

From Table 2, we observed that the detection rates of GE metabolites ranged from 4% for EAA to 98% for BAA. The highest median concentration was observed for PhAA with around 0.5 mg/L.

Table 2. Detection rates and distributions of GE metabolites (mg/L).

	N mesuré	N (%) >LD	Q1	Q2	Q3	Max
MAA	350	111 (31.7)	<LD	<LD	0.07	0.55
MEAA	350	223 (63.7)	<LD	0.09	0.30	3.90
EAA	350	13 (3.7)	<LD	<LD	<LD	0.62
EEAA	350	67 (19.1)	<LD	<LD	<LD	30.0
PhAA	350	330 (94.3)	0.16	0.49	1.45	26.8
2-MPA	350	23 (6.6)	<LD	<LD	<LD	0.55
BAA	262	257 (98.1)	0.09	0.12	0.16	0.52
PrAA	350	41 (11.7)	<LD	<LD	<LD	0.24

2-MPA, 2-methoxypropionic acid; BAA, 2-butoxyacetic acid; EAA, ethoxyacetic acid; EEAA, ethoxyethoxyacetic acid; MAA, methoxyacetic acid; MEAA, methoxyethoxyacetic acid; PhAA, phenoxyacetic acid; PrAA, n-propoxyacetic acid

Hormone distribution

Overall, levels of E2 and AMH were 10-fold higher than the levels of testosterone (Table 3). As expected, we observed significant differences in androgen hormone levels according to the newborn sex (i.e., higher concentrations for T and fT among boys). No significant differences were observed for E2I or SHBG.

Table 3. Detection rates and distributions of steroids (n=168 boys and n=182 girls).

		N (%) >LD	Q1	Q2	Q3	Max
T (ng/ml)	Boys	168 (100)	0.28	0.38	0.55	3.50
	Girls	182 (100)	0.17	0.21	0.31	2.77
SHBG (µg/ml)	Boys	162 (100)	2.38	2.82	4.15	21.65
	Girls	180 (100)	2.29	2.72	3.49	34.23
fT (pg/ml)	Boys	162 (100)	2.96	4.24	6.61	39.12
	Girls	180 (100)	1.91	2.49	3.58	27.04
E2 (ng/ml)	Boys	168 (100)	14.52	22.91	32.84	281.53
	Girls	182 (100)	14.98	22.91	38.03	317.55
AMH (ng/ml)	Boys	162 (100)	26.5	35.43	48.55	106.50

AMH, anti-Müllerian Hormone; E2, Estradiol; fT, Free testosterone; SHBG, Sex hormone binding protein; T, Testosterone

GE metabolites and hormone levels

In overall, all GE metabolites, except PrAA, were associated with a significant ($p < 0.05$) or a suggested ($p < 0.10$) variation in at least one hormone (Figure 1). The detection of MAA was associated with a significant decrease in T. The detection of EEAA was associated with a significant increase in SHBG and a suggested increase in E2, among girls only. A U-shape and an inverse-U shape associations were observed between categories of exposure to MEAA and levels of AI and E2 respectively, more pronounced among girls. There was an interaction between level of exposure to PhAA and newborn sex resulting in a significant dose-response increase in SHBG levels among girls in opposite to a suggested decrease among boys. Decrease in T and AI are also suggested in association with levels of PhAA among boys only. Additional suggested associations can be reported: a decrease in fT with detection of EAA among boys, an increase in T and E2 with detection of 2-MPA, and an increase in E2 and AMH with increasing levels of BAA among boys.

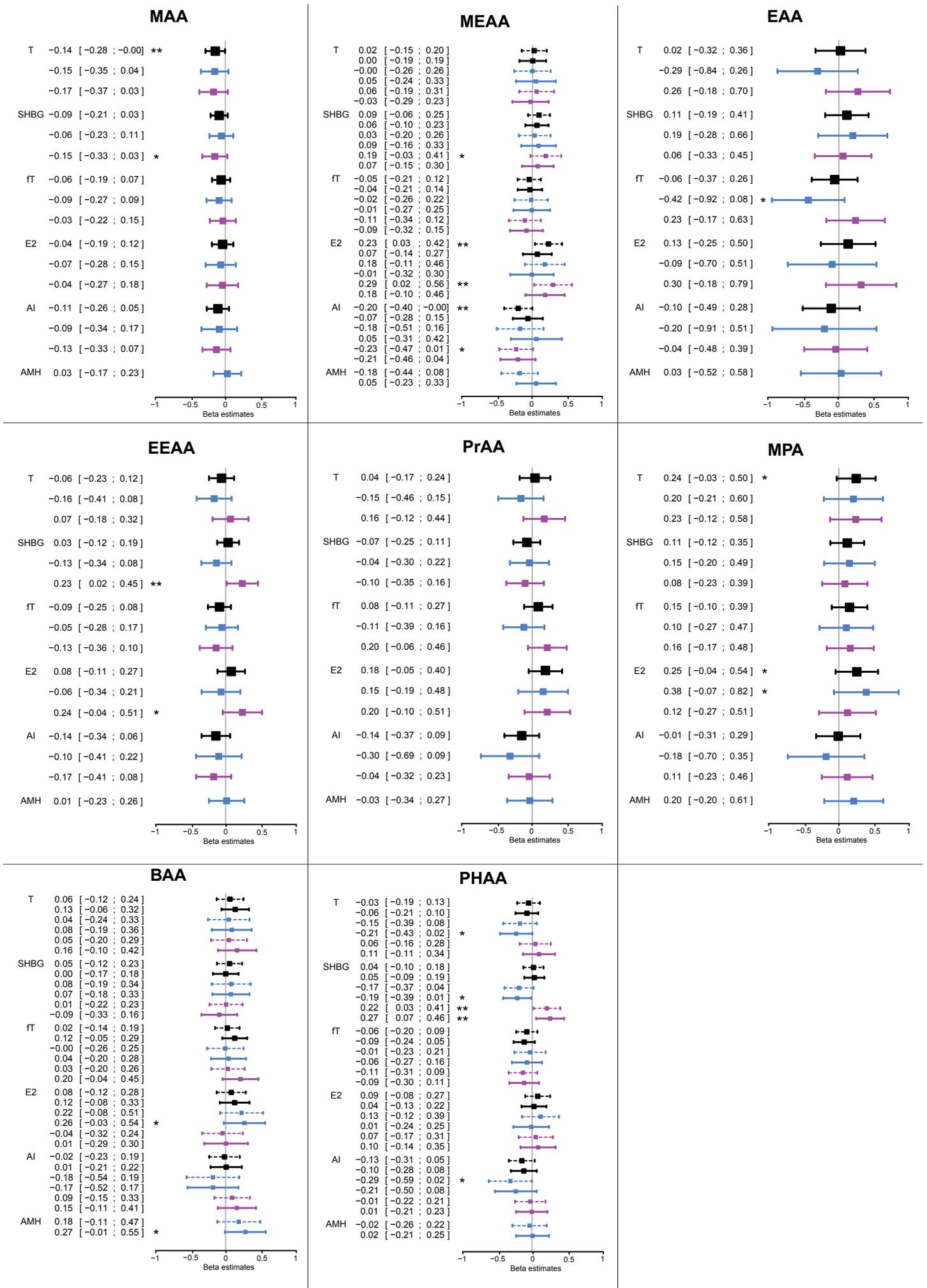
Nonlinear associations

Results from the splines visualization and the nonlinear test are presented in supplemental Figures 1 to 3. A highly significant inverse U-shape was observed between continuous levels of MEAA and concentrations of E2 ($p < 0.001$), alike among boys and girls (see supplemental Figure 1). U-shape relations between MEAA and AI were also observed, especially among girls. Significant associations between continuous levels of PhAA and concentrations of SHBG were also reported but in opposite direction according to the sex of newborn: PhAA level was associated with a linear increase in SHBG among girls and a decrease among boys (see supplemental Figure 2). Among boys, a nonlinear decrease, which seems to reach a plateau at higher dose of PhAA, was suggested as well as for AI. No significant associations were observed with continuous levels of BAA (see supplemental Figure 3).

Sensitivity analyses

All the significant associations mentioned above remained significant in the three sets of sensitivity analyses (data not shown). In addition, when excluding serum hemolysis sample or urinary sample with Hcl as a stabilizer, we observed a significant decrease of SHBG with MAA detection and a significant increase of AMH with BAA urinary levels.

Figure 1. Estimate coefficient and 95% confidence interval between prenatal exposures to glycol ethers (in mg/l) and Testosterone (T), Sex hormone binding globulin (SHBG), free Testosterone (fT), Estradiol (E2), Aromatase Index (AI) and Anti-Müllerian hormone (AMH). Adjusted for gestational age (continuous), maternal age (continuous), creatinine levels (continuous), parity (2 categories), type of stabilizer (Hcl, HNO₃) and hemolysis level (3 categories). Additionally adjusted for body mass index (2 categories) for SHBG and fT. Both sexes in black (n=350), boys in blue (n=168), and girls in pink (n=182). Levels of exposure were categorized according to the frequency of detection: in terciles (reference=1st tercile, dotted line=2nd tercile, bold line=3rd tercile) or in two categories (reference=undetected, bold line=detected). 2-MPA, 2-methoxypropionic acid; BAA, 2-butoxyacetic acid; EAA, ethoxyacetic acid; EEAA, ethoxyethoxyacetic acid; MAA, methoxyacetic acid; MEAA, methoxyethoxyacetic acid; PhAA, phenoxyacetic acid; PrAA, n-propoxyacetic acid; *p-value < 0.10, **p-value < 0.05



Discussion

From our prospective birth cohort study with biomarker-based exposure assessment, we observed significant associations between prenatal exposure to GE and cord sex hormones. In both sexes, nonlinear relations were observed for E2 and AI with levels of MEAA as well as a significant decrease of T with detection of MAA. Among girls, we observed significant increase in E2 concentrations in association with exposure to EEAA and PhAA. Among boys, a decrease in both SHBG and AI were observed with levels of exposure to PhAA, and this association seems to reach a plateau at higher dose.

The urinary measurement of alkoxy acid metabolites is the measure of choice to evaluate GE exposure and capture all sources and routes of exposure. GE with primary OH groups in the molecule, are readily metabolized by aldehyde and alcohol dehydrogenase to alkoxy acid metabolites (Johanson 1996). Nonetheless, the half-life of these metabolites ranged from less than 24 to 80 hours and measuring them on a spot urine sample may represent GE exposure during the past few days or weeks only and therefore may lead to exposure misclassification. However, we observed, from the PELAGIE cohort, a good concordance between levels or detection of GE metabolites and occupational exposure to solvents assessed by job-exposure matrix or self-reported by questionnaire (Garlantézec et al., 2012). We therefore assume that the levels of exposure to GE do not vary substantially through the pregnancy because these measurements may represent regular exposure when products are used daily in the workplace or at home.

Steroids were measured by mass spectrometry, which is the actual gold-standard method for the measurement of circulating hormones in cord blood, to ensure that cross-reacting substances were not measured in errors, especially in case of low levels of circulating testosterone (Hollier et al., 2014). Sex hormones measured in cord blood are likely to represent the late gestational circulating fetal hormones (Kuijper et al., 2013). However, these circulating hormones are regulated by a number of cascade reactions and feedback loops, it is difficult from our observational study to provide evidence about the mechanistic pathways involved in the observed associations. In addition, it remains unclear whether such changes in circulating sex hormone levels are predictive of the subsequent occurrence of disease.

We observed that some associations were sex-specific and even in opposite direction according to the sex of the fetus and this may reflect a toxic effect of GE on the gonads or on the placenta. Indeed, it has been suggested that the placenta functions in a sex specific manner, including on steroid pathways, and that males and females institute different strategies to cope with the same adverse

maternal environment (Clifton, 2010). We did not explain the inverted U-shape association we observed between the levels of MEAA and E2 concentrations, in both sexes, and consistently in all sensitivity analyses. The relevant modes of action that explain nonmonotonic dose-response relations are still poorly investigated but several mechanisms were proposed including opposing effects induced by multiple receptors, receptor desensitization, negative feedback, or metabolism modulation (Vandenberg et al., 2012; Lagarde et al., 2015). For most of them only hypotheses were proposed and their biological basis could not be fully assessed (Vandenberg et al., 2012; Lagarde et al., 2015).

To our knowledge, this is the first study that evaluated the variation in sex hormone concentrations at birth in association with prenatal exposure to GE in humans. Only one study among adult men in occupational setting gives some results concerning exposure to GE and sex hormones levels. This study reported a decrease in T in association with urinary levels of 2-MPA but not BAA and suggested a decrease in FSH in association with past exposure to MAA (Multigner et al., 2007).

Several GE are well-known reproductive and developmental toxicants and are therefore classified as toxic for reproduction by the Classification, Labelling and Packaging (CLP) regulation: category 1A for EGDEE, category 1B for EGME, EGEE, EGDME, DEGDME, TEGDME and 1PG2ME, and category 2 for DEGME. The main toxic effects of GE have been unambiguously related to their alkoxy acid metabolites but the mechanism of toxicity are not fully understood and experimental studies have mainly focused on precursors of MAA, EAA and 2-MPA. Various modes of action have been proposed involving interference with DNA synthesis, Krebs cycle, core histone acetylation, and apoptosis (Inserm, 1999, 2006; Wade et al., 2008; Dayan and Hales, 2014). In addition for MAA, disruption of nuclear receptor signaling has also been reported such as reduction of endogenous estrogen receptor alpha (ER α) and attenuation of estrogen-stimulated endogenous gene expression in MCF-7 cells and mouse uterus (Henley et al., 2009), increased expression of estrogen-receptor beta (ER β) in rat and mouse pachytenes spermatocytes (Selva et al., 2004; Tirado et al., 2004), and increased expression of androgen receptor (AR) in rat Sertoli cells (Tirado et al., 2003). More recently, microarray analysis of a Leydig cell line that stably expresses AR has shown that MAA impact the expression of androgen-responsive genes with complex interactions, both positive and negative, between testosterone- and MAA-responsive genes (Bagchi et al., 2009, 2011). Although these studies were conducted to explain adult-testis GE toxicity, they represent interesting complementary hypothesis regarding the decrease in testosterone observed in the present study with detected levels of MAA. From our previous work on the PELAGIE cohort, an increased risk of male genital anomalies was suggested with the detection of EAA (Cordier et al., 2012).

Concerning the other metabolites, including those we observed significantly associated with variation in hormones (MEAA, EEAA, and PhAA), their reproductive and developmental toxicity in both animals and humans is poorly documented (Inserm, 1999, 2006). It is therefore difficult to explain our results regarding the potential mode of actions of these compounds, especially for MEAA and EEAA which are metabolized from GE which also produce MAA and EAA as minor metabolites (see supplemental table 1). In the same way, animal studies about the reprotoxicity of EGPhE and its metabolites PhAA are limited: conflicting results about male toxicity have been reported and only one study evaluated its toxicity on female mice and reported a decrease in fertility (Nagano et al., 1984; Heindel et al., 1990; ECETOC, 2005). This last study performed among two generations, also reported an increase in mortality rate at birth and at weaning, and a decrease in testicular weight of pups (Heindel et al., 1990). In addition, one study evaluated the potential estrogenic activity of PhAA and reported no effect (androgenic activity not tested) (Morohoshi et al., 2005). In Humans, we have previously observed, from the PELAGIE cohort, a decrease in female fertility (i.e., increased time-to-pregnancy) with PhAA levels (Garlantézec et al., 2013).

Based on their recognized reproductive and developmental toxicity, several GE were strictly regulated by EU between the mid-1990s and early 2000s. These restrictions explain the lower detection rate of their metabolites (e.g., MAA, EAA, 2-MPA) in opposite to the high detection rate of MEAA, PhAA and BAA, which are metabolites of still authorized and largely used GE in EU. MEAA is the primary metabolite of two glycol ethers used in cleaning agents (Afsset, 2008). PhAA is the primary metabolite of 2-phenoxyethanol (EGPhE), used as a preservative in at least half of perfumes, creams, lotions, makeup, and hair products (except dyes) on the market in France (at concentrations up to 1%) and which can also be found in pharmaceutical products and biocides (Afsset, 2008). BAA is the primary metabolite of EGBE and also one of DEGBE and TEGBE, three glycol ethers used in various products including paint and varnishes, cosmetics, biocides, and cleaning agents (Afsset, 2008). All of these GE are present in both occupational and domestic products that lead to a widespread exposure for the general population to compounds for which experimental data are clearly lacking.

In accordance with the explanatory goal of this study, we decided to not correct for multiple comparison. Indeed, no previous studies have been published on this subject despite its relevance regarding the well-known developmental and testicular toxicity of several GE metabolites. We therefore preferred to protect against type II error rather than to correct p-value for type I error and therefore give the possibility to highlight further hypothesis which will need to be confirmed from both experimental and observational studies. Finally, we cannot exclude that other unmeasured

hormones or binding proteins could also been involved in the observed associations and that glycol ether biomarkers could represent other co-exposure that we did not trace.

Conclusion

This study provides suggestion of sex hormone variation at birth with prenatal exposure to GE through their alkoxy acid metabolites. These findings need to be replicated and support the need for experimental studies to evaluate the reproductive toxicity and the endocrine effects of GE, especially for those still in used in EU and frequently found in consumer products such as cleaning agents and cosmetics.

References

- Afsset. Les éthers de glycol - Synthèse des connaissances sur les expositions de la population générale en France. Saisine Afsset n°2003/016. 2008; Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2003et0016Ra-3.pdf>.
- Bagchi G, Hurst CH, Waxman DJ. Interactions of methoxyacetic acid with androgen receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;238:101–110.
- Bagchi G, Zhang Y, Stanley KA, Waxman DJ. Complex modulation of androgen responsive gene expression by methoxyacetic acid. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:42.
- Bender R, Lange S. Adjusting for multiple testing--when and how? *J Clin Epidemiol* 2001;54:343–349.
- Brender J, Suarez L, Hendricks K, Baetz RA, Larsen R. Parental occupation and neural tube defect-affected pregnancies among Mexican Americans. *J Occup Environ Med* 2002;44:650–656.
- Chen P-C, Hsieh G-Y, Wang J-D, Cheng T-J. Prolonged time to pregnancy in female workers exposed to ethylene glycol ethers in semiconductor manufacturing. *Epidemiology* 2002;13:191–196.
- Chevrier C, Dananché B, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Cordier S. Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. *Occup Environ Med* 2006;63:617–623.
- Clifton VL. Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta* 2010;31 Suppl:S33-9.
- Cordier S, Bergeret A, Goujard J, Ha MC, Aymé S, Bianchi F, Calzolari E, Walle HE De, Knill-Jones R, Candela S, et al. Congenital malformation and maternal occupational exposure to glycol ethers. Occupational Exposure and Congenital Malformations Working Group. *Epidemiology* 1997;8:355–363.
- Cordier S, Garlantézec R, Labat L, Rouget F, Monfort C, Bonvallot N, Roig B, Pulkkinen J, Chevrier C, Multigner L. Exposure during pregnancy to glycol ethers and chlorinated solvents and the risk of congenital malformations. *Epidemiology* 2012;23:806–812.
- Correa A, Gray RH, Cohen R, Rothman N, Shah F, Seacat H, Com M. Ethylene Glycol Ethers and Risks of Spontaneous Abortion and Subfertility. *Am J Epidemiol* 1996;143:707–717.
- Dayan C, Hales BF. Effects of ethylene glycol monomethyl ether and its metabolite, 2-methoxyacetic acid, on organogenesis stage mouse limbs in vitro. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2014;101:254–261.
- Desquilbet L, Mariotti F. Dose-response analyses using restricted cubic spline functions in public health research. *Stat Med* 2010;29:1037–1057.
- ECETOC. Technical Report 95; The toxicology of glycol ethers and its relevance to man. 4th ed Burssele [Internet] 2005; Available from: <http://library.wur.nl/WebQuery/edepot/185449>.
- Eskenazi B, Gold EB, Samuels SJ, Wight S, Lasley BL, Hammond SK, O'Neill M, Schenker MB. Prospective assessment of fecundability of female semiconductor workers. *Am J Ind Med* 1995;28:817–831.
- Garlantézec R, Multigner L, Labat L, Bonvallot N, Pulkkinen J, Dananché B, Monfort C, Rouget F, Cordier S. Urinary biomarkers of exposure to glycol ethers and chlorinated solvents during pregnancy: determinants of exposure and comparison with indirect methods of exposure assessment. *Occup Environ Med* 2012;69:62–70.

Garlantézec R, Warembourg C, Monfort C, Labat L, Pulkkinen J, Bonvallet N, Multigner L, Chevrier C, Cordier S. Urinary glycol ether metabolites in women and time to pregnancy: the PELAGIE cohort. *Environ Health Perspect* 2013;121:1167–1173.

Giton F, Urien S, Born C, Tichet J, Guéchet J, Callebert J, Bronsard F, Raynaud JP, Fiet J. Determination of bioavailable testosterone [non sex hormone binding globulin (SHBG)-bound testosterone] in a population of healthy French men: influence of androstenediol on testosterone binding to SHBG. *Clin Chem* 2007;53:2160–2168.

Goeman JJ, Solari A. Multiple Testing for Exploratory Research. *Stat Sci* 2011;26:584–597. Institute of Mathematical Statistics.

Heindel JJ, Gulati DK, Russell VS, Reel JR, Lawton AD, Lamb JC. Assessment of ethylene glycol monobutyl and monophenyl ether reproductive toxicity using a continuous breeding protocol in Swiss CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 1990;15:683–696.

Henley D V, Mueller S, Korach KS. The short-chain fatty acid methoxyacetic acid disrupts endogenous estrogen receptor- α -mediated signaling. *Environ Health Perspect* 2009;117:1702–1706.

Hollier LP, Keelan JA, Hickey M, Maybery MT, Whitehouse AJO. Measurement of androgen and estrogen concentrations in cord blood: accuracy, biological interpretation, and applications to understanding human behavioral development. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:64.

Hsieh G-Y, Wang J-D, Cheng T-J, Chen P-C. Prolonged menstrual cycles in female workers exposed to ethylene glycol ethers in the semiconductor manufacturing industry. *Occup Environ Med* 2005;62:510–516.

Inserm. Ethers de glycol : Quels risques pour la santé ? 1999; Les éditions Inserm, France.

Inserm. Éthers de glycol : Nouvelles données toxicologiques. 2006; Les éditions Inserm, France.

Jin Y, Hein MJ, Deddens JA, Hines CJ. Analysis of lognormally distributed exposure data with repeated measures and values below the limit of detection using SAS. *Ann Occup Hyg* 2011;55:97–112.

Keelan JA, Mattes E, Tan H, Dinan A, Newnham JP, Whitehouse AJO, Jacoby P, Hickey M. Androgen concentrations in umbilical cord blood and their association with maternal, fetal and obstetric factors. *PLoS One* 2012;7:e42827.

Kuijper EAM, Ket JCF, Caanen MR, Lambalk CB. Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2013;27:33–63.

Labat L, Humbert L, Dehon B, Multigner L, Garlantezec R, Nisse C, Lhermitte M. Dosage des métabolites urinaires des éthers de glycol par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. *Ann Toxicol Anal* 2008;20:227–232.

Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, Rousselle C. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Health* 2015;14:13.

Lorente C, Cordier S, Bergeret A, Walle HE De, Goujard J, Aymé S, Knill-Jones R, Calzolari E, Bianchi F. Maternal occupational risk factors for oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Scand J Work Environ Health* 2000;26:137–145.

Morohoshi K, Yamamoto H, Kamata R, Shiraishi F, Koda T, Morita M. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicol In Vitro* 2005;19:457–469.

Multigner L, Brik E Ben, Arnaud I, Haguenoer JM, Jouannet P, Auger J, Eustache F. Glycol ethers and semen quality: a cross-sectional study among male workers in the Paris Municipality. *Occup Environ Med* 2007;64:467–473.

Nagano K, Nakayama E, Oobayashi H, Nishizawa T, Okuda H, Yamazaki K. Experimental studies on toxicity of ethylene glycol alkyl ethers in Japan. *Environ Health Perspect* 1984;57:75–84. National Institute of Environmental Health Science.

Ratcliffe JM, Schrader SM, Clapp DE, Halperin WE, Turner TW, Hornung RW. Semen quality in workers exposed to 2-ethoxyethanol. *Br J Ind Med* 1989;46:399–406.

Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1990;1:43–46.

Samuels SJ, McCurdy SA, Pocekay D, Hammond SK, Missell L, Schenker MB. Fertility history of currently employed male semiconductor workers. *Am J Ind Med* 1995;28:873–882.

Schenker MB, Gold EB, Beaumont JJ, Eskenazi B, Hammond SK, Lasley BL, McCurdy SA, Samuels SJ, Saiki CL, Swan SH. Association of spontaneous abortion and other reproductive effects with work in the semiconductor industry. *Am J Ind Med* 1995;28:639–659.

Selva DM, Tirado OM, Toràn N, Suárez-Quian CA, Reventos J, Munell F. Estrogen receptor beta expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene. *Biol Reprod* 2004;71:1461–1468.

Tirado OM, Martínez ED, Rodríguez OC, Danielsen M, Selva DM, Reventós J, Munell F, Suárez-Quian CA. Methoxyacetic acid dysregulation of androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat testis. *Biol Reprod* 2003;68:1437–1446.

Tirado OM, Selva DM, Toràn N, Suárez-Quian CA, Jansen M, McDonnell DP, Reventós J, Munell F. Increased expression of estrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration. *J Androl* 2004;25:84–94.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, Shioda T, Soto AM, Saal FS vom, Welshons W V, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 2012;33:378–455.

Veulemans H, Steeno O, Masschelein R, Groeseneken D. Exposure to ethylene glycol ethers and spermatogenic disorders in man: a case-control study. *Br J Ind Med* 1993;50:71–78.

Wade MG, Kawata A, Williams A, Yauk C. Methoxyacetic acid-induced spermatocyte death is associated with histone hyperacetylation in rats. *Biol Reprod* 2008;78:822–831.

Welch LS, Schrader SM, Turner TW, Cullen MR. Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: II. Male reproduction. *Am J Ind Med* 1988;14:509–526.

Zambrano E, Guzmán C, Rodríguez-González GL, Durand-Carbajal M, Nathanielsz PW. Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382:538–549.

Supplementary data

Supplemental Table I. Products that contain GE in France 2000-2006* and their main metabolites (Sources: AFSSET 2008).

	GE ^a	Metabolites
Paints, varnishes, inks	PGME	2-MPA^b
	EGBE	BAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	DEGEE	EEAA, EAA
	TEGEE	EEAA, EAA
	EGnPE	PAA
Biocides	PGME	2-MPA^b
	EGBE	BAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	DEGEE	EEAA, EAA
	EGPhE	PhAA
Cleaning agents	DEGEE	EEAA, EAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	EGBE	BAA
	PGME	2-MPA^b
	DEGME	MEAA, MAA
	TEGME	MEAA, MAA
	TEGDME	MAA
Cosmetics	EGPhE	PhAA
	EGBE	BAA
	DEGBE	BEAA, BAA
	DEGEE	EEAA, EAA
Drugs	EGDME	MAA
	DEGDME	MAA
	DEGEE	EEAA, EAA
	EGPhE	PhAA
	EGDME	MAA
	DEGDME	MAA

Bold text corresponds to metabolites included in the present study.

DEGBE, diethylene glycol butylether; DEGDME, diethylene glycol dimethyl ether; DEGEE, diethylene glycol ethylether; DEGME, diethylene glycol methylether; EGBE, ethylene glycol butylether; EGDME, ethylene glycol dimethyl ether; EGnPE, ethylene glycol n-propylether; EGPhE, ethylene glycol phenylether; PGME, propylene glycol methylether; TEGDME, triethylene glycol dimethylether; TEGEE, triethylene glycol ethylether; TEGME, triethylene glycol methylether. 2-MPA, 2-methoxypropionic acid; BAA, 2-butoxyacetic acid; EAA, ethoxyacetic acid; EEAA, ethoxyethoxyacetic acid; MAA, methoxyacetic acid; MEAA, methoxyethoxyacetic acid; PAA, n-propoxyacetic acid; PhAA, phenoxyacetic acid;

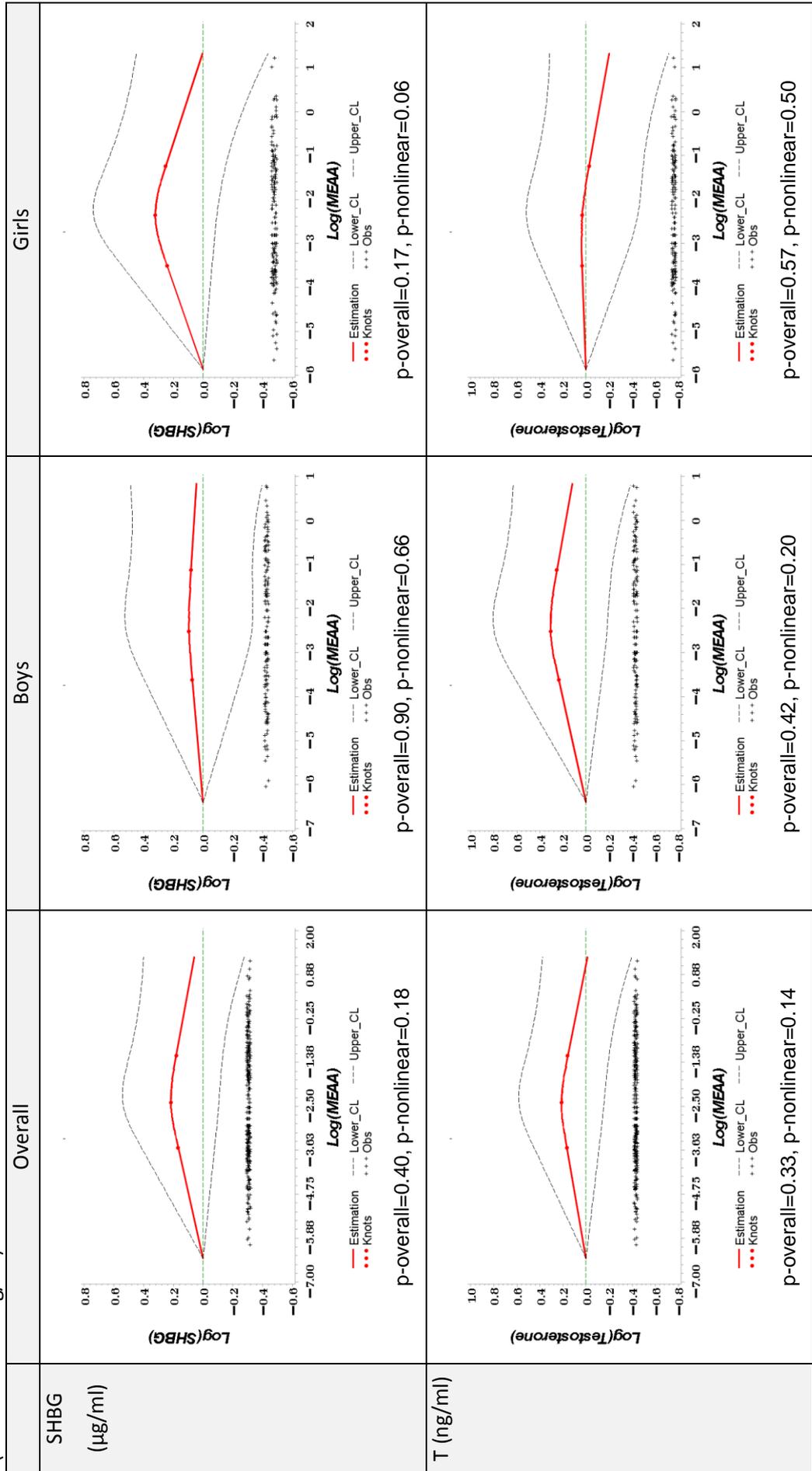
*Ethylene glycol methylether (EGME) and ethylene glycol ethylether (EGEE), mainly metabolized in MAA and EAA respectively, have been banned in France before the initiation of the cohorts. EGDME and DEGDME have been regulated in 2004.

^a GEs are presented for products by most to least frequently used.

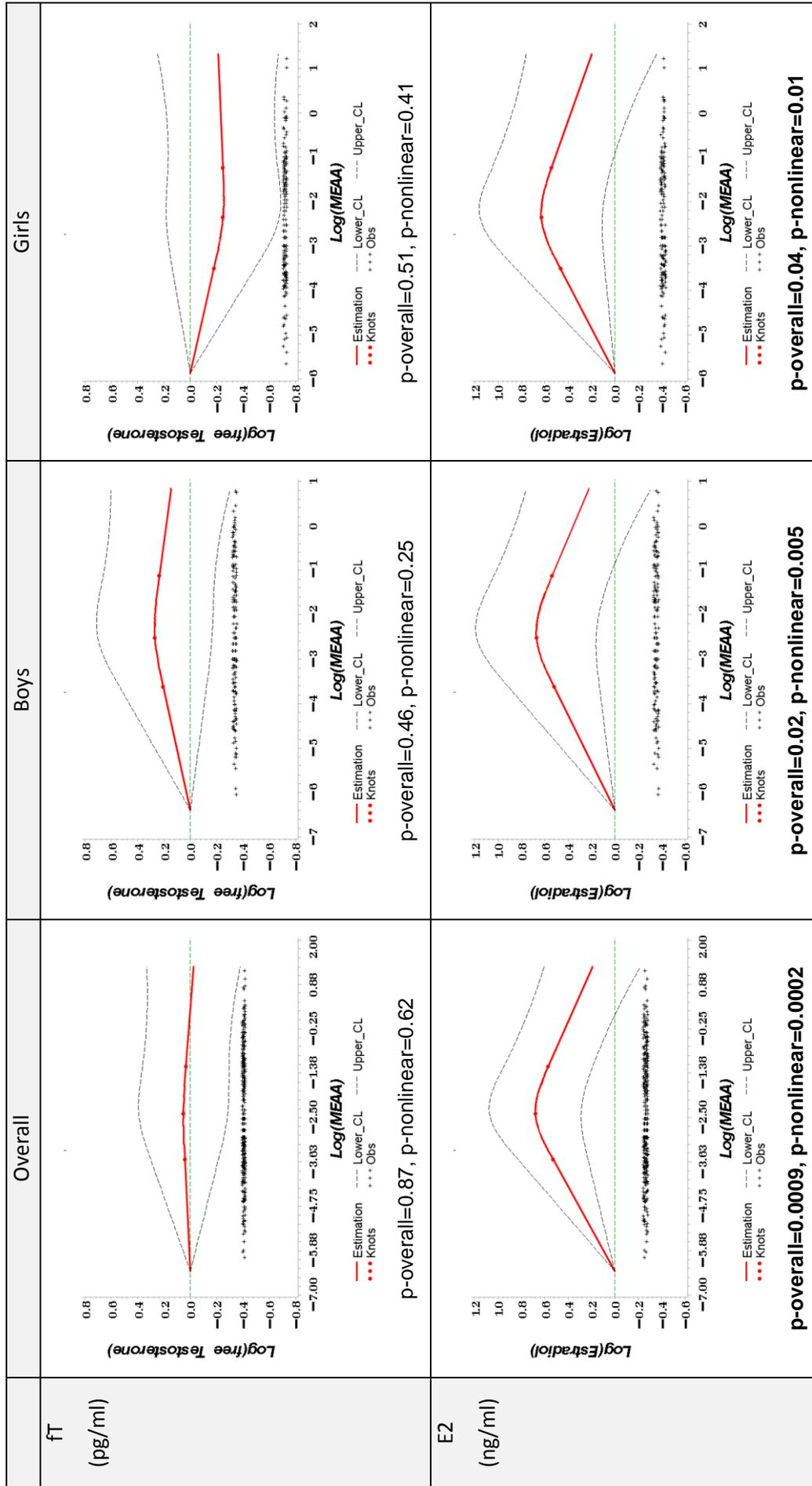
^b Metabolite derived from minor β isomer of PGME.

Supplemental Figure 1. Restricted cubic splines between prenatal exposure to MEAA and levels of sex hormones.

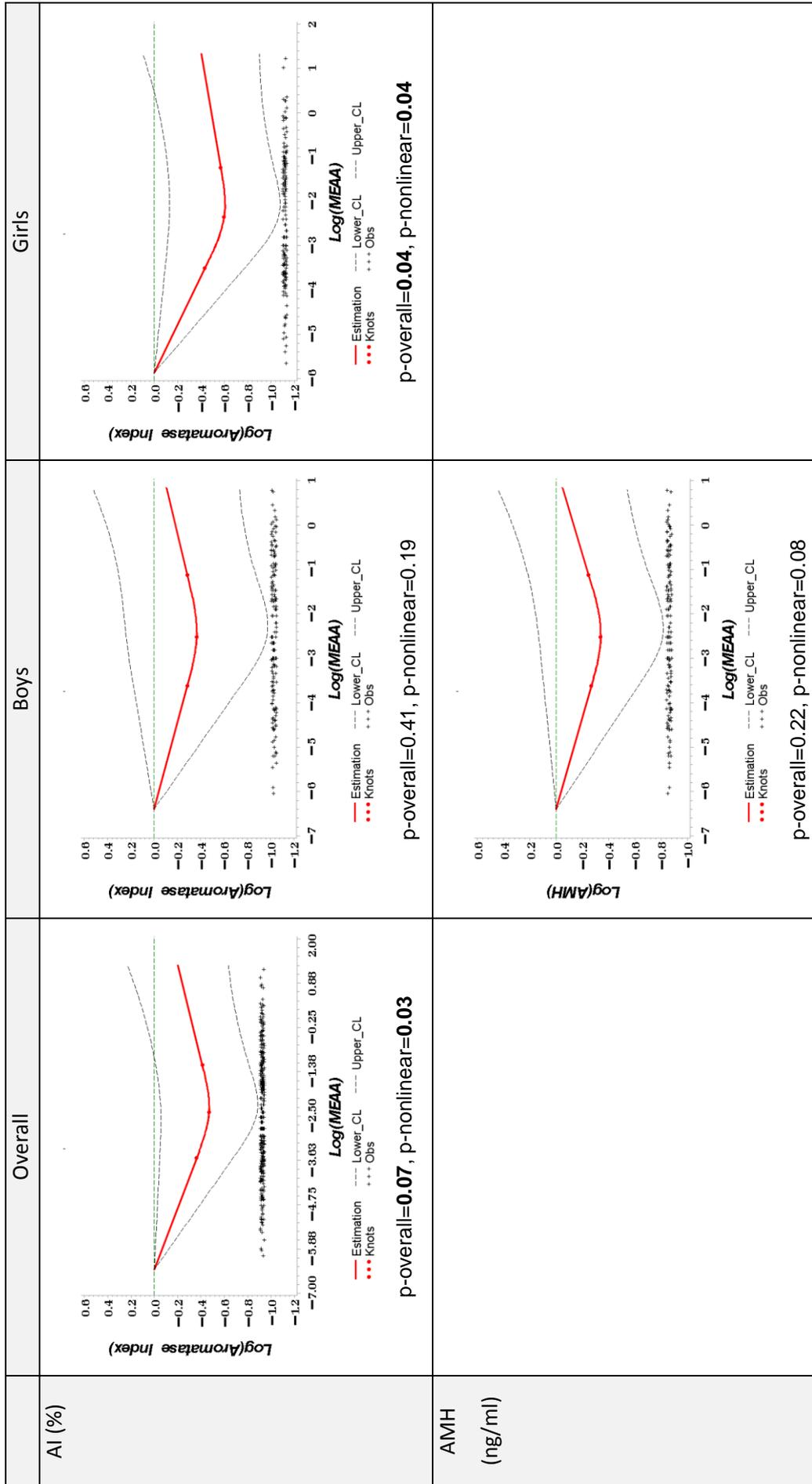
Adjusted dose-response association between MEAA (log-scale, mg/l) and sex hormone concentrations (log-scale). MEAA levels were coded using restricted cubic spline functions with three knots located at the 25th, 50th, and 75th percentiles of the distribution. Y-axis represents the difference in hormone levels between individuals with any value of MEAA with low exposure (ie, minimal value of the distribution). Adjusted for gestational age at birth (continuous), newborn sex, maternal age (continuous), parity (nulliparous, primiparous), creatinine levels (continuous), type of stabilizer (hydrochloric or nitric acid) and degree of hemolysis of the cord blood sample (low, moderate, high). Results for SHBG and FT were additionally adjusted for body mass index (<25 versus ≥ 25 kg/m²)



Supplemental Figure 1. Restricted cubic splines between prenatal exposure to MEAA and levels of sex hormones (continued)

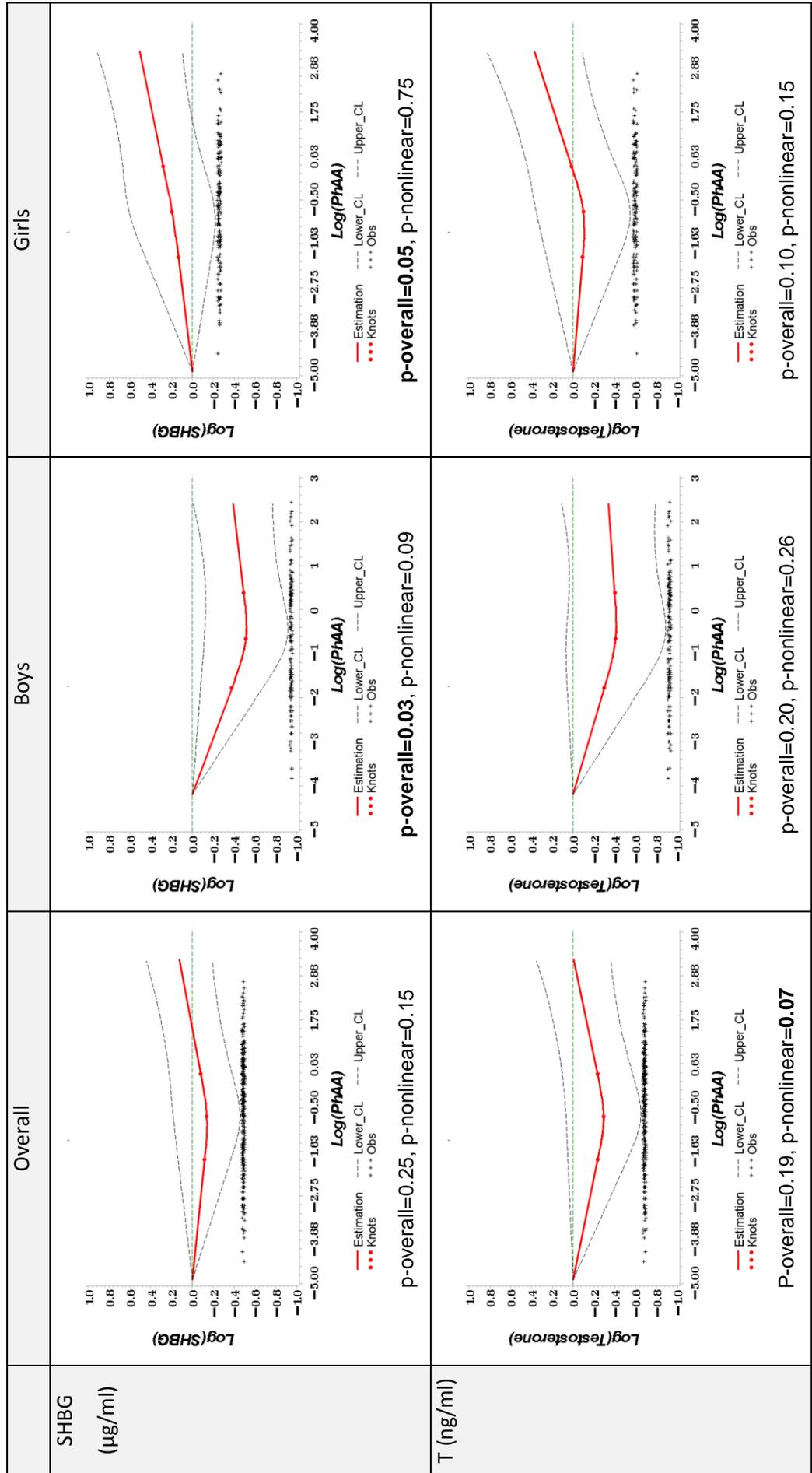


Supplemental Figure 1. Restricted cubic splines between prenatal exposure to MEAA and levels of sex hormones (continued)

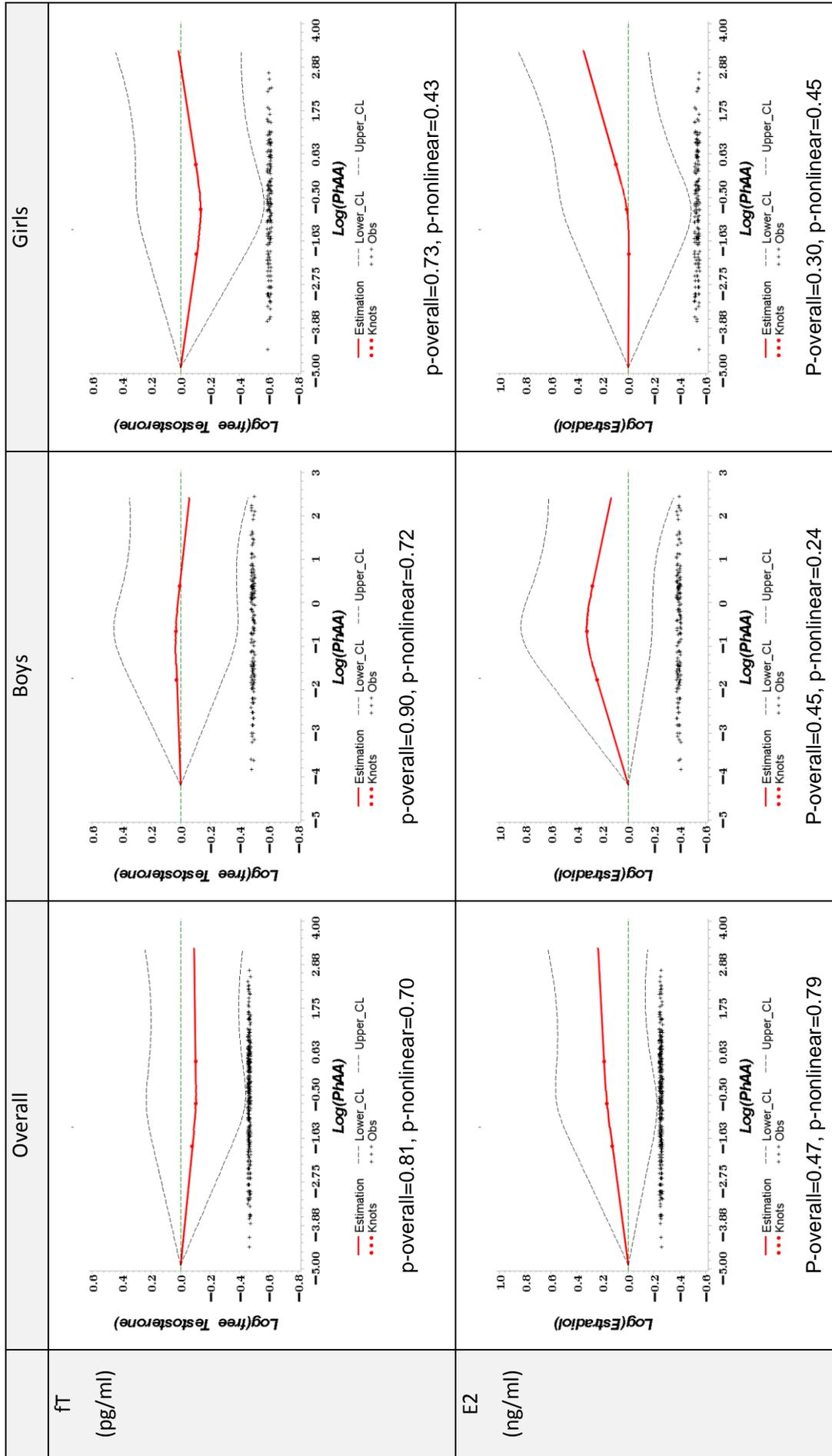


Supplemental Figure 2. Restricted cubic splines between prenatal exposure to PhAA and level of sex hormones.

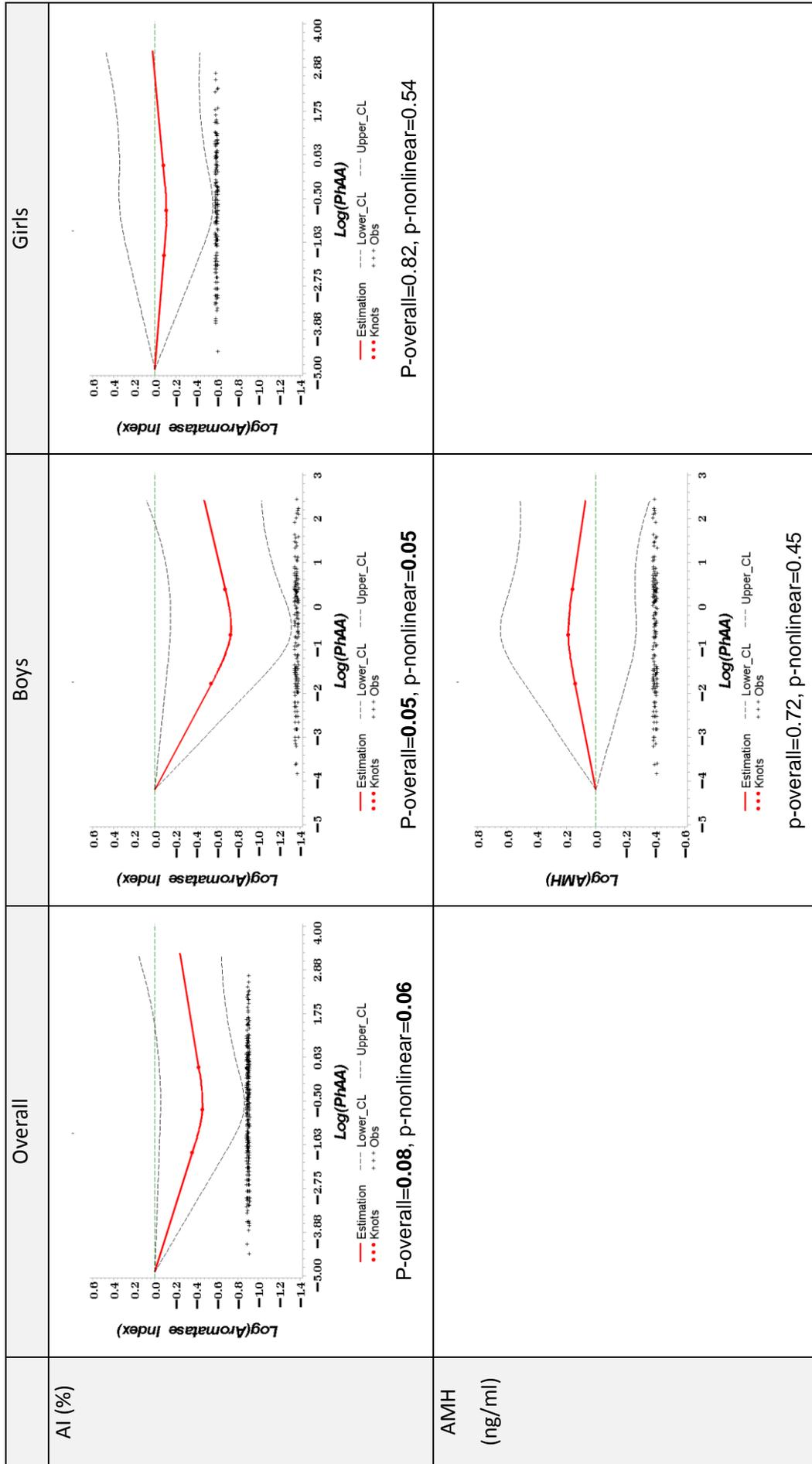
Adjusted dose-response association between PhAA (log-scale, mg/l) and sex hormone concentrations (log-scale). PhAA levels were coded using restricted cubic spline functions with three knots located at the 25th, 50th, and 75th percentiles of the distribution. Y-axis represents the difference in hormone levels between individuals with any value of MEAA with individuals with low exposure (ie, minimal value of the distribution). Adjusted for gestational age at birth (continuous), newborn sex, maternal age (continuous), parity (nulliparous, primiparous), creatinine levels (continuous), type of stabilizer (hydrochloric or nitric acid) and degree of hemolysis of the cord blood sample (low, moderate, high). Results for SHBG and fT were additionally adjusted for body mass index (<25 versus ≥ 25 kg/m²)



Supplemental Figure 2. Restricted cubic splines between prenatal exposure to PhAA and level of sex hormones (continued)

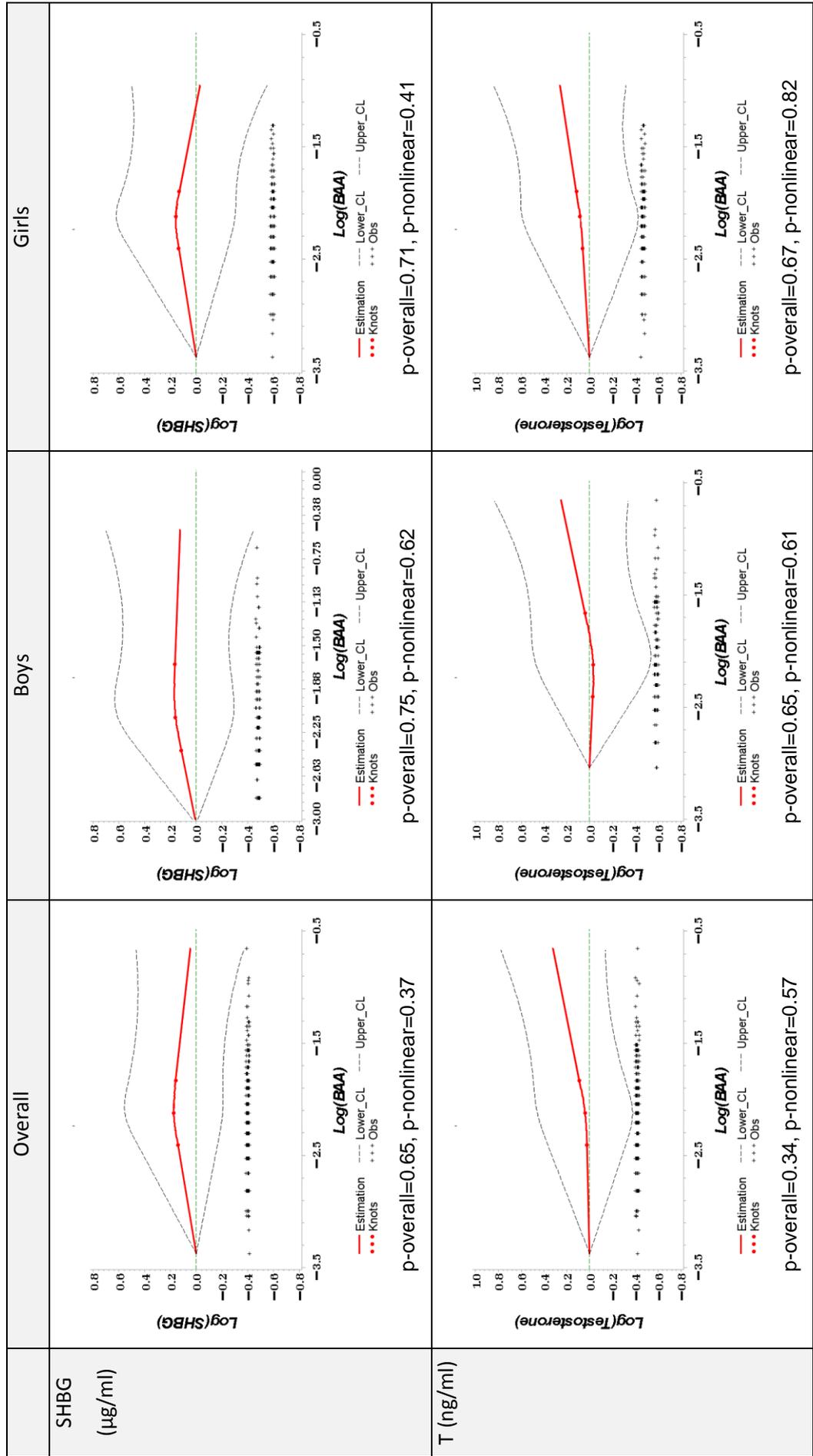


Supplemental Figure 2. Restricted cubic splines between prenatal exposure to PhAA and level of sex hormones (continued)

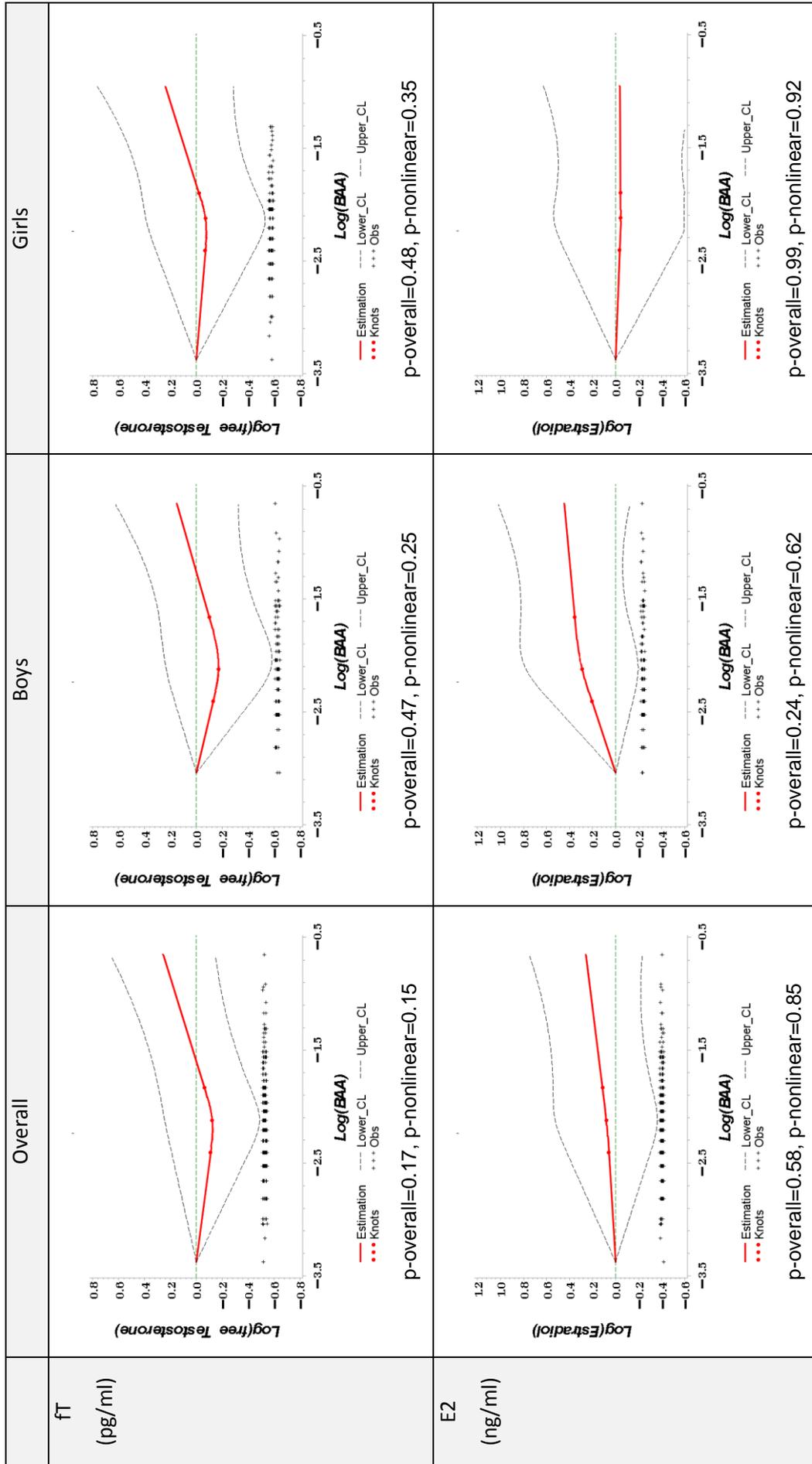


Supplemental Figure 3. Restricted cubic splines between prenatal exposure to BAA and level of sex hormones.

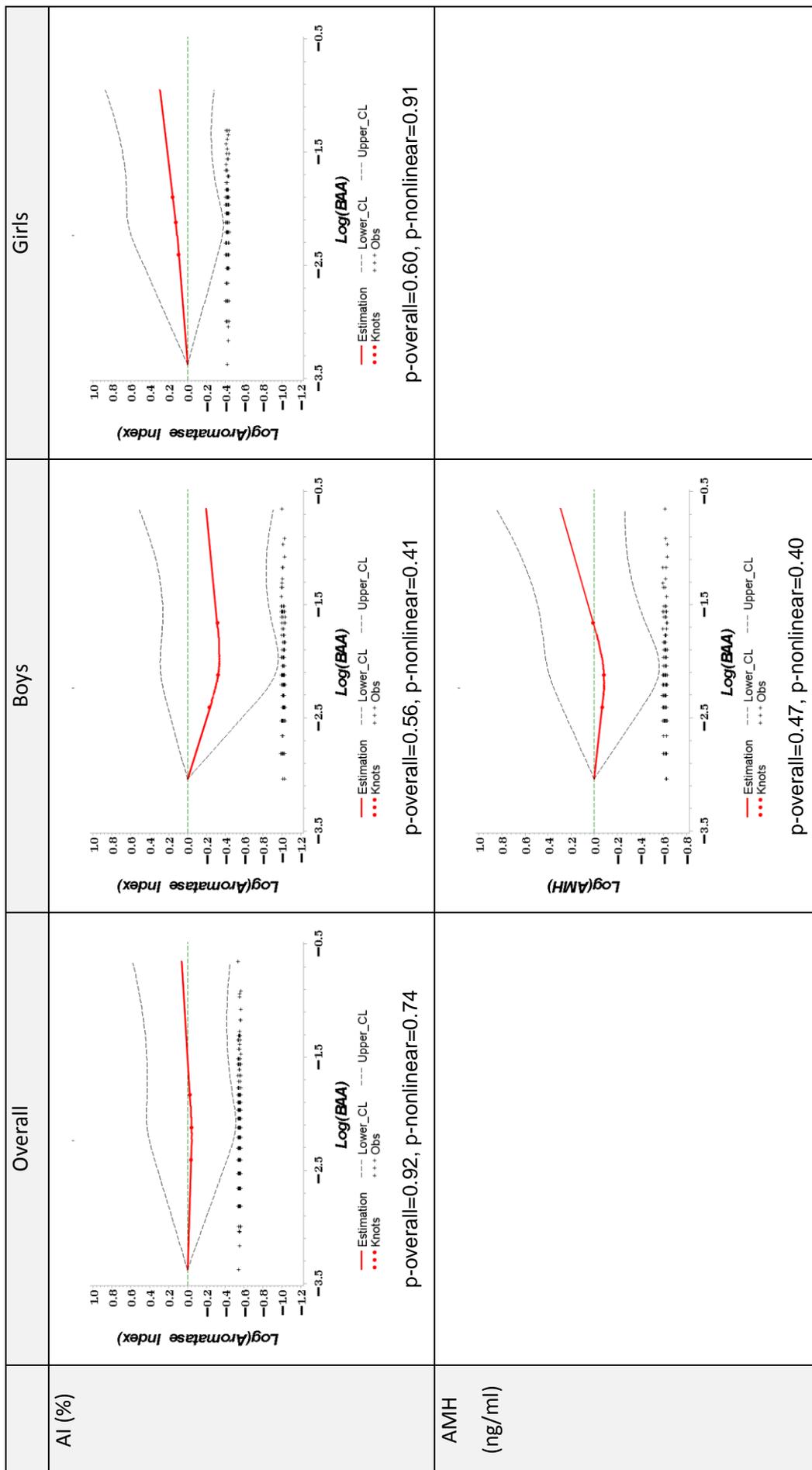
Adjusted dose-response association between BAA (log-scale, mg/l) and sex hormone concentrations (log-scale). BAA levels were coded using restricted cubic spline functions with three knots located at the 25th, 50th, and 75th percentiles of the distribution. Y-axis represents the difference in hormone levels between individuals with any value of MEAA with low exposure (ie, minimal value of the distribution). Adjusted for gestational age at birth (continuous), newborn sex, maternal age (continuous), parity (nulliparous, primiparous), creatinine levels (continuous), and degree of hemolysis of the cord blood sample (low, moderate, high). Results for SHBG and fT were additionally adjusted for body mass index (<25 versus ≥25 kg/m²).



Supplemental Figure 3. Restricted cubic splines between prenatal exposure to BAA and level of sex hormones (continued).



Supplemental Figure 3. Restricted cubic splines between prenatal exposure to BAA and level of sex hormones (continued).



CHAPITRE 4

DISCUSSION GENERALE

4.1. SYNTHÈSE DES RESULTATS

En utilisant un schéma d'étude prospectif et des mesures par biomarqueurs de l'exposition prénatale à des polluants chimiques, définies à proximité de la fenêtre de vulnérabilité, nous avons observé des associations significatives entre l'exposition maternelle aux POP et aux EG et la survenue d'indicateurs d'anomalie du développement du système reproducteur à la naissance et impliquant le système endocrinien.

Dans notre première étude portant sur l'exposition aux POP, des modifications des concentrations d'hormones dans le sang de cordon ombilical ont été observées. L'exposition aux PCB et certains pesticides organochlorés (HCB, HCE et α -endosulfan) a notamment été associée à une augmentation des concentrations de SHBG (et d'E2 pour l'HCE et l' α -endosulfan) et des diminutions des concentrations de testostérone libre et de l'*Index Aromatase* (AI). Certaines de ces associations étaient plus marquées, ou spécifiques, chez les garçons ou les filles. Une augmentation des concentrations d'AMH est également observée pour les niveaux d'exposition aux PCB les plus élevés ainsi qu'une diminution des concentrations de testostérone avec la détection de PBDE209 (chez les garçons). Nous n'avons pas rapporté d'association statistiquement significative avec l'exposition prénatale aux autres POP incluant le p,p'-DDE, le β -HCH, le γ -HCH et la dieldrine. Bien que nos résultats ne soient pas concordants avec la seule autre étude s'étant intéressée aux niveaux d'hormones sexuelles dans le sang de cordon [296], ils le sont avec les études montrant une diminution de l'AI et une augmentation de la SHBG à un âge plus avancé (8-20 ans) après exposition prénatale aux PCB [299,302–304].

Chez l'animal, les mécanismes de perturbation endocrinienne de plusieurs POP ont été démontrés mais leurs effets chez l'Homme sont encore controversés. Du fait de la cascade de réactions enzymatiques impliquée dans la stéroïdogénèse et du potentiel de compensation de l'organisme vis-à-vis d'une modification physiologique, il est difficile d'établir un lien entre l'activité endocrinienne d'une substance observée *in vitro* et une modification des niveaux d'hormones circulantes. Cependant, les résultats présentés dans cette première étude suggèrent que l'exposition aux POP pendant la gestation affecterait les fonctions du système endocrinien dès la période fœtale et se traduirait par une modification de l'équilibre hormonal. Les conséquences de telles modifications sur la santé reproductive à la puberté et à l'âge adulte devront être confirmées.

Concernant l'exposition prénatale aux éthers de glycol, nous avons observé pour le MAA et l'EAA, qui sont les deux métabolites pour lesquels la toxicité testiculaire est la mieux documentée, une augmentation du risque d'hypospade et une diminution des concentrations de testostérone (totale ou libre) à la naissance. L'exposition au 2-MPA a également été associée à une augmentation du risque de malformations de l'appareil génital du garçon et des augmentations des concentrations de

testostérone et d'œstradiol ont été suggérées. Pour l'exposition à l'EEAA et au PhAA, il n'y a pas d'évidence d'une augmentation du risque de malformations génitales (une diminution du risque est même rapportée) mais, pour le PhAA, une diminution des concentrations de testostérone et de SHBG ainsi qu'une variation non monotone de l'AI sont suggérées chez le garçon. A l'inverse, chez les filles, on observe une augmentation des concentrations de SHBG avec l'exposition à l'EEAA et au PhAA. Enfin, des relations non monotones entre l'exposition au MEAA et les concentrations d'E2 et l'AI sont observées, et sont plus particulièrement marquées chez les filles. Quelques associations sont suggérées avec l'exposition au BAA (augmentation des concentrations d'E2 et d'AMH chez les garçons, augmentation de FT chez les filles) mais aucune avec l'exposition au PrAA. L'étude de certaines autres hormones impliquées dans le développement du système génital, telles que la DHT ou l'INSL-3, pourrait permettre de compléter ces résultats.

Les solvants, et plus particulièrement les éthers de glycol, sont souvent cités comme exemple de molécules reprotoxiques qui agissent par des mécanismes de toxicité directe. Il a été démontré chez l'animal mature que certains éthers de glycol (dont l'EGME et son métabolite le MAA) exerçaient une toxicité directe au niveau cellulaire (apoptose), qui s'est révélée hautement spécifique pour la lignée cellulaire germinale (spermatocytes), entraînant ainsi une diminution de la fertilité [338,339]. Cette apoptose des cellules germinales se produirait à la suite de signaux transmis par les cellules de Sertoli, qui seraient donc le siège de l'action toxique des éthers de glycol. Des études ont d'ailleurs montré que le MAA altérait l'expression des récepteurs des hormones stéroïdiennes ou de leurs protéines de transport [355,356,359]. Bien que le MAA ne semble pas interagir directement avec ces récepteurs [359], l'implication de mécanismes de perturbation endocrinienne ne peut être exclue. Les résultats observés dans la présente thèse concernant le risque de malformations génitales d'une part et des variations d'hormones sexuelles d'autre part, suggèrent le caractère potentiel de perturbateur endocrinien de certains métabolites d'éthers de glycol. Les études expérimentales évaluant les capacités endocriniennes des éthers de glycol et de leurs métabolites sont limitées puisque seuls le MAA (effets œstrogéniques et androgéniques) et le PhAA (effets œstrogéniques seulement) ont été testés. De même, la présence de malformation génitale n'est majoritairement pas évaluée dans les études animales. Il est ainsi nécessaire de réaliser des études toxicologiques supplémentaires, en suivant les recommandations de l'OCDE pour l'évaluation des perturbateurs endocriniens, afin d'enrichir les connaissances sur les mécanismes de toxicité des éthers de glycol. Chez l'Homme, très peu d'études ont été publiées mais on peut citer les résultats d'une étude réalisée chez des hommes exposés professionnellement et pour lesquels une diminution des niveaux de testostérone a été suggérée en association avec les niveaux urinaires de 2-MPA, mais pas de BAA [381]. En population générale, un allongement du délai nécessaire à concevoir a été observé en association avec les niveaux de PhAA urinaires (pas d'association pour les autres métabolites

mesurés) [387]. A notre connaissance, aucune étude portant sur le risque de malformation génitale n'a été publiée (excepté celle utilisant les données de la cohorte PELAGIE).

Beaucoup d'EG sont connus et étiquetés en tant que substances reprotoxiques et sont par conséquent très restreints d'usage en Europe (EGME, EGEE, EGDME, EGDEE, DEGDME, TEGDME, 1PG2ME). Mais là où l'évaluation des risques est imparfaite, c'est que la toxicité des EG est évaluée individuellement, sans prendre en compte le fait que plusieurs EG sont des précurseurs d'un même métabolite, dont certains sont reconnus comme toxiques. A titre d'exemple, l'EGME et l'EGDME sont majoritairement métabolisés en MAA tandis que le DEGME ou le TEGME (non restreints) sont majoritairement métabolisés en MEAA mais également, de façon minoritaire, en MAA (Tableau 7). Ainsi, la présence de métabolites dont les principaux EG précurseurs sont restreints d'utilisation, dans les urines des femmes enceintes, pourraient provenir de l'exposition à d'autres EG toujours autorisés.

4.2. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES

4.2.1. Schéma d'étude

Les trois études présentées dans cette thèse reposent sur les données recueillies à partir de cohortes mère-enfant. Du fait de son caractère prospectif, ce type d'étude possède un niveau de preuve élevé en épidémiologie. Les deux études portant sur les variations des niveaux d'hormones sexuelles ont été réalisées à partir de sous-groupes sélectionnés aléatoirement au sein de la cohorte PELAGIE. Cette sélection aléatoire permet la représentativité du sous-groupe étudié vis-à-vis de la cohorte source. A noter que l'on observe une surreprésentation des femmes avec un niveau d'études élevé dans la cohorte (>60% d'études supérieures).

L'étude des malformations de l'appareil génital du garçon a été réalisée à partir d'une étude cas-témoin nichée dans les cohortes PELAGIE et EDEN. Ce type de schéma d'étude combinant les données de plusieurs cohortes présente l'avantage d'accroître l'effectif total et donc d'augmenter *a priori* la puissance, cependant celle-ci peut aussi être diminuée en cas d'hétérogénéité entre les cohortes [396]. Les sources possibles d'hétérogénéité identifiées dans la présente étude concernent le recrutement, la définition des cas ainsi que le recueil (âge gestationnel) et le stockage des prélèvements urinaires (cf Tableau 12). L'appariement des cas et des témoins sur la région d'inclusion et l'âge gestationnel au moment du prélèvement d'urines, suivi de l'utilisation de modèles de régressions logistiques conditionnelles, permet de contrôler en partie ces différences entre cohortes. Cependant, les intervalles de confiance obtenus de cette façon sont larges et sont le reflet d'un manque de puissance lié au faible effectif mais aussi probablement de l'hétérogénéité entre cohortes. Nous avons observé que les concentrations urinaires d'EG sont plus élevées chez les femmes EDEN que chez les femmes PELAGIE, or puisque la catégorisation de l'exposition a été réalisée à partir de l'ensemble des témoins (EDEN et PELAGIE), la cohorte EDEN est surreprésentée dans les catégories d'exposition les plus élevées et la cohorte PELAGIE dans les catégories d'exposition les plus faibles. Cela peut avoir pour conséquence d'augmenter les incertitudes autour des estimateurs mais aussi de créer artificiellement une association entre les catégories d'exposition aux EG et le risque de malformation (reflétant un effet cohorte) [396]. Les résultats publiés précédemment à partir des données de la cohorte PELAGIE (étude cas-témoin nichée sans appariement) suggéraient une augmentation du risque de malformation génitale en association avec l'exposition à l'EAA et dans une moindre mesure au MAA (pas d'estimation pour le 2-MPA compte tenu du faible taux de détection) [207]. Au sein de la cohorte EDEN, on observe également des OR augmentés (non significatifs) en association avec ces deux métabolites et une augmentation significative du risque avec le 2-MPA (cf Annexe 2, Tableau 13). Au vu de cette concordance entre les deux sous-populations, il est raisonnable de penser que les associations observées dans l'étude les combinant ne traduisent pas d'un effet cohorte.

Enfin, il est aussi probable que l'appariement effectué entre les cas et les témoins ait également eu un impact sur la puissance statistique de l'étude. En effet, il est à noter que dans la première étude publiée à partir des données de la cohorte PELAGIE, les cas et les témoins n'étaient pas appariés, ce qui permettait d'utiliser un groupe témoins plus important (n=580). Une perte de puissance est ainsi observée lorsque l'on estime les risques au sein de la cohorte PELAGIE en tenant compte de l'appariement. La méthode de calcul des intervalles de confiance (*profile likelihood*) peut également être à l'origine d'une plus grande incertitude autour des estimations. Dans le cas de petits échantillons, ces intervalles de confiance fournissent une couverture plus réaliste que les intervalles de confiance standards (Wald) mais sont par conséquent plus larges. En d'autres mots, les intervalles de confiance de Wald sous-estiment la variabilité autour des estimateurs lorsque les effectifs sont faibles.

4.2.2. Evaluation des expositions

L'un des atouts des études de cohortes de naissances est qu'elles permettent une évaluation prospective des expositions au cours de la grossesse, notamment via le recueil de prélèvements biologiques (urines, sang, cheveux...). L'utilisation de biomarqueurs d'exposition est une méthode de choix pour estimer au mieux la dose interne d'exposition. Cependant, il est important de s'assurer que cette mesure est représentative de l'exposition reçue au cours de la fenêtre de susceptibilité de l'évènement de santé d'intérêt. Du fait de la longue demi-vie des POP qui se stockent dans les graisses, on peut raisonnablement considérer qu'une mesure de l'exposition à la naissance est représentative de l'exposition au cours de la grossesse. De plus, l'utilisation du sang de cordon ombilical permet de mieux appréhender le profil des molécules ayant traversé la barrière placentaire et donc le niveau d'exposition du fœtus. A l'inverse, les éthers de glycol sont des composés rapidement métabolisés en métabolites acides dont les demi-vies sont nettement plus courtes que celles des POP, de l'ordre de quelques heures à quelques jours. Ainsi, une mesure ponctuelle de ces métabolites peut être sujette à des erreurs de mesures au regard de la fenêtre d'exposition visée. Au sein de la cohorte PELAGIE, on observe des corrélations entre les concentrations ou la détection de métabolites d'EG et l'exposition professionnelle aux solvants évaluée à partir de l'intitulé de l'emploi de la mère pendant la grossesse et de matrices emplois-expositions [337]. On peut ainsi faire l'hypothèse que la mesure urinaire en début de grossesse représente un usage régulier au travail de produits contenant des éthers de glycol, du moins jusqu'à la mise en place de mesures de protection individuelle potentielles et du congé maternité (erreur de mesure plus importante pour EDEN). Cette mesure pourrait aussi en partie refléter un usage régulier à domicile via les cosmétiques et les produits d'entretien, mais qui tout comme les usages professionnels, peut avoir été modifié au cours de la grossesse et ne pas être représentatif de la fenêtre de susceptibilité d'intérêt. Ainsi, la mesure réalisée au début de la grossesse pour les femmes de la cohorte PELAGIE capture probablement le

niveau d'exposition au cours de la période d'organogénèse avec un biais de mesure moins important que pour les femmes de la cohorte EDEN dont le prélèvement a été fait au cours du 6^e mois de grossesse (mais qui est de fait plus proche de la période correspondant à la dernière phase de descente testiculaire). Les effets de l'exposition aux EG observés sur les niveaux d'hormones à la naissance traduiraient davantage une altération du développement du système endocrinien au début de la grossesse qu'un effet instantané.

La grossesse est associée à d'importantes modifications physiologiques chez la mère, qui peuvent impacter la distribution, le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques, et ainsi augmenter les erreurs de mesure dans l'évaluation des expositions effectuée à partir d'un seul prélèvement biologique au cours de la grossesse. La grossesse mobilise notamment les stocks de graisse, relarguant ainsi des composés lipophiles qui s'y sont accumulés, tels que les POP, dans la circulation sanguine. L'augmentation de la filtration glomérulaire (formation de l'urine primitive) pourrait également impacter l'élimination des xénobiotiques par les urines. Les modèles de pharmacocinétique-pharmacodynamie (PK-PD) sont essentiels pour mieux comprendre la toxicocinétique des xénobiotiques pendant la grossesse mais sont encore peu développés et difficiles à appréhender par les épidémiologistes. A défaut, la prise en compte des taux de lipides (sang) et de créatinine (urine) dans les modèles d'estimation des risques est aujourd'hui une méthode couramment utilisée pour tenter de corriger les erreurs de mesures liées à l'utilisation de biomarqueurs d'exposition.

On observe des niveaux de biomarqueurs d'exposition aux EG plus élevés dans la cohorte EDEN que dans la cohorte PELAGIE. Bien que nous ne puissions déterminer l'origine de ces différences, certaines hypothèses peuvent être proposées : 1) des niveaux d'exposition plus élevés dans EDEN que dans PELAGIE, 2) une dégradation des urines PELAGIE liée à l'envoi du prélèvement par voie postale par les femmes et à son stockage à -20°C (-80°C dans EDEN), 3) une différence de toxicocinétique entre le 1^{er} et le 2^e trimestre de grossesse (périodes de prélèvement respectives dans PELAGIE et EDEN), 4) une contamination des urines EDEN. Il est peu probable que ces différences correspondent à des situations d'exposition spécifiques des femmes de la cohorte EDEN : la superposition des périodes d'inclusion des deux cohortes garantit la comparabilité des circonstances d'exposition potentielles aux EG et globalement on n'observe pas de différence entre les caractéristiques maternelles des femmes EDEN et PELAGIE. La validation interne effectuée sur une trentaine d'échantillons PELAGIE envoyée aux deux laboratoires d'analyse écarte également la probabilité d'un effet laboratoire. Dans tous les cas, ces erreurs de mesure seraient probablement non-différentielles au sein de chacune des cohortes et auraient ainsi tendance à biaiser les résultats vers une sous-estimation des associations. Cependant, comme mentionné précédemment, une association artificielle pourrait être observée lorsque l'on combine les deux cohortes, du fait de la

sur-représentation des cas, et des sujets avec les concentrations de métabolites d'EG les plus élevées, dans la cohorte EDEN.

4.2.3. *Evaluation des anomalies du développement du système reproducteur*

Le sang de cordon ombilical est une matrice biologique qui peut facilement être recueillie à la naissance et qui permet la mesure des concentrations de stéroïdes fœtales en fin de grossesse. Les méthodes de dosage par spectrométrie de masse sont aujourd'hui recommandées pour mesurer les stéroïdes dans le sang de cordon. Cependant, la 1^{ère} série de dosages hormonaux, qui a été étudiée en association avec l'exposition aux POP, a été réalisée par radio-immunologie ce qui limite l'interprétation des résultats portant sur la testostérone. En connaissance de cause, la spectrométrie de masse a été choisie comme méthode analytique lors de la 2^e série de dosages hormonaux, en association avec l'exposition aux EG. Les deux études présentées dans cette thèse se sont limitées à l'étude de deux stéroïdes (testostérone et œstradiol) or nous avons vu dans le Chapitre 1, que leur synthèse résultait d'une cascade de réactions enzymatiques impliquant plusieurs autres stéroïdes (Figure 5). Il serait ainsi pertinent de s'intéresser aux variations de l'ensemble des stéroïdes pour mettre en évidence la ou les étapes de métabolisation qui sont potentiellement au siège de la perturbation hormonale.

Les cas de malformations de l'appareil génital du garçon ont été identifiés parmi les nouveau-nés inclus dans deux cohortes mère-enfant prospectives. Ce schéma d'étude permet de limiter le biais de sélection inhérent aux études cas-témoins classiquement mises en œuvre pour pallier la faible prévalence de cas de malformations. Le diagnostic de cryptorchidie, et dans une moindre mesure d'hypospade, s'avère délicat à la naissance et la confirmation de la présence d'une malformation génitale, au cours du suivi postnatal des enfants, garantit une bonne spécificité de l'évaluation des cas. Cependant, bien que la confirmation des cas garantisse un taux de faux positif a priori nul, le taux de faux négatif peut quant à lui s'avérer plus important (perdu de vue).

On observe, au sein de la cohorte EDEN, une prévalence plus importante de malformations de l'appareil génital, et en particulier de cryptorchidies, que dans la cohorte PELAGIE. Ces différences peuvent être liées au mode d'identification et de confirmation des cas. A la naissance, l'utilisation d'un questionnaire plus détaillé dans la cohorte EDEN (position exacte du testicule) pourrait avoir engendré un sur-diagnostic de cryptorchidies (ex : testicule rétractile ou en position supra-scrotale). On observe d'ailleurs une plus forte proportion de testicules en position inguinale superficielle (74% contre 45% pour PELAGIE). Les méthodes de confirmation des cas sont également différentes entre les deux cohortes mais aboutissent à une même proportion de cryptorchidies confirmées (27-28%). Pour les enfants EDEN dont le testicule n'était pas encore en place à l'âge de 1 an, il était peu probable que celui-ci descende spontanément après cet âge. Une opération chirurgicale étant

souvent proposée dans l'année qui suit, nous aurions très certainement identifié ces cas en interrogeant les chirurgiens pédiatriques, comme cela a été fait dans PELAGIE. De même, si les cas confirmés dans PELAGIE avaient été examinés à 1 an, leur testicule n'aurait pas été en place. Enfin, ces différences de prévalences pourraient aussi s'expliquer par un biais de sélection lié au mode de recrutement des femmes enceintes : l'ensemble des femmes de la cohorte EDEN ont accouché dans un CHU (critère d'inclusion) contre 20% des femmes PELAGIE. Il est probable que les profils des femmes accouchant dans un CHU diffèrent des profils des femmes accouchant dans un autre type d'établissement, en particulier en termes de risques associés à la grossesse (maternités de niveau 3). Or, si les facteurs de risque d'accoucher dans un CHU sont également associés au risque de malformation génitale, alors cela peut entraîner une surreprésentation des cas dans la cohorte EDEN.

Les différences de résultats observés en étudiant l'ensemble des cas identifiés à la naissance et en se limitant aux cas confirmés peuvent refléter un manque de spécificité à la naissance qui aura pour conséquence de sous-estimer le risque. Pour les cryptorchidies, on peut aussi faire l'hypothèse que les mécanismes impliqués dans la survenue d'une cryptorchidie dont la descente testiculaire est spontanée sont différents de ceux d'une cryptorchidie qui va persister. De même, les mécanismes dirigeant la descente testiculaire et la fermeture du méat urinaire sont différents et il n'est donc pas incohérent d'observer des associations différentes avec l'une ou l'autre des malformations. Pour le risque de cryptorchidie, l'absence d'association peut également résulter d'une erreur de mesure dans l'évaluation de l'exposition (réalisée avant la 28^e semaine d'aménorrhée) au regard de la période de susceptibilité pour la descente inguino-scrotale des testicules.

4.3. REGLEMENTATION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

4.3.1. La position actuelle de la Commission Européenne

Bien que des réglementations existent pour encadrer l'utilisation des substances chimiques (ex : REACH), il n'existe pas de réglementation sur l'encadrement des perturbateurs endocriniens à proprement parlé du fait de l'absence de critères harmonisés permettant de les qualifier comme tels. Dans cet objectif, le Parlement Européen a ainsi chargé la Commission Européenne de définir les critères d'évaluation des perturbateurs endocriniens avant la fin de l'année 2013 mais celle-ci a manqué à ses obligations. Le 16 décembre 2015, la Commission Européenne a été condamnée par la Cour de Justice de l'Union Européenne pour ne pas avoir mis en place de cadre réglementaire. Six mois plus tard, le 15 juin 2016, la Commission Européenne a rendu son rapport et a défini comme perturbateur endocrinien «une substance qui a des effets indésirables sur la santé humaine, qui agit sur le système hormonal et dont le lien entre les deux est prouvé». Cette définition, restreinte aux seuls effets chez l'Homme et pour lesquels une relation causale est mise en évidence, a provoqué un tollé au sein de la communauté scientifique. En effet, il faudra attendre que les effets soient visibles sur la santé humaine avant d'agir (et non plus des suspicions ou des études réalisées sur les animaux), ce qui va à l'encontre du principe de précaution. De plus, les effets nocifs observés devront être causés par une action à travers le système hormonal, ce qui chez l'Homme, est difficile à établir avec certitude au vu des limites inhérentes aux études épidémiologiques. La Commission Européenne a de plus écarté l'approche par catégories, privilégiée par les endocrinologues et de nombreuses ONG environnementales, qui de façon similaire à la classification CLP ou à celle du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), permet de classer les substances en fonction du degré de preuve de leur dangerosité. Enfin, autre élément qui fait débat : Bruxelles a prévu des dérogations en cas de "risque négligeable". En résumé, réguler les perturbateurs endocriniens va s'avérer infiniment difficile puisque, comme l'indique l'Endocrine Society : « *La Commission européenne a placé la barre si haute qu'il sera difficile de l'atteindre, quand bien même il existe les preuves scientifiques de dommages.* ».

4.3.2. La substitution des perturbateurs endocriniens

La France fait partie des pays qui poussent à ce que la réglementation autour des perturbateurs endocriniens évolue, notamment au niveau européen. Le symbole en est l'interdiction du Bisphénol-A dans les contenants alimentaires, une mesure unique au niveau international. On peut aussi rappeler que la France était parmi les 1^{ers} pays à interdire le tributylétain dans les peintures pour les coques de bateaux ; puis la communauté internationale a suivi. Ces décisions prises par la France ont certainement un effet bénéfique sur la santé de la population. Cependant, lorsque les pays voisins ne suivent pas la même démarche de réglementation, cela peut également entraîner une perte de

compétitivité des industries françaises. En poursuivant avec l'exemple du BPA, son retrait des contenants alimentaires raccourcirait les dates limites de consommation des aliments, et impacterait la compétitivité des industries agroalimentaires françaises sur le marché de l'export. L'argument économique, au détriment du risque sanitaire, est souvent avancé par les industries pour pousser les décideurs à limiter les réglementations. C'est d'ailleurs pour réaliser une étude d'impact que la Commission Européenne justifie son retard pour établir les critères d'identification des perturbateurs endocriniens. Reste la question du délai accordé aux industries pour identifier des moyens de substitution : plus celui-ci sera long et plus la population continuera d'être exposée mais plus celui-ci sera court et plus les études de toxicologie des produits de substitution seront réalisées précipitamment. C'est ainsi qu'aujourd'hui, on s'interroge sur l'innocuité des substituts du Bisphénol-A tels que le Bisphénol-S ou -F, pour lesquels des effets de perturbations endocriniennes ont également été rapportés [397].

4.3.3. Les difficultés liées à l'extrapolation animal-humain

Bien que plusieurs paramètres physiologiques impliqués dans la stéroïdogénèse soient communs à de nombreuses espèces, certaines différences existent dans la synthèse des stéroïdes ou l'expression enzymatique. En effet, contrairement à l'Homme, les glandes surrénales du rongeur sont dépourvues de la 17-hydroxylase ce qui par conséquent limite la synthèse de DHEA(S) surrénalienne. De même, la voie préférentielle de synthèse des androgènes à partir de la pregnénolone est la $\Delta 5$ chez l'Homme (séquence 17α hydroxy-pregnénolone et DHEA) tandis que c'est la $\Delta 4$ chez le rongeur (séquence progestérone, 17-hydroxy-progestérone et androstènedione). De plus, les périodes de développement diffèrent entre l'homme et l'animal. Les rongeurs naissent beaucoup plus immatures que la plupart des autres mammifères : la période néonatale du rongeur correspond, du point de vue du développement, à la fin de la gestation chez l'Homme. Ainsi, chez le rongeur, la descente inguino-scrotale des testicules ne se déroule pas pendant la gestation mais après la naissance (jusqu'à J20). De même, la différenciation des organes génitaux internes et externes se terminera au cours de la période post-natale. Cependant, plusieurs des lignes directrices de l'OCDE pour les essais de reprotoxicité des produits chimiques ne couvrent pas la période postnatale. En effet, selon la ligne directrice 414, la mère est sacrifiée le jour précédant la parturition et selon les lignes directrices 421 et 422, les petits sont sacrifiés à J4. Seules les études sur plusieurs générations (OCDE 415, 416) permettent de couvrir la fin de la période du développement génital chez le rongeur. De plus, dans le passé, les malformations de l'appareil génital pouvaient être considérées comme des malformations mineures par rapport à d'autres types de malformations et n'étaient pas systématiquement rapportées dans les études animales. Il est donc assez difficile de comparer les résultats d'études épidémiologiques avec les données de la littérature animale et particulièrement lorsque celle-ci concerne les rongeurs.

4.4. IMPLICATION EN SANTE PUBLIQUE

4.4.1. *La perception du risque chimique*

D'après le baromètre 2015 de l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) sur la perception des risques et de la sécurité par les Français, le risque chimique atteint la dernière place des préoccupations des Français, loin derrière le chômage et le terrorisme mais aussi les risques nucléaires ou l'épidémie d'Ebola [398]. Les perturbateurs endocriniens ont fait leur entrée dans ce baromètre et un Français sur trois estime que les risques relatifs à cette situation sont élevés [398]. Cependant, le sujet semble encore assez mal connu, puisque plus de 10% des personnes interrogées n'ont pas répondu à cette question (contre <1% pour la plupart des autres risques évalués). A ma connaissance, bien que des travaux soient en cours, il n'existe actuellement pas de données françaises dans la littérature portant sur la perception des risques liées aux expositions environnementales pendant la grossesse. Or, la grossesse est une période au cours de laquelle les femmes changent leurs habitudes notamment pour limiter les « risques » pour le fœtus (alcool, tabac). Cependant, l'attitude de chacun face au risque dépend de nombreux facteurs, individuels et collectifs, d'ordre psychologique, économique, social et culturel. Ainsi, certaines femmes seront plus sensibles à l'impact potentiel des expositions environnementales sur le développement du fœtus et tenteront de réduire leur exposition tandis que d'autres ne considéreront pas cela comme une priorité au regard d'autres préoccupations, financière ou familiale par exemple. Une meilleure connaissance de la perception du risque chimique par les femmes enceintes permettrait d'adapter les stratégies de prévention en ciblant les populations vulnérables et tenter ainsi de réduire les inégalités sociales de santé.

4.4.2. *Mesure de prévention auprès des femmes enceintes*

Concernant l'exposition aux POP, des recommandations ont récemment été mises en place en France afin de limiter l'exposition via la consommation de poissons. Il est ainsi recommandé aux populations sensibles, dont les femmes enceintes, de consommer deux portions de poissons riches en oméga-3 (saumon, hareng, maquereau) par semaine, tout en variant les espèces et les lieux d'approvisionnement, et de limiter la consommation de certains autres poissons dont les poissons d'eau douce fortement bio-accumulateurs (anguille, barbeau, carpe...) et les prédateurs sauvages (lotte, loup, raie, thon...). Les diverses stratégies de décontamination de l'environnement menées ces dernières décennies ont permis de réduire les niveaux d'exposition de la population.

Concernant l'exposition aux éthers de glycol, ou aux solvants et autres produits chimiques en milieu professionnel, le code du travail prévoit une interdiction d'utilisation, par les femmes enceintes ou

allaitantes, des agents classés toxiques pour la reproduction de catégorie 1A ou 1B selon la classification CLP. La réglementation REACH encadre également l'utilisation d'agents reprotoxiques dans les produits de consommation à destination du grand public et des mesures de restrictions supplémentaires existent pour l'EGBE et le DEGME dans les cosmétiques et l'EGPhE dans les biocides à usage vétérinaire. Pour les autres éthers de glycol, puisque les données actuelles sur les effets reprotoxiques sont limitées, il n'y a pas de mesure de restriction ni de mesure de prévention particulière auprès des femmes enceintes. De plus, même si des mesures de préventions pouvaient être données aux femmes enceintes afin de limiter l'utilisation des produits de consommation contenant des EG, il leur serait aujourd'hui difficile d'y parvenir puisque, contrairement aux cosmétiques, la composition des produits d'entretien ou encore des peintures n'est généralement pas précisée sur le contenant. D'après le règlement (CE) n° 648/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 relatif aux détergents, les fabricants ne sont pas contraints de faire figurer la liste exhaustive des composants du produit sur l'étiquetage mais seulement l'adresse d'un site web où cette information est *a priori* accessible. Il est ainsi difficile pour le consommateur de s'informer sur la présence de certaines substances, dont les éthers de glycol, dans ces produits.

4.4.3. Impact sur la santé

La littérature et les travaux présentés dans cette thèse suggèrent que l'exposition prénatale à des polluants chimiques est associée à des altérations du développement fœtal du système reproducteur. Selon le concept des origines développementales de la santé, les effets subtils observés chez l'enfant, suite à des expositions à des polluants chimiques pendant la grossesse, pourraient présager du développement de pathologies observées à plus long-terme incluant des troubles de la fertilité, des maladies cardio-vasculaires, des cancers ou encore de l'obésité et du diabète [40,117,399]. Plusieurs de ces pathologies sont parmi les premières causes de mortalité dans le monde et leur caractère chronique met en péril l'équilibre social des individus et les systèmes de santé. Des chercheurs européens et américains de diverses disciplines ont récemment publié un article dans lequel le coût économique des effets des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine en Europe a été évalué à partir des données de la littérature [400]. En tenant compte du niveau de preuve existant pour les différents effets étudiés, le coût annuel médian estimé est de 163 milliards d'euros, soit 1.28% du PIB. La France ressort comme le Pays avec le coût annuel le plus élevé avec 28 milliards d'euros. Aussi, il est important d'agir afin de limiter l'exposition de la population, et notamment celle des populations sensibles, pour réduire les impacts sanitaires, environnementaux, mais également économiques et sociaux liés aux perturbateurs endocriniens.

4.5. PERSPECTIVES DE RECHERCHES

4.5.1. *Evaluer les niveaux d'exposition aux éthers de glycol dans la population générale et confirmer leurs effets sur la santé*

Au cours des 20 dernières années, la réglementation autour de l'utilisation des éthers des glycols a nettement évolué en Europe et particulièrement en France. La catégorisation de plusieurs EG en tant que substances reprotoxiques a permis de diminuer l'exposition de la population générale et des travailleurs mais nous ne disposons que de très peu d'informations concernant les sources et les niveaux actuels d'exposition. Une étude menée par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail et publiée en 2008 rapporte la présence d'éthers de glycol dans divers produits à usage professionnel et domestique dont les peintures, encres et vernis, les produits d'entretien et les cosmétiques [334]. Cependant, les données sont parfois très anciennes et à notre connaissance aucune étude de biomonitoring en population générale n'est disponible, excepté une étude réalisée en Allemagne en 2007-2008, chez 44 sujets non exposés professionnellement, qui rapporte notamment des niveaux d'exposition au MAA comparables aux niveaux mesurés en 2002-2006 chez les femmes enceintes des cohortes PELAGIE et EDEN (médiane = 0.11mg/l). Il est ainsi indispensable de réaliser des études de biomonitoring de plus grande envergure afin d'évaluer les niveaux actuels d'exposition (et leurs sources) de la population générale pour éventuellement mettre en place des recommandations chez les femmes enceintes et/ou en âge de procréer. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour améliorer les connaissances sur les effets de l'exposition aux éthers de glycol sur la santé. Cela concerne : 1) des études toxicologiques, *in vitro* et *in vivo*, pour évaluer l'activité endocrinienne potentielle des éthers de glycol et la toxicité des éthers de glycol encore peu étudiés et non restreints par la réglementation actuelle (TEGME, DEGEE, DEGDEE), et 2) des études épidémiologiques prospectives, à partir de cohortes mère-enfant et une évaluation de l'exposition par biomarqueurs, pour confirmer nos résultats et suivre les effets des éthers de glycol sur le développement post-natal.

4.5.2. *Améliorer les connaissances sur les mécanismes de perturbation endocrinienne pendant la grossesse : le rôle du placenta*

Le placenta joue un rôle primordial dans la stéroïdogénèse pendant la grossesse et certaines des modifications d'hormones observées dans le sang de cordon pourraient résulter d'une perturbation endocrinienne exercée au niveau placentaire. A titre d'exemple, l'augmentation des niveaux d'œstradiol et la diminution de l'*Aromatase index* observées en association avec les niveaux d'exposition à plusieurs POP peuvent résulter d'une inhibition de l'aromatase, qui est majoritairement placentaire. Grâce à l'évolution des techniques analytiques, il est aujourd'hui

possible de mesurer, dans le placenta, l'activité de certaines enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes (aromatase, 3 β -HSD). De même, le développement de l'épigénétique et l'hypothèse selon laquelle les expositions environnementales agiraient via des mécanismes épigénétiques, telle que la méthylation de l'ADN, fait l'objet d'un axe de recherche en expansion. Il serait ainsi intéressant d'étudier les effets des perturbateurs endocriniens au niveau placentaire pour mieux comprendre les mécanismes d'action impliqués pendant la grossesse et évaluer la vulnérabilité du placenta en tant qu'organe cible. Dans le cadre du protocole d'étude de la cohorte PELAGIE, des prélèvements de placenta ont été recueillis et pourraient être exploités pour poursuivre les recherches.

4.5.3. Evaluer les effets de l'exposition prénatale aux POP et aux EG, et des modifications des niveaux d'hormones à la naissance, sur la puberté

La puberté constitue la dernière étape du développement du système reproducteur qui va permettre d'aboutir à la capacité fonctionnelle de se reproduire. Certaines études épidémiologiques suggèrent que l'exposition aux perturbateurs endocriniens impacterait le développement pubertaire mais peu d'études prospectives sont disponibles. Le suivi à 12 ans des enfants de la cohorte PELAGIE est actuellement en cours et axé sur le développement pubertaire. Le protocole d'enquête qui inclut le recueil de données par questionnaire et un examen clinique, permettra entre autres de mesurer le stade de développement pubertaire de l'enfant (score de Tanner) mais aussi de recueillir des prélèvements biologiques (sang, urines) à partir desquels des dosages de polluants et d'hormones seront réalisés. Il sera ainsi possible d'étudier la relation entre les niveaux d'expositions prénatales aux POP et/ou aux éthers de glycol et les marqueurs de la puberté. A partir d'analyses de médiations, les niveaux d'hormones mesurées dans le sang de cordon ombilical pourront être évalués comme marqueurs intermédiaires et précoces d'effet des expositions prénatales sur la puberté.

4.6. CONCLUSION

Les études présentées dans cette thèse montrent que la mesure des hormones sexuelles dans le sang de cordon ombilical peut être un outil efficace pour mettre en évidence les effets d'expositions prénatales à des polluants chimiques qui impliqueraient des mécanismes de perturbation endocrinienne. Ainsi, l'exposition aux POP, connus pour être des perturbateurs endocriniens, mais aussi l'exposition aux EG, ont été associées à des variations des niveaux d'hormones sexuelles à la naissance. Une augmentation du risque de malformation génitale a également été suggérée en association avec l'exposition aux EG mais ces résultats doivent être confirmés par des études de plus grande envergure pour conclure avec un niveau de preuve satisfaisant. Des études métrologiques et toxicologiques portant sur les EG doivent être mises en œuvre.

REFERENCES

- 1 Silbernagl S, Despopoulos A. *Atlas de poche de physiologie*. 4e éd. Paris: : Flammarion médecine-sciences 2008.
- 2 Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S. *La reproduction animale et humaine*. Versailles: : Ed. Quae 2014.
- 3 Drews U. *Atlas de poche d'embryologie*. Paris: : Flammarion Médecine-Sciences 1994.
- 4 Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet* 2008;**9**:911–22. doi:10.1038/nrg2415
- 5 Sarraj MA, Drummond AE. Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. *Reproduction* 2012;**143**:151–63. doi:10.1530/REP-11-0247
- 6 Expertise collective Inserm. *Reproduction et environnement*. Les éditions Inserm 2011.
- 7 Institut national de la santé et de la recherche médicale (France). Centre d'expertise collective. *Reproduction et environnement*. Paris: : INSERM, Institut national de la santé et de la recherche médicale 2011.
- 8 Kuiri-Hänninen T, Sankilampi U, Dunkel L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Horm Res pædiatrics* 2014;**82**:73–80. doi:10.1159/000362414
- 9 Kurtoğlu S, Baştuğ O. Mini puberty and its interpretation. *Türk Pediatr arşivi* 2014;**49**:186–91. doi:10.5152/tpa.2014.2038
- 10 Scorer C. The descent of the testis. *Arch Dis Child* 1964;**39**:605–9.
- 11 Kolon TF, Herndon CDA, Baker LA, et al. Evaluation and treatment of Cryptorchidism: AUA guideline. *J Urol* 2014;**192**:346–9. doi:10.1016/j.juro.2014.05.005
- 12 Arbuckle TE, Hauser R, Swan SH, et al. Meeting report: measuring endocrine-sensitive endpoints within the first years of life. *Environ Health Perspect* 2008;**116**:948–51. doi:10.1289/ehp.11226
- 13 de Roux N, Genin E, Carel J-C, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:10972–6. doi:10.1073/pnas.1834399100
- 14 Navarro VM. New insights into the control of pulsatile GnRH release: the role of Kiss1/neurokinin B neurons. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;**3**:48. doi:10.3389/fendo.2012.00048
- 15 Bourguignon JP, Gérard A, Purnelle G, et al. Duality of glutamatergic and GABAergic control of pulsatile GnRH secretion by rat hypothalamic explants: I. Effects of antisense oligodeoxynucleotides using explants including or excluding the preoptic area. *J Neuroendocrinol* 1997;**9**:183–91.
- 16 Parent A-S, Franssen D, FUDVOYE J, et al. Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Front Neuroendocrinol* 2015.
- 17 Evain-Brion D, Malassiné A, Frydman R. *Le placenta humain*. Cachan ;Paris: : Ed. Médicales Internationales 2010.
- 18 Pasqualini J. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;**97**:401–15. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.08.004

- 19 Ishimoto H, Jaffe RB. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the feto-placental unit. *Endocr Rev* 2011;**32**:317–55. doi:10.1210/er.2010-0001
- 20 Petersen C, Söder O. The Sertoli cell - A hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.* 2006. doi:10.1159/000094142
- 21 Fowler PA, Anderson RA, Saunders PT, *et al.* Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**:1754–62. doi:10.1210/jc.2010-2618
- 22 Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Graem N, *et al.* Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:3836–44. doi:10.1210/jcem.84.10.6047
- 23 Hagen CP, Aksglaede L, Sørensen K, *et al.* Serum levels of anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in 926 healthy females from birth to adulthood and in 172 Turner syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**:5003–10. doi:10.1210/jc.2010-0930
- 24 Schwanzel-Fukuda M, Crossin KL, Pfaff DW, *et al.* Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. *J Comp Neurol* 1996;**366**:547–57. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960311)366:3<547::AID-CNE12>3.0.CO;2-M
- 25 Hagen C, McNeilly AS. The gonadotrophins and their subunits in foetal pituitary glands and circulation. *J Steroid Biochem* 1977;**8**:537–44.
- 26 Huhtaniemi IT, Korenbrot CC, Jaffe RB. HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;**44**:963–7. doi:10.1210/jcem-44-5-963
- 27 Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE, *et al.* Luteinizing hormone in testicular descent. *Mol Cell Endocrinol* 2007;**269**:34–7. doi:10.1016/j.mce.2006.10.021
- 28 Melmed S, Polonsky K, Larsen P, *et al.* *Williams Textbook of Endocrinology. 12th ed. Philadelphia, PA. Elsevier S.* 2011.
- 29 Fowler PA, Evans LW, Groome NP, *et al.* A longitudinal study of maternal serum inhibin-A, inhibin-B, activin-A, activin-AB, pro-alphaC and follistatin during pregnancy. *Hum Reprod* 1998;**13**:3530–6. doi:10.1093/HUMREP/13.12.3530
- 30 Kuijper EAM, Ket JCF, Caanen MR, *et al.* Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2013;**27**:33–63. doi:10.1016/j.rbmo.2013.03.009
- 31 Carson R, Darling L, Darling L. *Silent spring.* Boston ;Cambridge Mass.: : Houghton Mifflin 1962.
- 32 Ellis D V, Agan Pattisina L. Widespread neogastropod imposex: A biological indicator of global TBT contamination? *Mar Pollut Bull* 1990;**21**:248–53. doi:10.1016/0025-326X(90)90344-8
- 33 Guillette LJ, Gross TS, Masson GR, *et al.* Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 1994;**102**:680–8.
- 34 Sumpter JP. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicol Lett* 1995;**82–83**:737–42.
- 35 Skakkebaek NE, Meyts ER-D, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001;**16**:972–8. doi:10.1093/humrep/16.5.972

- 36 Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2011;**7**:346–53. doi:10.1038/nrendo.2011.56
- 37 European commission. European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. 1996.
- 38 Kavlock R, Daston G. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environ Heal ...* 1996;**104**:1–26.
- 39 WHO. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Int. Program. Chem. Safety. 2002.http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/ (accessed 21 Jul2016).
- 40 WHO/UNEP. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012: An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO. 2013.<http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/> (accessed 21 Jul2016).
- 41 International Panel on Chemical Pollution (IPCP). Overview Report I: A Compilation of Lists of Chemicals Recognised as Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) or Suggested as Potential EDCs. 2016.
- 42 Putte I Van der, Groshart C, Okkerman P. European Commission DG ENV: Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption. 2000.
- 43 Commission of the European Communities. Commission staff working document on the implementation of the 'Community Strategy for Endocrine Disruptors' - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Brussels: 2007.
- 44 Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Maisons-Alfort), Institut national de la santé et de la recherche médicale (France). Centre d'expertise collective. *Cancer et environnement*. Paris: : Les éd. Inserm 2008.
- 45 Henrotin JB. INRS, Note Scientifique 323: Besoins d'études épidémiologiques sur les effets de l'exposition à de(s) perturbateur(s) endocrinien(s) en entreprises. 2013.
- 46 Myllynen P, Pasanen M, Vähäkangas K. The fate and effects of xenobiotics in human placenta. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007;**3**:331–46. doi:10.1517/17425255.3.3.331
- 47 Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, *et al.* Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;**341**:938–41.
- 48 Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;**261**:412–7. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x
- 49 Hanson M, Kermack WO, McKendrick AG, *et al.* The birth and future health of DOHaD. *J Dev Orig Health Dis* 2015;**6**:434–7. doi:10.1017/S2040174415001129
- 50 Cordier S. Evidence for a role of paternal exposures in developmental toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;**102**:176–81. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00162.x
- 51 Klip H, Verloop J, van Gool JD, *et al.* Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet (London, England)* 2002;**359**:1102–7. doi:10.1016/S0140-6736(02)08152-7
- 52 Tournaire M, Epelboin S, Devouche E, *et al.* Adverse health effects in children of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Thérapie* 2016;**71**:395–404. doi:10.1016/j.therap.2016.01.006

- 53 Titus-Ernstoff L, Troisi R, Hatch EE, *et al.* Birth defects in the sons and daughters of women who were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Int J Androl* 2010;**33**:377–84. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01010.x
- 54 Vrijheid M, Casas M, Bergström A, *et al.* European birth cohorts for environmental health research. *Environ Health Perspect* 2012;**120**:29–37. doi:10.1289/ehp.1103823
- 55 White E, Armstrong BK, Saracci R. *Principles of Exposure Measurement in Epidemiology*. Oxford University Press 2008. doi:10.1093/acprof:oso/9780198509851.001.0001
- 56 Van Tongeren M, Nieuwenhuijsen MJ, Gardiner K, *et al.* A job-exposure matrix for potential endocrine-disrupting chemicals developed for a study into the association between maternal occupational exposure and hypospadias. *Ann Occup Hyg* 2002;**46**:465–77.
- 57 Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 2012;**33**:378–455. doi:10.1210/er.2011-1050
- 58 Dean A, Sharpe RM. Clinical review: Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: relationship to male reproductive development and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;**98**:2230–8. doi:10.1210/jc.2012-4057
- 59 Thankamony A, Pasterski V, Ong KK, *et al.* Anogenital distance as a marker of androgen exposure in humans. *Andrology* 2016;**4**:616–25. doi:10.1111/andr.12156
- 60 Ventura T, Gomes MC, Pita A, *et al.* Digit ratio (2D:4D) in newborns: Influences of prenatal testosterone and maternal environment. *Early Hum Dev* 2013;**89**:107–12. doi:10.1016/j.earlhumdev.2012.08.009
- 61 Romano-Riquer SP, Hernández-Avila M, Gladen BC, *et al.* Reliability and determinants of anogenital distance and penis dimensions in male newborns from Chiapas, Mexico. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2007;**21**:219–28. doi:10.1111/j.1365-3016.2007.00810.x
- 62 Schoeters GER, Den Hond E, Koppen G, *et al.* Biomonitoring and biomarkers to unravel the risks from prenatal environmental exposures for later health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2011;**94**:1964S–1969S. doi:10.3945/ajcn.110.001545
- 63 Thankamony A, Lek N, Carroll D, *et al.* Anogenital distance and penile length in infants with hypospadias or cryptorchidism: comparison with normative data. *Environ Health Perspect* 2014;**122**:207–11. doi:10.1289/ehp.1307178
- 64 Jain VG, Singal AK. Shorter anogenital distance correlates with undescended testis: a detailed genital anthropometric analysis in human newborns. *Hum Reprod* 2013;**28**:2343–9. doi:10.1093/humrep/det286
- 65 Hsieh MH, Eisenberg ML, Hittelman AB, *et al.* Caucasian male infants and boys with hypospadias exhibit reduced anogenital distance. *Hum Reprod* 2012;**27**:1577–80. doi:10.1093/humrep/des087
- 66 Pierik FH, Deddens JA, Burdorf A, *et al.* The hypothalamus-pituitary-testis axis in boys during the first six months of life: a comparison of cryptorchidism and hypospadias cases with controls. *Int J Androl* 2009;**32**:453–61. doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00877.x
- 67 Fénichel P, Lahlou N, Coquillard P, *et al.* Cord blood insulin-like peptide 3 (INSL3) but not testosterone is reduced in idiopathic cryptorchidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015;**82**:242–7. doi:10.1111/cen.12500
- 68 van de Beek C, Thijssen JHH, Cohen-Kettenis PT, *et al.* Relationships between sex hormones assessed in amniotic fluid, and maternal and umbilical cord serum: what is the best source of information to investigate the effects of fetal hormonal exposure? *Horm Behav* 2004;**46**:663–9. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.06.010

- 69 Hollier LP, Keelan JA, Hickey M, *et al.* Measurement of androgen and estrogen concentrations in cord blood: accuracy, biological interpretation, and applications to understanding human behavioral development. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;**5**:64. doi:10.3389/fendo.2014.00064
- 70 Troisi R, Potischman N, Roberts JM, *et al.* Correlation of serum hormone concentrations in maternal and umbilical cord samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;**12**:452–6.
- 71 Pašková A, Pařízek A, Hill M, *et al.* Steroid metabolome in the umbilical cord: is it necessary to differentiate between arterial and venous blood? *Physiol Res* 2014;**63**:115–26.
- 72 Hirato K, Yanaihara T. Serum steroid hormone levels in neonates born from the mother with placental sulfatase deficiency. *Endocrinol Jpn* 1990;**37**:731–9.
- 73 Hickey M, Hart R, Keelan JA. The relationship between umbilical cord estrogens and perinatal characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;**23**:946–52. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-1321
- 74 Guibourdenche J, Lucidarme N, Chevenne D, *et al.* Anti-Müllerian hormone levels in serum from human fetuses and children: pattern and clinical interest. *Mol Cell Endocrinol* 2003;**211**:55–63.
- 75 Dumesic DA, Goodarzi MO, Chazenbalk GD, *et al.* Intrauterine environment and polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 2014;**32**:159–65. doi:10.1055/s-0034-1371087
- 76 Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. Developmental origin of reproductive and metabolic dysfunctions: androgenic versus estrogenic reprogramming. *Semin Reprod Med* 2011;**29**:173–86. doi:10.1055/s-0031-1275519
- 77 Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, *et al.* Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* 2005;**11**:357–74. doi:10.1093/humupd/dmi013
- 78 Demissie M, Lazic M, Foecking EM, *et al.* Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2008;**295**.
- 79 Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, *et al.* Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:1206–10. doi:10.1210/jcem.85.3.6453
- 80 King AJ, Olivier NB, Mohankumar PS, *et al.* Hypertension caused by prenatal testosterone excess in female sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;**292**:E1837-41. doi:10.1152/ajpendo.00668.2006
- 81 Chinnathambi V, Balakrishnan M, Yallampalli C, *et al.* Prenatal testosterone exposure leads to hypertension that is gonadal hormone-dependent in adult rat male and female offspring. *Biol Reprod* 2012;**86**:137, 1–7. doi:10.1095/biolreprod.111.097550
- 82 Endendijk JJ, Beltz AM, McHale SM, *et al.* Linking Prenatal Androgens to Gender-Related Attitudes, Identity, and Activities: Evidence From Girls With Congenital Adrenal Hyperplasia. *Arch Sex Behav* 2016;**45**:1807–15. doi:10.1007/s10508-016-0693-7
- 83 Hines M. Sex steroids and human behavior: prenatal androgen exposure and sex-typical play behavior in children. *Ann N Y Acad Sci* 2003;**1007**:272–82.
- 84 Manson JE. Prenatal exposure to sex steroid hormones and behavioral/cognitive outcomes. *Metabolism* 2008;**57 Suppl 2**:S16-21. doi:10.1016/j.metabol.2008.07.010
- 85 Cohen-Bendahan CCC, van de Beek C, Berenbaum SA. Prenatal sex hormone effects on child and adult sex-typed behavior: methods and findings. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;**29**:353–84. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.11.004

- 86 Xue F, Michels KB. Intrauterine factors and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis of current evidence. *Lancet Oncol* 2007;**8**:1088–100. doi:10.1016/S1470-2045(07)70377-7
- 87 Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, *et al.* Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:405–13. doi:10.1210/jc.2006-1864
- 88 Barry JA, Hardiman PJ, Siddiqui MR, *et al.* Meta-analysis of sex difference in testosterone levels in umbilical cord blood. *J Obstet Gynaecol* 2011;**31**:697–702. doi:10.3109/01443615.2011.614971
- 89 Keelan JA, Mattes E, Tan H, *et al.* Androgen concentrations in umbilical cord blood and their association with maternal, fetal and obstetric factors. *PLoS One* 2012;**7**:e42827. doi:10.1371/journal.pone.0042827
- 90 Bolton NJ, Tapanainen J, Koivisto M, *et al.* Circulating sex hormone-binding globulin and testosterone in newborns and infants. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989;**31**:201–7.
- 91 Troisi R, Potischman N, Roberts J, *et al.* Associations of maternal and umbilical cord hormone concentrations with maternal, gestational and neonatal factors (United States). *Cancer Causes Control* 2003;**14**:347–55.
- 92 Garagorri JM, Rodríguez G, Lario-Elboj AJ, *et al.* Reference levels for 17-hydroxyprogesterone, 11-desoxycortisol, cortisol, testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and androstenedione in infants from birth to six months of age. *Eur J Pediatr* 2008;**167**:647–53. doi:10.1007/s00431-007-0565-1
- 93 Gol M, Altunyurt S, Cimrin D, *et al.* Different maternal serum hCG levels in pregnant women with female and male fetuses: does fetal hypophyseal–adrenal–gonadal axis play a role? *J Perinat Med* 2004;**32**:342–5. doi:10.1515/JPM.2004.064
- 94 Vatten LJ, Romundstad PR, Ødegård RA, *et al.* Alpha-fetoprotein in umbilical cord in relation to severe pre-eclampsia, birth weight and future breast cancer risk. *Br J Cancer* 2002;**86**:728–31. doi:10.1038/sj.bjc.6600125
- 95 Gemer O, Sevellia J, Zalis J, *et al.* Umbilical cord androgens in infants of diabetic mothers. *Arch Gynecol Obstet* 1997;**259**:139–41.
- 96 Anderson H, Fogel N, Grebe SK, *et al.* Infants of women with polycystic ovary syndrome have lower cord blood androstenedione and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**:2180–6. doi:10.1210/jc.2009-2651
- 97 Faupel-Badger JM, Wang Y, Karumanchi SA, *et al.* Associations of pregnancy characteristics with maternal and cord steroid hormones, angiogenic factors, and insulin-like growth factor axis. *Cancer Causes Control* 2011;**22**:1587–95. doi:10.1007/s10552-011-9835-3
- 98 Lagiou P, Samoli E, Hsieh C-C, *et al.* Maternal and cord blood hormones in relation to birth size. *Eur J Epidemiol* 2014;**29**:343–51. doi:10.1007/s10654-014-9914-3
- 99 Rohrmann S, Sutcliffe CG, Bienstock JL, *et al.* Racial variation in sex steroid hormones and the insulin-like growth factor axis in umbilical cord blood of male neonates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;**18**:1484–91. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0817
- 100 Agurs-Collins T, Rohrmann S, Sutcliffe C, *et al.* Racial variation in umbilical cord blood sex steroid hormones and the insulin-like growth factor axis in African-American and white female neonates. *Cancer Causes Control* 2012;**23**:445–54. doi:10.1007/s10552-011-9893-6
- 101 Nagata C, Iwasa S, Shiraki M, *et al.* Estrogen and alpha-fetoprotein levels in maternal and umbilical cord blood samples in relation to birth weight. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;**15**:1469–72. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0158

- 102 Faupel-Badger JM, Hoover RN, Potischman N, *et al.* Pregnancy weight gain is not associated with maternal or mixed umbilical cord estrogen and androgen concentrations. *Cancer Causes Control* 2009;**20**:263–7. doi:10.1007/s10552-008-9235-5
- 103 Ligiou P, Hsieh C-C, Samoli E, *et al.* Associations of placental weight with maternal and cord blood hormones. *Ann Epidemiol* 2013;**23**:669–73. doi:10.1016/j.annepidem.2013.08.003
- 104 Ligiou P, Samoli E, Okulicz W, *et al.* Maternal and cord blood hormone levels in the United States and China and the intrauterine origin of breast cancer. *Ann Oncol* 2011;**22**:1102–8. doi:10.1093/annonc/mdq565
- 105 Troisi R, Ligiou P, Trichopoulos D, *et al.* Cord serum estrogens, androgens, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-3 in Chinese and U.S. Caucasian neonates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;**17**:224–31. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0536
- 106 Varvarigou AA, Liatsis SG, Vassilakos P, *et al.* Effect of maternal smoking on cord blood estriol, placental lactogen, chorionic gonadotropin, FSH, LH, and cortisol. *J Perinat Med* 2009;**37**:364–9. doi:10.1515/JPM.2009.028
- 107 Nagata C, Iwasa S, Shiraki M, *et al.* Association of maternal fat and alcohol intake with maternal and umbilical hormone levels and birth weight. *Cancer Sci* 2007;**98**:869–73. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00464.x
- 108 van der Zanden LFM, van Rooij IALM, Feitz WFJ, *et al.* Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. *Hum Reprod Update* 2012;**18**:260–83. doi:10.1093/humupd/dms002
- 109 Serrano T, Chevrier C, Multigner L, *et al.* International geographic correlation study of the prevalence of disorders of male reproductive health. *Hum Reprod* 2013;**28**:1974–86. doi:10.1093/humrep/det111
- 110 EUROCAT Central Registry. EUROCAT Guide 1.4 and Reference Documents. 2013;**44**.[http://www.eurocat-network.eu/content/Full Guide 1 4.pdf](http://www.eurocat-network.eu/content/Full%20Guide%201.4.pdf)
- 111 Källén B, Bertollini R, Castilla E, *et al.* A joint international study on the epidemiology of hypospadias. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1986;**324**:1–52.
- 112 Knox EG, Armstrong EH, Lancashire R. The quality of notification of congenital malformations. *J Epidemiol Community Health* 1984;**38**:296–305.
- 113 Pierik FH, Burdorf A, Nijman JMR, *et al.* A high hypospadias rate in The Netherlands. *Hum Reprod* 2002;**17**:1112–5.
- 114 Carmichael SL, Witte JS, Ma C, *et al.* Hypospadias and variants in genes related to sex hormone biosynthesis and metabolism. *Andrology* 2014;**2**:130–7. doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00165.x
- 115 Kalfa N, Philibert P, Sultan C. Is hypospadias a genetic, endocrine or environmental disease, or still an unexplained malformation? *Int J Androl* 2009;**32**:187–97. doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00899.x
- 116 Shih EM, Graham JM. Review of genetic and environmental factors leading to hypospadias. *Eur J Med Genet* 2014;**57**:453–63. doi:10.1016/j.ejmg.2014.03.003
- 117 Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, *et al.* Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev* 2016;**96**:55–97. doi:10.1152/physrev.00017.2015
- 118 Brouwers MM, Feitz WFJ, Roelofs LAJ, *et al.* Risk factors for hypospadias. *Eur J Pediatr* 2007;**166**:671–8. doi:10.1007/s00431-006-0304-z

- 119 Brouwers MM, van der Zanden LFM, de Gier RPE, *et al.* Hypospadias: risk factor patterns and different phenotypes. *BJU Int* 2010;**105**:254–62. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08772.x
- 120 Carbone P, Giordano F, Nori F, *et al.* The possible role of endocrine disrupting chemicals in the aetiology of cryptorchidism and hypospadias: a population-based case-control study in rural Sicily. *Int J Androl* 2007;**30**:3–13. doi:10.1111/j.1365-2605.2006.00703.x
- 121 Giordano F, Carbone P, Nori F, *et al.* Maternal diet and the risk of hypospadias and cryptorchidism in the offspring. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008;**22**:249–60. doi:10.1111/j.1365-3016.2007.00918.x
- 122 Giordano F, Abballe A, De Felip E, *et al.* Maternal exposures to endocrine disrupting chemicals and hypospadias in offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;**88**:241–50. doi:10.1002/bdra.20657
- 123 Morera AM, Valmalle AF, Asensio MJ, *et al.* A study of risk factors for hypospadias in the Rhône-Alpes region (France). *J Pediatr Urol* 2006;**2**:169–77. doi:10.1016/j.jpuro.2005.09.008
- 124 Woud SG In 't, van Rooij IALM, van Gelder MMHJ, *et al.* Differences in risk factors for second and third degree hypospadias in the national birth defects prevention study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2014;**100**:703–11. doi:10.1002/bdra.23296
- 125 Fredell L, Iselius L, Collins A, *et al.* Complex segregation analysis of hypospadias. *Hum Genet* 2002;**111**:231–4. doi:10.1007/s00439-002-0799-y
- 126 Schnack TH, Poulsen G, Myrup C, *et al.* Familial coaggregation of cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology* 2010;**21**:109–13. doi:10.1097/EDE.0b013e3181c15a50
- 127 Akre O, Lipworth L, Cnattingius S, *et al.* Risk factor patterns for cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology* 1999;**10**:364–9.
- 128 Carmichael SL, Shaw GM, Nelson V, *et al.* Hypospadias in California: trends and descriptive epidemiology. *Epidemiology* 2003;**14**:701–6. doi:10.1097/01.ede.0000091603.43531.d0
- 129 Chong JH, Wee CK, Ho SKY, *et al.* Factors associated with hypospadias in Asian newborn babies. *J Perinat Med* 2006;**34**:497–500. doi:10.1515/JPM.2006.096
- 130 de Kort CAR, Nieuwenhuijsen MJ, Mendez MA. Relationship between maternal dietary patterns and hypospadias. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011;**25**:255–64. doi:10.1111/j.1365-3016.2011.01194.x
- 131 Funke S, Flach E, Kiss I, *et al.* Male reproductive tract abnormalities: More common after assisted reproduction? *Early Hum Dev* 2010;**86**:547–50. doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.06.015
- 132 Jensen MS, Wilcox AJ, Olsen J, *et al.* Cryptorchidism and hypospadias in a cohort of 934,538 Danish boys: the role of birth weight, gestational age, body dimensions, and fetal growth. *Am J Epidemiol* 2012;**175**:917–25. doi:10.1093/aje/kwr421
- 133 Mavrogenis S, Urban R, Czeizel AE. Pregnancy complications in the mothers who delivered boys with isolated hypospadias - a population-based case-control study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015;**28**:489–93. doi:10.3109/14767058.2014.921902
- 134 Ormond G, Nieuwenhuijsen MJ, Nelson P, *et al.* Endocrine disruptors in the workplace, hair spray, folate supplementation, and risk of hypospadias: case-control study. *Environ Health Perspect* 2009;**117**:303–7. doi:10.1289/ehp.11933
- 135 Pierik FH, Burdorf A, Deddens JA, *et al.* Maternal and paternal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a case-control study in newborn boys. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:1570–6.

- 136 Sun G, Tang D, Liang J, *et al.* Increasing prevalence of hypospadias associated with various perinatal risk factors in chinese newborns. *Urology* 2009;**73**:1241–5. doi:10.1016/j.urology.2008.12.081
- 137 Akre O, Boyd HA, Ahlgren M, *et al.* Maternal and gestational risk factors for hypospadias. *Environ Health Perspect* 2008;**116**:1071–6. doi:10.1289/ehp.10791
- 138 Hussain N, Chaghtai A, Herndon CDA, *et al.* Hypospadias and early gestation growth restriction in infants. *Pediatrics* 2002;**109**:473–8.
- 139 Ghirri P, Scaramuzzo RT, Bertelloni S, *et al.* Prevalence of hypospadias in Italy according to severity, gestational age and birthweight: an epidemiological study. *Ital J Pediatr* 2009;**35**:18. doi:10.1186/1824-7288-35-18
- 140 Agopian AJ, Lupo PJ, Canfield MA, *et al.* Case-control study of maternal residential atrazine exposure and male genital malformations. *Am J Med Genet A* 2013;**161A**:977–82. doi:10.1002/ajmg.a.35815
- 141 Carmichael SL, Shaw GM, Laurent C, *et al.* Maternal reproductive and demographic characteristics as risk factors for hypospadias. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2007;**21**:210–8. doi:10.1111/j.1365-3016.2007.00809.x
- 142 Jin L, Ye R, Zheng J, *et al.* Secular trends of hypospadias prevalence and factors associated with it in southeast China during 1993-2005. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;**88**:458–65. doi:10.1002/bdra.20673
- 143 Aschim EL, Haugen TB, Tretli S, *et al.* Risk factors for hypospadias in Norwegian boys - association with testicular dysgenesis syndrome? *Int J Androl* 2004;**27**:213–21. doi:10.1111/j.1365-2605.2004.00473.x
- 144 Arendt LH, Ramlau-Hansen CH, Wilcox AJ, *et al.* Placental Weight and Male Genital Anomalies: A Nationwide Danish Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2016;**183**:1122–8. doi:10.1093/aje/kwv336
- 145 Fujimoto T, Suwa T, Kabe K, *et al.* Placental insufficiency in early gestation is associated with hypospadias. *J Pediatr Surg* 2008;**43**:358–61. doi:10.1016/j.jpedsurg.2007.10.046
- 146 Agopian AJ, Langlois PH, Ramakrishnan A, *et al.* Epidemiologic features of male genital malformations and subtypes in Texas. *Am J Med Genet A* 2014;**164A**:943–9. doi:10.1002/ajmg.a.36389
- 147 Porter MP, Faizan MK, Grady RW, *et al.* Hypospadias in Washington State: maternal risk factors and prevalence trends. *Pediatrics* 2005;**115**:e495-9. doi:10.1542/peds.2004-1552
- 148 Winston JJ, Meyer RE, Emch ME. Geographic analysis of individual and environmental risk factors for hypospadias births. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2014;**100**:887–94. doi:10.1002/bdra.23306
- 149 Yang J, Carmichael SL, Kaidarova Z, *et al.* Risks of selected congenital malformations among offspring of mixed race-ethnicity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;**70**:820–4. doi:10.1002/bdra.20054
- 150 Snijder CA, Kortenkamp A, Steegers EAP, *et al.* Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: the Generation R Study. *Hum Reprod* 2012;**27**:1191–201. doi:10.1093/HUMREP/DER474
- 151 Gill SK, Broussard C, Devine O, *et al.* Association between maternal age and birth defects of unknown etiology: United States, 1997-2007. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012;**94**:1010–8. doi:10.1002/bdra.23049
- 152 Fisch H, Golden RJ, Libersen GL, *et al.* Maternal age as a risk factor for hypospadias. *J Urol* 2001;**165**:934–6.

- 153 Reefhuis J, Honein MA. Maternal age and non-chromosomal birth defects, Atlanta--1968-2000: teenager or thirty-something, who is at risk? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;**70**:572–9. doi:10.1002/bdra.20065
- 154 McIntosh GC, Olshan AF, Baird PA. Paternal age and the risk of birth defects in offspring. *Epidemiology* 1995;**6**:282–8.
- 155 Blomberg MI, Källén B. Maternal obesity and morbid obesity: the risk for birth defects in the offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;**88**:35–40. doi:10.1002/bdra.20620
- 156 Waller DK, Shaw GM, Rasmussen SA, *et al.* Prepregnancy obesity as a risk factor for structural birth defects. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007;**161**:745–50. doi:10.1001/archpedi.161.8.745
- 157 Rankin J, Tennant PWG, Stothard KJ, *et al.* Maternal body mass index and congenital anomaly risk: a cohort study. *Int J Obes (Lond)* 2010;**34**:1371–80. doi:10.1038/ijo.2010.66
- 158 Duong HT, Hoyt AT, Carmichael SL, *et al.* Is maternal parity an independent risk factor for birth defects? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012;**94**:230–6. doi:10.1002/bdra.22889
- 159 Källén K. Role of maternal smoking and maternal reproductive history in the etiology of hypospadias in the offspring. *Teratology* 2002;**66**:185–91. doi:10.1002/tera.10092
- 160 North K, Golding J. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *BJU Int* 2000;**85**:107–13.
- 161 Hackshaw A, Rodeck C, Boniface S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Hum Reprod Update*;17:589–604. doi:10.1093/humupd/dmr022
- 162 Agopian AJ, Hoang TT, Mitchell LE, *et al.* Maternal hypertension and risk for hypospadias in offspring. *Am J Med Genet A* Published Online First: 29 August 2016. doi:10.1002/ajmg.a.37947
- 163 Mavrogenis S, Urban R, Czeizel AE, *et al.* Maternal risk factors in the origin of isolated hypospadias: a population-based case-control study. *Congenit Anom (Kyoto)* 2014;**54**:110–5. doi:10.1111/cga.12041
- 164 Nelson DB, Chalak LF, McIntire DD, *et al.* Is preeclampsia associated with fetal malformation? A review and report of original research. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015;**28**:2135–40. doi:10.3109/14767058.2014.980808
- 165 van Gelder MMHJ, Van Bennekom CM, Louik C, *et al.* Maternal hypertensive disorders, antihypertensive medication use, and the risk of birth defects: a case-control study. *BJOG* 2015;**122**:1002–9. doi:10.1111/1471-0528.13138
- 166 Caton AR, Bell EM, Druschel CM, *et al.* Maternal hypertension, antihypertensive medication use, and the risk of severe hypospadias. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;**82**:34–40. doi:10.1002/bdra.20415
- 167 Sørensen HT, Pedersen L, Nørgaard M, *et al.* Maternal asthma, preeclampsia and risk of hypospadias. *Epidemiology* 2005;**16**:806–7.
- 168 Aberg A, Westbom L, Källén B. Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Hum Dev* 2001;**61**:85–95.
- 169 Trabert B, Chodick G, Shalev V, *et al.* Gestational diabetes and the risk of cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology* 2014;**25**:152–3. doi:10.1097/EDE.000000000000014
- 170 Browne ML, Rasmussen SA, Hoyt AT, *et al.* Maternal thyroid disease, thyroid medication use, and selected birth defects in the National Birth Defects Prevention Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009;**85**:621–8. doi:10.1002/bdra.20573

- 171 Brouwers MM, Feitz WFJ, Roelofs LAJ, *et al.* Hypospadias: a transgenerational effect of diethylstilbestrol? *Hum Reprod* 2006;**21**:666–9. doi:10.1093/humrep/dei398
- 172 Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard M-O, *et al.* Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. 2011. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.02.047
- 173 Arpino C, Brescianini S, Robert E, *et al.* Teratogenic effects of antiepileptic drugs: use of an International Database on Malformations and Drug Exposure (MADRE). *Epilepsia* 2000;**41**:1436–43.
- 174 Rodríguez-Pinilla E, Mejías C, Prieto-Merino D, *et al.* Risk of hypospadias in newborn infants exposed to valproic acid during the first trimester of pregnancy: a case-control study in Spain. *Drug Saf* 2008;**31**:537–43.
- 175 Jentink J, Loane MA, Dolk H, *et al.* Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *N Engl J Med* 2010;**362**:2185–93. doi:10.1056/NEJMoa0907328
- 176 Hunt S, Russell A, Smithson WH, *et al.* Topiramate in pregnancy: preliminary experience from the UK Epilepsy and Pregnancy Register. *Neurology* 2008;**71**:272–6. doi:10.1212/01.wnl.0000318293.28278.33
- 177 Bánhidly F, Puhó EH, Czeizel AE. Efficacy of medical care of epileptic pregnant women based on the rate of congenital abnormalities in their offspring. *Congenit Anom (Kyoto)* 2011;**51**:34–42. doi:10.1111/j.1741-4520.2010.00300.x
- 178 Watts DH, Li D, Handelsman E, *et al.* Assessment of birth defects according to maternal therapy among infants in the Women and Infants Transmission Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;**44**:299–305. doi:10.1097/QAI.0b013e31802e2229
- 179 Czeizel AE, Kazy Z, Puhó E. A population-based case-control teratological study of oral nystatin treatment during pregnancy. *Scand J Infect Dis* 2003;**35**:830–5.
- 180 Reis M, Källén B. Delivery outcome after maternal use of antidepressant drugs in pregnancy: an update using Swedish data. *Psychol Med* 2010;**40**:1723–33. doi:10.1017/S0033291709992194
- 181 Källén B, Nilsson E, Otterblad Olausson P. Maternal use of loperamide in early pregnancy and delivery outcome. *Acta Paediatr* 2008;**97**:541–5. doi:10.1111/j.1651-2227.2008.00718.x
- 182 Czeizel AE, Rockenbauer M, Sørensen HT, *et al.* The teratogenic risk of trimethoprim-sulfonamides: a population based case-control study. *Reprod Toxicol* 2001;**15**:637–46.
- 183 Czeizel AE, Rockenbauer M. Population-based case-control study of teratogenic potential of corticosteroids. *Teratology* 1997;**56**:335–40. doi:10.1002/(SICI)1096-9926(199711)56:5<335::AID-TERA7>3.0.CO;2-W
- 184 Källén B, Otterblad Olausson P. Use of anti-asthmatic drugs during pregnancy. 3. Congenital malformations in the infants. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;**63**:383–8. doi:10.1007/s00228-006-0259-z
- 185 Carmichael SL, Ma C, Werler MM, *et al.* Maternal corticosteroid use and hypospadias. *J Pediatr* 2009;**155**:39–44, 44.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2009.01.039
- 186 Nørgaard M, Wogelius P, Pedersen L, *et al.* Maternal use of oral contraceptives during early pregnancy and risk of hypospadias in male offspring. *Urology* 2009;**74**:583–7. doi:10.1016/j.urology.2009.04.034
- 187 Asklund C, Jørgensen N, Skakkebaek NE, *et al.* Increased frequency of reproductive health problems among fathers of boys with hypospadias. *Hum Reprod* 2007;**22**:2639–46. doi:10.1093/humrep/dem217

- 188 Källén B, Finnström O, Nygren KG, *et al.* In vitro fertilization (IVF) in Sweden: risk for congenital malformations after different IVF methods. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;**73**:162–9. doi:10.1002/bdra.20107
- 189 Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, *et al.* Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod* 2000;**15**:944–8.
- 190 Ericson A, Källén B. Congenital malformations in infants born after IVF: a population-based study. *Hum Reprod* 2001;**16**:504–9.
- 191 Fedder J, Gabrielsen A, Humaidan P, *et al.* Malformation rate and sex ratio in 412 children conceived with epididymal or testicular sperm. *Hum Reprod* 2007;**22**:1080–5. doi:10.1093/humrep/del488
- 192 Pinborg A, Loft A, Nyboe Andersen A. Neonatal outcome in a Danish national cohort of 8602 children born after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection: the role of twin pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;**83**:1071–8. doi:10.1111/j.0001-6349.2004.00476.x
- 193 Källén B, Finnström O, Lindam A, *et al.* Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in Sweden. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;**88**:137–43. doi:10.1002/bdra.20645
- 194 Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, *et al.* Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod* 2002;**17**:671–94.
- 195 Meijer WM, de Jong-Van den Berg LTW, van den Berg MD, *et al.* Clomiphene and hypospadias on a detailed level: signal or chance? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006;**76**:249–52. doi:10.1002/bdra.20243
- 196 Lind JN, Tinker SC, Broussard CS, *et al.* Maternal medication and herbal use and risk for hypospadias: data from the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2007. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2013;**22**:783–93. doi:10.1002/pds.3448
- 197 Sørensen HT, Pedersen L, Skriver MV, *et al.* Use of clomifene during early pregnancy and risk of hypospadias: population based case-control study. *BMJ* 2005;**330**:126–7. doi:10.1136/bmj.38326.606979.79
- 198 Fritz G, Czeizel AE. Abnormal sperm morphology and function in the fathers of hypospadiacs. *J Reprod Fertil* 1996;**106**:63–6.
- 199 Rocheleau CM, Romitti PA, Dennis LK. Pesticides and hypospadias: A meta-analysis. *J Pediatr Urol* 2009;**5**:17–24. doi:10.1016/j.jpuro.2008.08.006
- 200 Nassar N, Abeywardana P, Barker A, *et al.* Parental occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals and risk of hypospadias in infants. *Occup Environ Med* 2010;**67**:585–9. doi:10.1136/oem.2009.048272
- 201 Morales-Suárez-Varela MM, Toft G V, Jensen MS, *et al.* Parental occupational exposure to endocrine disrupting chemicals and male genital malformations: a study in the Danish National Birth Cohort study. *Environ Health* 2011;**10**:3. doi:10.1186/1476-069X-10-3
- 202 Fernandez MF, Olmos B, Granada A, *et al.* Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: A nested case-control study. *Environ Health Perspect* 2007;**115**:8–14. doi:10.1289/ehp.9351
- 203 Vrijheid M, Armstrong B, Dolk H, *et al.* Risk of hypospadias in relation to maternal occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals. *Occup Environ Med* 2003;**60**:543–50.

- 204 Jørgensen KT, Jensen MS, Toft GV, *et al.* Risk of cryptorchidism and hypospadias among boys of maternal hairdressers - a Danish population-based cohort study. *Scand J Work Environ Health* 2013;**39**:302–9. doi:10.5271/sjweh.3330
- 205 García AM, Fletcher T. Maternal occupation in the leather industry and selected congenital malformations. *Occup Environ Med* 1998;**55**:284–6.
- 206 Vaktskjold A, Talykova L V, Nieboer E. Congenital anomalies in newborns to women employed in jobs with frequent exposure to organic solvents--a register-based prospective study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011;**11**:83. doi:10.1186/1471-2393-11-83
- 207 Cordier S, Garlantézec R, Labat L, *et al.* Exposure during pregnancy to glycol ethers and chlorinated solvents and the risk of congenital malformations. *Epidemiology* 2012;**23**:806–12. doi:10.1097/EDE.0b013e31826c2bd8
- 208 Garlantézec R, Monfort C, Rouget F, *et al.* Maternal occupational exposure to solvents and congenital malformations: a prospective study in the general population. *Occup Environ Med* 2009;**66**:456–63. doi:10.1136/oem.2008.041772
- 209 Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 2001;**7**:282–6.
- 210 Toppari J, Virtanen HE, Main KM, *et al.* Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;**88**:910–9. doi:10.1002/bdra.20707
- 211 Boisen K, Kaleva M, Main K, *et al.* Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* 2004;**363**:1264–9. doi:10.1016/S0140-6736(04)15998-9
- 212 Agarwal PK, Diaz M, Elder JS. Retractable Testis—Is it Really a Normal Variant? *J Urol* 2006;**175**:1496–9. doi:10.1016/S0022-5347(05)00674-9
- 213 Bingöl-Koloğlu M, Tanyel FC, Anlar B, *et al.* Cremasteric reflex and retraction of a testis. *J Pediatr Surg* 2001;**36**:863–7. doi:10.1053/jpsu.2001.23956
- 214 Pettersson A, Richiardi L, Nordenskjold A, *et al.* Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *N Engl J Med* 2007;**356**:1835–41. doi:10.1056/NEJMoa067588
- 215 Myrup C, Schnack T, Wohlfahrt J. Correction of Cryptorchidism and Testicular Cancer. *N Engl J Med* 2007;**357**:825–7. doi:10.1056/NEJMc071510
- 216 Chan E, Wayne C, Nasr A, *et al.* Ideal timing of orchiopexy: a systematic review. *Pediatr Surg Int* 2014;**30**:87–97. doi:10.1007/s00383-013-3429-y
- 217 Virtanen HE, Toppari J. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Hum Reprod Update* 2008;**14**:49–58. doi:10.1093/humupd/dmm027
- 218 Klonisch T, Fowler PA, Hombach-Klonisch S. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Dev Biol* 2004;**270**:1–18. doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.018
- 219 Hughes IA, Acerini CL. Factors controlling testis descent. *Eur J Endocrinol* 2008;**159**:S75–82. doi:10.1530/EJE-08-0458
- 220 Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, *et al.* Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatr* 2007;**96**:611–6. doi:10.1111/j.1651-2227.2007.00241.x
- 221 Barthold JS. Undescended testis: current theories of etiology. *Curr Opin Urol* 2008;**18**:395–400. doi:10.1097/MOU.0b013e3283005869
- 222 Berkowitz GS, Lapinski RH. Risk factors for cryptorchidism: a nested case-control study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1996;**10**:39–51.

- 223 Brouwers MM, de Bruijne LM, de Gier RPE, *et al.* Risk factors for undescended testis. *J Pediatr Urol* 2012;**8**:59–66. doi:10.1016/j.jpurol.2010.11.001
- 224 Weidner I, Moller H, Jensen T, *et al.* Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. *J Urol* 1999;**161**:1606–9. doi:10.1016/S0022-5347(05)68992-6
- 225 Beard CM, Melton LJ, O’Fallon WM, *et al.* Cryptorchism and maternal estrogen exposure. *Am J Epidemiol* 1984;**120**:707–16.
- 226 Berkowitz GS, Lapinski RH, Dolgin SE, *et al.* Prevalence and natural history of cryptorchidism. *Pediatrics* 1993;**92**:44–9.
- 227 Berkowitz GS, Lapinski RH, Godbold JH, *et al.* Maternal and neonatal risk factors for cryptorchidism. *Epidemiology* 1995;**6**:127–31.
- 228 Biggs M Lou, Baer A, Critchlow CW. Maternal, delivery, and perinatal characteristics associated with cryptorchidism: a population-based case-control study among births in Washington State. *Epidemiology* 2002;**13**:197–204.
- 229 Damgaard IN, Jensen TK, Nordic Cryptorchidism Study Group, *et al.* Risk factors for congenital cryptorchidism in a prospective birth cohort study. *PLoS One* 2008;**3**:e3051. doi:10.1371/journal.pone.0003051
- 230 Ghirri P, Ciulli C, Vuerich M, *et al.* Incidence at birth and natural history of cryptorchidism: a study of 10,730 consecutive male infants. *J Endocrinol Invest* 2002;**25**:709–15. doi:10.1007/BF03345105
- 231 Jensen MS, Toft G, Thulstrup AM, *et al.* Cryptorchidism according to maternal gestational smoking. *Epidemiology* 2007;**18**:220–5. doi:10.1097/01.ede.0000254061.90686.9f
- 232 Jones ME, Swerdlow AJ, Griffith M, *et al.* Prenatal risk factors for cryptorchidism: a record linkage study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1998;**12**:383–96.
- 233 Mavrogenis S, Urbán R, Czeizel AE. Characteristics of boys with the so-called true undescended testis diagnosed at the third postnatal month--a population-based case-control study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015;**28**:1152–7. doi:10.3109/14767058.2014.947569
- 234 McGlynn KA, Graubard BI, Klebanoff MA, *et al.* Risk factors for cryptorchism among populations at differing risks of testicular cancer. *Int J Epidemiol* 2006;**35**:787–95. doi:10.1093/ije/dyl024
- 235 Preiksa RT, Zilaitiene B, Matulevicius V, *et al.* Higher than expected prevalence of congenital cryptorchidism in Lithuania: a study of 1204 boys at birth and 1 year follow-up. *Hum Reprod* 2005;**20**:1928–32. doi:10.1093/humrep/deh887
- 236 Thong M, Lim C, Fatimah H. Undescended testes: incidence in 1,002 consecutive male infants and outcome at 1 year of age. *Pediatr Surg Int* 1998;**13**:37–41.
- 237 Zakaria M, Azab S, El baz M, *et al.* Cryptorchidism in Egyptian neonates. *J Pediatr Urol* 2013;**9**:815–9. doi:10.1016/j.jpurol.2012.10.024
- 238 Virtanen HE, Tapanainen AE, Kaleva MM, *et al.* Mild gestational diabetes as a risk factor for congenital cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:4862–5. doi:10.1210/jc.2006-1420
- 239 Davies TW, Williams DR, Whitaker RH. Risk factors for undescended testis. *Int J Epidemiol* 1986;**15**:197–201.
- 240 Kurahashi N, Kasai S, Shibata T, *et al.* Parental and neonatal risk factors for cryptorchidism. *Med Sci Monit* 2005;**11**:CR274-283.
- 241 Main KM, Kiviranta H, Virtanen HE, *et al.* Flame Retardants in Placenta and Breast Milk and Cryptorchidism in Newborn Boys. *Environ Health Perspect* 2007;**115**:1519. doi:10.1289/ehp.9924

- 242 Adams S V, Hastert TA, Huang Y, *et al.* No association between maternal pre-pregnancy obesity and risk of hypospadias or cryptorchidism in male newborns. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;**91**:241–8. doi:10.1002/bdra.20805
- 243 Mongraw-Chaffin ML, Cohn BA, Cohen RD, *et al.* Maternal smoking, alcohol consumption, and caffeine consumption during pregnancy in relation to a son's risk of persistent cryptorchidism: a prospective study in the Child Health and Development Studies cohort, 1959-1967. *Am J Epidemiol* 2008;**167**:257–61. doi:10.1093/aje/kwm311
- 244 Strandberg-Larsen K, Jensen MS, Ramlau-Hansen CH, *et al.* Alcohol binge drinking during pregnancy and cryptorchidism. *Hum Reprod* 2009;**24**:3211–9. doi:10.1093/humrep/dep325
- 245 Zhang L, Wang X-H, Zheng X-M, *et al.* Maternal gestational smoking, diabetes, alcohol drinking, pre-pregnancy obesity and the risk of cryptorchidism: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 2015;**10**:e0119006. doi:10.1371/journal.pone.0119006
- 246 Philippat C, Giorgis-Allemand L, Chevrier C, *et al.* Analgesics During Pregnancy and Undescended Testis. *Epidemiology* 2011;**22**:747–9. doi:10.1097/EDE.0b013e318225bf33
- 247 Jørgensen KT, Jensen MS, Toft GV, *et al.* Risk of cryptorchidism among sons of horticultural workers and farmers in Denmark. *Scand J Work Environ Health* 2014;**40**:323–30. doi:10.5271/sjweh.3399
- 248 Weidner IS, Møller H, Jensen TK, *et al.* Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* 1998;**106**:793–6.
- 249 Amiard J-C, Meunier T, Babut M. *PCB, environnement et santé*. Paris: : Tec & Doc 2016.
- 250 Blanchard O, Glorennec P, Mercier F, *et al.* Semivolatile organic compounds in indoor air and settled dust in 30 French dwellings. *Environ Sci Technol* 2014;**48**:3959–69. doi:10.1021/es405269q
- 251 Agudo A, Goñi F, Etxeandia A, *et al.* Polychlorinated biphenyls in Spanish adults: Determinants of serum concentrations. *Environ Res* 2009;**109**:620–8. doi:10.1016/j.envres.2009.03.009
- 252 Glynn A, Aune M, Darnerud PO, *et al.* Determinants of serum concentrations of organochlorine compounds in Swedish pregnant women: a cross-sectional study. *Environ Health* 2007;**6**:2. doi:10.1186/1476-069X-6-2
- 253 Wolff MS, Deych E, Ojo F, *et al.* Predictors of organochlorines in New York City pregnant women, 1998-2001. *Environ Res* 2005;**97**:170–7. doi:10.1016/j.envres.2004.07.014
- 254 Règlement (CE) N° 850/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 concernant les polluants organiques persistants et modifiant la directive 79/117/CEE. *OJ L 158* 2004;**2004**:7–49.
- 255 Règlement (UE) N° 1259/2011 de la commission du 2 décembre 2011 modifiant le règlement (CE) n° 1881/2006 en ce qui concerne les teneurs maximales en dioxines, en PCB de type dioxine et en PCB autres que ceux de type dioxine des denrées alimentaires. *JO L 320/18* 2011;**8**:18–23.
- 256 Règlement (CE) N° 396/2005 du parlement européen et du conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et anima. *JO L 70/1* 2005.
- 257 INRS. Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France. 2012;:1–23.
- 258 Ministère de l'écologie et du développement durable., ADEME. Plan national de décontamination et d'élimination des appareils contenant des PCB et PCT. 2003.

- 259 Ministère de l'écologie du développement et de l'aménagement durables, Ministère de l'agriculture et de la Pêche, Ministère de la Santé de la Jeunesse et des Sports. Plan national d'actions sur les polychlorobiphényles (PCB). 2008.
- 260 Ma R, Sassoon DA. PCBs exert an estrogenic effect through repression of the Wnt7a signaling pathway in the female reproductive tract. *Environ Health Perspect* 2006;**114**:898–904.
- 261 Hamers T, Kamstra JH, Cenijs PH, *et al.* In vitro toxicity profiling of ultrapure non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners and their relative toxic contribution to PCB mixtures in humans. *Toxicol Sci* 2011;**121**:88–100. doi:10.1093/toxsci/kfr043
- 262 Colciago A, Casati L, Mornati O, *et al.* Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat Part 2: Effects on reproductive parameters, on sex behavior, on memory retention and on hypothalamic expression of aromatase and 5alpha-reductases in the offs. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;**239**:46–54. doi:10.1016/j.taap.2009.04.023
- 263 Colciago A, Negri-Cesi P, Pravettoni A, *et al.* Prenatal Aroclor 1254 exposure and brain sexual differentiation: effect on the expression of testosterone metabolizing enzymes and androgen receptors in the hypothalamus of male and female rats. *Reprod Toxicol* 2006;**22**:738–45. doi:10.1016/j.reprotox.2006.07.002
- 264 Hany J, Lilienthal H, Sarasin a, *et al.* Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;**158**:231–43. doi:10.1006/taap.1999.8710
- 265 WHO, UNEP. State of the science of endocrine disrupting chemicals. 2012.
- 266 Wójtowicz AK, Goch M, Gregoraszczyk EL. Polychlorinated biphenyls (PCB 153 and PCB 126) action on conversion of 20-hydroxylated cholesterol to progesterone, androstenedione to testosterone, and testosterone to estradiol 17beta. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005;**113**:464–70. doi:10.1055/s-2005-865776
- 267 Woodhouse AJ, Cooke GM. Suppression of aromatase activity in vitro by PCBs 28 and 105 and Aroclor 1221. *Toxicol Lett* 2004;**152**:91–100. doi:10.1016/j.toxlet.2004.04.009
- 268 Cai J, Wang C, Wu T, *et al.* Disruption of spermatogenesis and differential regulation of testicular estrogen receptor expression in mice after polychlorinated biphenyl exposure. *Toxicology* 2011;**287**:21–8. doi:10.1016/j.tox.2011.05.010
- 269 Dickerson SM, Cunningham SL, Patisaul HB, *et al.* Endocrine disruption of brain sexual differentiation by developmental PCB exposure. *Endocrinology* 2011;**152**:581–94. doi:10.1210/en.2010-1103
- 270 Lo S, King I, Alléra A, *et al.* Effects of various pesticides on human 5alpha-reductase activity in prostate and LNCaP cells. *Toxicol In Vitro* 2007;**21**:502–8. doi:10.1016/j.tiv.2006.10.016
- 271 Gregoraszczyk EL, Ptak A, Karniewska M, *et al.* Action of defined mixtures of PCBs, p,p'-DDT and its metabolite p,p'-DDE, on co-culture of porcine theca and granulosa cells: steroid secretion, cell proliferation and apoptosis. *Reprod Toxicol* 2008;**26**:170–4. doi:10.1016/j.reprotox.2008.07.003
- 272 Wango EO, Onyango DW, Odongo H, *et al.* In vitro production of testosterone and plasma levels of luteinising hormone, testosterone and cortisol in male rats treated with heptachlor. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1997;**118**:381–6.
- 273 Singh SK, Pandey RS. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. *Indian J Exp Biol* 1990;**28**:953–6.

- 274 Wilson VS, LeBlanc GA. Endosulfan elevates testosterone biotransformation and clearance in CD-1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;**148**:158–68. doi:10.1006/taap.1997.8319
- 275 Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, *et al.* Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;**179**:1–12. doi:10.1006/taap.2001.9347
- 276 Nativelle-Serpentini C, Richard S, Séralini G-E, *et al.* Aromatase activity modulation by lindane and bisphenol-A in human placental JEG-3 and transfected kidney E293 cells. *Toxicol In Vitro* 2003;**17**:413–22.
- 277 Saradha B, Vaithinathan S, Mathur PP. Single exposure to low dose of lindane causes transient decrease in testicular steroidogenesis in adult male Wistar rats. *Toxicology* 2008;**244**:190–7. doi:10.1016/j.tox.2007.11.011
- 278 Yamasaki K, Okuda H, Takeuchi T, *et al.* Effects of in utero through lactational exposure to dicyclohexyl phthalate and p,p'-DDE in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett* 2009;**189**:14–20. doi:10.1016/j.toxlet.2009.04.023
- 279 Gray LE, Ostby J, Furr J, *et al.* Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update* 2001;**7**:248–64.
- 280 Rasier G, Parent A-S, Gérard A, *et al.* Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol Reprod* 2007;**77**:734–42. doi:10.1095/biolreprod.106.059303
- 281 Danzo BJ, Shappell HW, Banerjee A, *et al.* Effects of nonylphenol, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (p,p'-DDE), and pentachlorophenol on the adult female guinea pig reproductive tract. *Reprod Toxicol*; **16**:29–43.
- 282 Meerts IA, Letcher RJ, Hoving S, *et al.* In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect* 2001;**109**:399–407.
- 283 Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, *et al.* In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci* 2006;**92**:157–73. doi:10.1093/toxsci/kfj187
- 284 Stoker TE, Cooper RL, Lambright CS, *et al.* In vivo and in vitro anti-androgenic effects of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;**207**:78–88. doi:10.1016/j.taap.2005.05.010
- 285 Lilienthal H, Hack A, Roth-Härer A, *et al.* Effects of developmental exposure to 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environ Health Perspect* 2006;**114**:194–201.
- 286 Yu Y, Zhan P. Time-dependent effects of pentabrominated diphenyl ethers on gonadal hormone and genital system histology in male rats. *Toxicol Environ Chem* 2011;**93**:352–9. doi:10.1080/02772248.2010.527189
- 287 Brucker-Davis F, Wagner-Mahler K, Delattre I, *et al.* Cryptorchidism at birth in Nice area (France) is associated with higher prenatal exposure to PCBs and DDE, as assessed by colostrum concentrations. *Hum Reprod* 2008;**23**:1708–18. doi:10.1093/humrep/den186
- 288 Carmichael SL, Herring AH, Sjödin A, *et al.* Hypospadias and halogenated organic pollutant levels in maternal mid-pregnancy serum samples. *Chemosphere* 2010;**80**:641–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.055

- 289 Hosie S, Loff S, Witt K, *et al.* Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes? *Eur J Pediatr Surg Off J Austrian Assoc Pediatr Surg . [et al] = Zeitschrift für Kinderchirurgie* 2000;**10**:304–9. doi:10.1055/s-2008-1072381
- 290 McGlynn KA, Guo X, Graubard BI, *et al.* Maternal pregnancy levels of polychlorinated biphenyls and risk of hypospadias and cryptorchidism in male offspring. *Environ Health Perspect* 2009;**117**:1472–6. doi:10.1289/ehp.0800389
- 291 Bhatia R, Shiao R, Petreas M, *et al.* Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies. *Environ Health Perspect* 2005;**113**:220–4.
- 292 Longnecker MP, Klebanoff MA, Brock JW, *et al.* Maternal Serum Level of 1,1-Dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene and Risk of Cryptorchidism, Hypospadias, and Polythelia among Male Offspring. *Am J Epidemiol* 2002;**155**:313–22. doi:10.1093/aje/155.4.313
- 293 Damgaard IN, Skakkebaek NE, Toppari J, *et al.* Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. *Environ Health Perspect* 2006;**114**:1133–8.
- 294 Rignell-Hydbom A, Lindh CH, Dillner J, *et al.* A nested case-control study of intrauterine exposure to persistent organochlorine pollutants and the risk of hypospadias. *PLoS One* 2012;**7**:e44767. doi:10.1371/journal.pone.0044767
- 295 Pierik FH, Klebanoff MA, Brock JW, *et al.* Maternal pregnancy serum level of heptachlor epoxide, hexachlorobenzene, and β -hexachlorocyclohexane and risk of cryptorchidism in offspring. *Environ Res* 2007;**105**:364–9. doi:10.1016/j.envres.2007.04.005
- 296 Cao Y, Winneke G, Wilhelm M, *et al.* Environmental exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls reduce levels of gonadal hormones in newborns: results from the Duisburg cohort study. *Int J Hyg Environ Health* 2008;**211**:30–9. doi:10.1016/j.ijheh.2007.04.005
- 297 Longnecker MP, Gladen BC, Cupul-Uicab LA, *et al.* In utero exposure to the antiandrogen 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) in relation to anogenital distance in male newborns from Chiapas, México. *Am J Epidemiol* 2007;**165**:1015–22. doi:10.1093/aje/kwk109
- 298 Su P-H, Huang P-C, Lin C-Y, *et al.* The effect of in utero exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls on reproductive development in eight year-old children. *Environ Int* 2012;**39**:181–7. doi:10.1016/j.envint.2011.09.009
- 299 Hsu P-C, Lai T-J, Guo N-W, *et al.* Serum hormones in boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *J Toxicol Environ Health A* 2005;**68**:1447–56. doi:10.1080/15287390590967360
- 300 Gladen BC, Klebanoff MA, Hediger ML, *et al.* Prenatal DDT exposure in relation to anthropometric and pubertal measures in adolescent males. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:1761–7.
- 301 Mol NM, Sørensen N, Weihe P, *et al.* Spermaturation and serum hormone concentrations at the age of puberty in boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls. *Eur J Endocrinol* 2002;**146**:357–63.
- 302 Grandjean P, Grønlund C, Kjær IM, *et al.* Reproductive hormone profile and pubertal development in 14-year-old boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls. *Reprod Toxicol* 2012;**34**:498–503. doi:10.1016/j.reprotox.2012.07.005
- 303 Kristensen SL, Ramlau-Hansen CH, Ernst E, *et al.* Prenatal exposure to persistent organochlorine pollutants and female reproductive function in young adulthood. *Environ Int* 2016;**92**:366–72. doi:10.1016/j.envint.2016.04.024
- 304 Vested A, Ramlau-Hansen CH, Olsen SF, *et al.* In utero exposure to persistent organochlorine pollutants and reproductive health in the human male. *Reproduction* 2014;**148**:635–46. doi:10.1530/REP-13-0488

- 305 Vasiliu O, Muttineni J, Karmaus W. In utero exposure to organochlorines and age at menarche. *Hum Reprod* 2004;**19**:1506–12. doi:10.1093/humrep/deh292
- 306 Yang C-Y, Yu M-L, Guo H-R, *et al.* The endocrine and reproductive function of the female Yucheng adolescents prenatally exposed to PCBs/PCDFs. *Chemosphere* 2005;**61**:355–60. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.02.089
- 307 Namulanda G, Maisonet M, Taylor E, *et al.* In utero exposure to organochlorine pesticides and early menarche in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Environ Int* Published Online First: 2016. doi:10.1016/j.envint.2016.06.001
- 308 Cohn BA, Cirillo PM, Wolff MS, *et al.* DDT and DDE exposure in mothers and time to pregnancy in daughters. *Lancet* 2003;**361**:2205–6. doi:10.1016/S0140-6736(03)13776-2
- 309 Cohn BA, Cirillo PM, Sholtz RI, *et al.* Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in mothers and time to pregnancy in daughters. *Reprod Toxicol* 2011;**31**:290–6. doi:10.1016/j.reprotox.2011.01.004
- 310 Han L, Hsu W-W, Todem D, *et al.* In utero exposure to polychlorinated biphenyls is associated with decreased fecundability in daughters of Michigan female fishers: a cohort study. *Environ Health* 2016;**15**:92. doi:10.1186/s12940-016-0175-3
- 311 Vested A, Giwercman A, Bonde JP, *et al.* Persistent organic pollutants and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014;**16**:71–80. doi:10.4103/1008-682X.122345
- 312 Buck Louis GM, Sundaram R, Schisterman EF, *et al.* Persistent environmental pollutants and couple fecundity: the LIFE study. *Environ Health Perspect* 2013;**121**:231–6. doi:10.1289/ehp.1205301
- 313 Chevrier C, Warembourg C, Gaudreau E, *et al.* Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, seafood consumption, and time-to-pregnancy. *Epidemiology* 2013;**24**:251–60. doi:10.1097/EDE.0b013e31827f53ec
- 314 Harley KG, Marks AR, Chevrier J, *et al.* PBDE concentrations in women's serum and fecundability. *Environ Health Perspect* 2010;**118**:699–704. doi:10.1289/ehp.0901450
- 315 Bonde JP, Toft G, Rylander L, *et al.* Fertility and markers of male reproductive function in Inuit and European populations spanning large contrasts in blood levels of persistent organochlorines. *Environ Health Perspect* 2008;**116**:269–77. doi:10.1289/ehp.10700
- 316 Giwercman AH, Rignell-Hydbom A, Toft G, *et al.* Reproductive hormone levels in men exposed to persistent organohalogen pollutants: a study of inuit and three European cohorts. *Environ Health Perspect* 2006;**114**:1348–53.
- 317 Richthoff J, Rylander L, Jönsson BAG, *et al.* Serum levels of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) in relation to markers of reproductive function in young males from the general Swedish population. *Environ Health Perspect* 2003;**111**:409–13.
- 318 Goncharov A, Rej R, Negoita S, *et al.* Lower serum testosterone associated with elevated polychlorinated biphenyl concentrations in Native American men. *Environ Health Perspect* 2009;**117**:1454–60. doi:10.1289/ehp.0800134
- 319 Haugen TB, Tefre T, Malm G, *et al.* Differences in serum levels of CB-153 and p,p'-DDE, and reproductive parameters between men living south and north in Norway. *Reprod Toxicol* 2011;**32**:261–7. doi:10.1016/j.reprotox.2011.06.072
- 320 Schell LM, Gallo M V, Deane GD, *et al.* Relationships of polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) with testosterone levels in adolescent males. *Environ Health Perspect* 2014;**122**:304–9. doi:10.1289/ehp.1205984
- 321 Brody JG, Moysich KB, Humblet O, *et al.* Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies. *Cancer* 2007;**109**:2667–711. doi:10.1002/cncr.22655

Références

- 322 Golden R, Kimbrough R. Weight of evidence evaluation of potential human cancer risks from exposure to polychlorinated biphenyls: an update based on studies published since 2003. *Crit Rev Toxicol* 2009;**39**:299–331. doi:10.1080/10408440802291521
- 323 Snedeker SM. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environ Health Perspect* 2001;**35**:47.
- 324 Zhang J, Huang Y, Wang X, *et al.* Environmental Polychlorinated Biphenyl Exposure and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS One* 2015;**10**:e0142513. doi:10.1371/journal.pone.0142513
- 325 Ritchie JM, Vial SL, Fuortes LJ, *et al.* Comparison of proposed frameworks for grouping polychlorinated biphenyl congener data applied to a case-control pilot study of prostate cancer. *Environ Res* 2005;**98**:104–13. doi:10.1016/j.envres.2004.05.013
- 326 Ritchie JM, Vial SL, Fuortes LJ, *et al.* Organochlorines and risk of prostate cancer. *J Occup Environ Med* 2003;**45**:692–702. doi:10.1097/01.jom.0000071510.96740.0b
- 327 Ruder AM, Hein MJ, Hopf NB, *et al.* Mortality among 24,865 workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs) in three electrical capacitor manufacturing plants: a ten-year update. *Int J Hyg Environ Health* 2014;**217**:176–87. doi:10.1016/j.ijheh.2013.04.006
- 328 Purdue MP, Engel LS, Langseth H, *et al.* Prediagnostic serum concentrations of organochlorine compounds and risk of testicular germ cell tumors. *Environ Health Perspect* 2009;**117**:1514–9. doi:10.1289/ehp.0800359
- 329 McGlynn KA, Quraishi SM, Graubard BI, *et al.* Polychlorinated biphenyls and risk of testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 2009;**69**:1901–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3935
- 330 Brucker-Davis F, Ducot B, Wagner-Mahler K, *et al.* Polluants environnementaux dans le lait maternel et cryptorchidie. *Gynécologie Obs Fertil* 2008;**36**:840–7. doi:10.1016/j.gyobfe.2008.06.024
- 331 Virtanen HE, Koskenniemi JJ, Sundqvist E, *et al.* Associations between congenital cryptorchidism in newborn boys and levels of dioxins and PCBs in placenta. *Int J Androl* 2012;**35**:283–93. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01233.x
- 332 Gladen BC, Ragan NB, Rogan WJ. Pubertal growth and development and prenatal and lactational exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene. *J Pediatr* 2000;**136**:490–6. doi:10.1016/S0022-3476(00)90012-X
- 333 Institut national de recherche et de sécurité. Panorama de l'utilisation des solvants en France fin 2004. 2005;**65**:97.
- 334 Afsset. Les éthers de glycol - Synthèse des connaissances sur les expositions de la population générale en France. Saisine Afsset n°2003/016. 2008. <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2003et0016Ra-3.pdf> (accessed 20 Jun2016).
- 335 Vinck L, Memmi S. Les expositions aux risques professionnels: les produits chimiques. Enquête Sumer 2010. 2015.
- 336 Guignon N, Sandret N. Sumer 2003 : Les expositions aux produits cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques. *Doc pour le médecin du Trav* 2005;**471**:83.
- 337 Garlantézec R, Multigner L, Labat L, *et al.* Urinary biomarkers of exposure to glycol ethers and chlorinated solvents during pregnancy: determinants of exposure and comparison with indirect methods of exposure assessment. *Occup Environ Med* 2012;**69**:62–70. doi:10.1136/oem.2010.062315
- 338 Inserm. *Ethers de glycol : Quels risques pour la santé ?* Les éditions Inserm, France 1999.
- 339 Inserm. *Éthers de glycol : Nouvelles données toxicologiques.* Les éditions Inserm, France 2006.

- 340 Berger T, Miller MG, Horner CM. In vitro fertilization after in vivo treatment of rats with three reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*;14:45–53.
- 341 Davis BJ, Almekinder JL, Flagler N, *et al.* Ovarian luteal cell toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and methoxy acetic acid in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;142:328–37. doi:10.1006/taap.1996.8035
- 342 Bolon B, Bucci TJ, Warbritton AR, *et al.* Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays. *Fundam Appl Toxicol* 1997;39:1–10.
- 343 Almekinder JL, Lennard DE, Walmer DK, *et al.* Toxicity of methoxyacetic acid in cultured human luteal cells. *Fundam Appl Toxicol* 1997;38:191–4.
- 344 Rao KS, Cobel-Geard SR, Young JT, *et al.* Ethylene glycol monomethyl ether II. Reproductive and dominant lethal studies in rats. *Fundam Appl Toxicol*;3:80–5.
- 345 Hanley TR, Young JT, John JA, *et al.* Ethylene glycol monomethyl ether (EGME) and propylene glycol monomethyl ether (PGME): inhalation fertility and teratogenicity studies in rats, mice and rabbits. *Environ Health Perspect* 1984;57:7–12.
- 346 Heindel JJ, Gulati DK, Russell VS, *et al.* Assessment of ethylene glycol monobutyl and monophenyl ether reproductive toxicity using a continuous breeding protocol in Swiss CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 1990;15:683–96.
- 347 Lamb JC, Gulati DK, Russell VS, *et al.* Reproductive toxicity of ethylene glycol monoethyl ether tested by continuous breeding of CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 1984;57:85–90.
- 348 Morrissey RE, Lamb JC, Morris RW, *et al.* Results and evaluations of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1989;13:747–77.
- 349 Bossert NL, Reel JR, Lawton AD, *et al.* Reproductive toxicity of triethylene glycol and its diacetate and dimethyl ether derivatives in a continuous breeding protocol in Swiss CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 1992;18:602–8.
- 350 Carney EW, Crissman JW, Liberacki AB, *et al.* Assessment of adult and neonatal reproductive parameters in Sprague-Dawley rats exposed to propylene glycol monomethyl ether vapors for two generations. *Toxicol Sci* 1999;50:249–58.
- 351 Lemazurier E, Lecomte A, Robidel F, *et al.* Propylene glycol monomethyl ether. A three-generation study of isomer beta effects on reproductive and developmental parameters in rats. *Toxicol Ind Health* 2005;21:33–40.
- 352 Valentine R, O'Neill A., Lee K., *et al.* Subchronic inhalation toxicity of diglyme. *Food Chem Toxicol* 1999;37:75–86. doi:10.1016/S0278-6915(98)00096-9
- 353 Johnson KA, Baker PC, Kan HL, *et al.* Diethylene glycol monobutyl ether (DGBE): two- and thirteen-week oral toxicity studies in Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 2005;43:467–81. doi:10.1016/j.fct.2004.12.003
- 354 Williams J, Reel JR, George JD, *et al.* Reproductive effects of diethylene glycol and diethylene glycol monoethyl ether in Swiss CD-1 mice assessed by a continuous breeding protocol. *Fundam Appl Toxicol* 1990;14:622–35.
- 355 Tirado OM, Martinez ED, Rodriguez OC, *et al.* Methoxyacetic acid dysregulation of androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat testis. *Biol Reprod* 2003;68:1437–46. doi:10.1095/biolreprod.102.004937
- 356 Tirado OM, Selva DM, Toràn N, *et al.* Increased expression of estrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration. *J Androl* 2004;25:84–94.

- 357 Selva DM, Tirado OM, Toràn N, *et al.* Estrogen receptor beta expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene. *Biol Reprod* 2004;**71**:1461–8. doi:10.1095/biolreprod.103.025619
- 358 Henley D V, Mueller S, Korach KS. The short-chain fatty acid methoxyacetic acid disrupts endogenous estrogen receptor-alpha-mediated signaling. *Environ Health Perspect* 2009;**117**:1702–6. doi:10.1289/ehp.0900800
- 359 Jansen MS, Nagel SC, Miranda PJ, *et al.* Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:7199–204. doi:10.1073/pnas.0402014101
- 360 Henley D V, Korach KS. Physiological effects and mechanisms of action of endocrine disrupting chemicals that alter estrogen signaling. *Hormones (Athens)* 2010;**9**:191–205.
- 361 Morohoshi K, Yamamoto H, Kamata R, *et al.* Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicol In Vitro* 2005;**19**:457–69. doi:10.1016/j.tiv.2005.01.004
- 362 Multigner L, Catala M, Cordier S, *et al.* The INSERM expert review on glycol ethers: findings and recommendations. *Toxicol Lett* 2005;**156**:29–37. doi:10.1016/j.toxlet.2003.12.077
- 363 Swan SH, Beaumont JJ, Hammond SK, *et al.* Historical cohort study of spontaneous abortion among fabrication workers in the Semiconductor Health Study: agent-level analysis. *Am J Ind Med* 1995;**28**:751–69.
- 364 Schenker MB, Gold EB, Beaumont JJ, *et al.* Association of spontaneous abortion and other reproductive effects with work in the semiconductor industry. *Am J Ind Med* 1995;**28**:639–59.
- 365 Correa A, Gray RH, Cohen R, *et al.* Ethylene Glycol Ethers and Risks of Spontaneous Abortion and Subfertility. *Am J Epidemiol* 1996;**143**:707–17. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a008804
- 366 Gray R, Correa A, Hakim R, *et al.* Ethylene glycol ethers and reproductive health in semiconductor workers. *Occup Hyg* 1996;**2**:331–8.
- 367 Elliott RC, Jones JR, McElvenny DM, *et al.* Spontaneous abortion in the British semiconductor industry: An HSE investigation. Health and Safety Executive. *Am J Ind Med* 1999;**36**:557–72.
- 368 Cordier S, Bergeret A, Goujard J, *et al.* Congenital malformation and maternal occupational exposure to glycol ethers. Occupational Exposure and Congenital Malformations Working Group. *Epidemiology* 1997;**8**:355–63.
- 369 Cordier S, Szabova E, Fevotte J, *et al.* Congenital malformations and maternal exposure to glycol ethers in the Slovak Republic. *Epidemiology* 2001;**12**:592–3.
- 370 Chevrier C, Dananché B, Bahuaui M, *et al.* Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. *Occup Environ Med* 2006;**63**:617–23. doi:10.1136/oem.2005.024067
- 371 Lorente C, Cordier S, Bergeret A, *et al.* Maternal occupational risk factors for oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Scand J Work Environ Health* 2000;**26**:137–45.
- 372 Brender J, Suarez L, Hendricks K, *et al.* Parental occupation and neural tube defect-affected pregnancies among Mexican Americans. *J Occup Environ Med* 2002;**44**:650–6.
- 373 Shaw GM, Velie EM, Katz EA, *et al.* Maternal occupational and hobby chemical exposures as risk factors for neural tube defects. *Epidemiology* 1999;**10**:124–9.
- 374 Saavedra D, Arteaga M, Tena M. Industrial contamination with glycol ethers resulting in teratogenic damage. *Ann N Y Acad Sci* 1997;**837**:126–37.

- 375 El-Zein RA, Abdel-Rahman SZ, Morris DL, *et al.* Exposure to ethylene glycol monomethyl ether: clinical and cytogenetic findings. *Arch Environ Health*;57:371–6. doi:10.1080/00039890209601424
- 376 Bolt HM, Golka K. Maternal exposure to ethylene glycol monomethyl ether acetate and hypospadias in offspring: a case report. *Br J Ind Med* 1990;47:352–3.
- 377 Welch LS, Schrader SM, Turner TW, *et al.* Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: II. Male reproduction. *Am J Ind Med* 1988;14:509–26.
- 378 Ratcliffe JM, Schrader SM, Clapp DE, *et al.* Semen quality in workers exposed to 2-ethoxyethanol. *Br J Ind Med* 1989;46:399–406.
- 379 Samuels SJ, McCurdy SA, Pocekay D, *et al.* Fertility history of currently employed male semiconductor workers. *Am J Ind Med* 1995;28:873–82.
- 380 Veulemans H, Steeno O, Masschelein R, *et al.* Exposure to ethylene glycol ethers and spermatogenic disorders in man: a case-control study. *Br J Ind Med* 1993;50:71–8.
- 381 Multigner L, Ben Brik E, Arnaud I, *et al.* Glycol ethers and semen quality: a cross-sectional study among male workers in the Paris Municipality. *Occup Environ Med* 2007;64:467–73. doi:10.1136/oem.2005.023952
- 382 Cherry N, Moore H, McNamee R, *et al.* Occupation and male infertility: glycol ethers and other exposures. *Occup Environ Med* 2008;65:708–14. doi:10.1136/oem.2007.035824
- 383 Hsieh G-Y, Wang J-D, Cheng T-J, *et al.* Prolonged menstrual cycles in female workers exposed to ethylene glycol ethers in the semiconductor manufacturing industry. *Occup Environ Med* 2005;62:510–6. doi:10.1136/oem.2004.016014
- 384 Eskenazi B, Gold EB, Samuels SJ, *et al.* Prospective assessment of fecundability of female semiconductor workers. *Am J Ind Med* 1995;28:817–31.
- 385 Chen P-C, Hsieh G-Y, Wang J-D, *et al.* Prolonged time to pregnancy in female workers exposed to ethylene glycol ethers in semiconductor manufacturing. *Epidemiology* 2002;13:191–6.
- 386 Chia SE, Foo SC, Khoo NY, *et al.* Menstrual patterns of workers exposed to low levels of 2-ethoxyethylacetate (EGEEA). *Am J Ind Med* 1997;31:148–52.
- 387 Garlantézec R, Warembourg C, Monfort C, *et al.* Urinary glycol ether metabolites in women and time to pregnancy: the PELAGIE cohort. *Environ Health Perspect* 2013;121:1167–73. doi:10.1289/ehp.1206103
- 388 Needham LL, Grandjean P, Heinzow B, *et al.* Partition of environmental chemicals between maternal and fetal blood and tissues. *Environ Sci Technol* 2011;45:1121–6. doi:10.1021/es1019614
- 389 Patterson DG, Isaacs SG, Alexander LR, *et al.* Determination of specific polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in blood and adipose tissue by isotope dilution-high-resolution mass spectrometry. *IARC Sci Publ* 1991;:299–342.
- 390 Philippat C, Mortamais M, Chevrier C, *et al.* Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environ Health Perspect* 2012;120:464–70. doi:10.1289/ehp.1103634
- 391 Clifton VL. Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta* 2010;31 Suppl:S33–9. doi:10.1016/j.placenta.2009.11.010
- 392 Firth D. Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika* 1993;80:27–38. doi:10.1093/biomet/80.1.27
- 393 Goeman JJ, Solari A. Multiple Testing for Exploratory Research. *Stat Sci* 2011;26:584–97.

Références

- 394 Bender R, Lange S. Adjusting for multiple testing--when and how? *J Clin Epidemiol* 2001;**54**:343–9.
- 395 Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1990;**1**:43–6.
- 396 Liu M, Lu W, Krogh V, *et al.* Estimation and selection of complex covariate effects in pooled nested case-control studies with heterogeneity. *Biostatistics* 2013;**14**:682–94. doi:10.1093/biostatistics/kxt015
- 397 Rochester JR, Bolden AL. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect* 2015;**123**:643–50. doi:10.1289/ehp.1408989
- 398 Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire. Baromètre IRSN 2015 - La perception des risques et de la sécurité par les Français. 2015;:160.
- 399 Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, *et al.* Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health* 2012;**11**:42. doi:10.1186/1476-069X-11-42
- 400 Trasande L, Zoeller RT, Hass U, *et al.* Burden of disease and costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union: an updated analysis. *Andrology* 2016;**4**:565–72. doi:10.1111/andr.12178

ANNEXE 1. PROTOCOLES D'ETUDE DES COHORTES PELAGIE ET EDEN

Tableau 12. Différence entre les protocoles d'étude des cohortes PELAGIE et EDEN

	PELAGIE	EDEN
Période d'inclusion	2002-2006	2003-2006
Mode de recrutement	Inclusion par des gynécologues et échographistes (libéraux et hospitaliers) indépendamment du lieu d'accouchement	Inclusion des femmes venues en consultation prénatale aux CHU de Poitiers et de Nancy et y ayant accouché
Prélèvement urinaire	<19 SA 1 ^{ères} urines du matin	Entre 24 et 28 SA 1 ^{ères} urines du matin
Conservation des prélèvements	Congelé à réception du prélèvement expédié par voie postale (utilisation d'un stabilisateur) Stockage à -20°C	Congelé le jour du prélèvement Stockage à -80°C
Laboratoire d'analyse	Unité fonctionnelle d'hormonologie, CHU de Lille	LABOCEA (Laboratoire public conseil, expertise et analyse en Bretagne), Brest
Identification des cas de malformation	Examen clinique à la naissance : testicule en place oui/non ; hypospade oui/non	Examen clinique à la naissance : position des testicules et du méat urinaire
Confirmation des cas de malformation	Suivi auprès des chirurgiens pédiatriques de la région. Auto-questionnaire maternel à 2 ans	Examen clinique à 1 an Auto-questionnaire maternel à 4, 8 et 12 mois

ANNEXE 2. EXPOSITION AUX ETHERS DE GLYCOL ET MALFORMATION GENITALE DANS LA COHORTE EDEN

Tableau 13. Estimation du risque de malformation génitale en association avec l'exposition aux EG dans la cohorte EDEN

		Malformation génitale confirmée (n=17 cas)	
(%>LD)	mg/l	N cas/ N témoins	OR [IC 95%] ^a
MAA (99%)	T1: <0.10	4/15	Ref.
	T2 : 0.10 ; 0.18	3/15	2.08 (0.27 ; 20.71)
	T3 : >0.18	10/20	2.92 (0.63 ; 20.97)
EAA (95%)	T1 : <0.011	5/20	Ref.
	T2 : 0.011 ; 0.025	8/14	4.63 (0.60 ; 95.85)
	T3 : >.025	4/16	3.55 (0.47 ; 62.42)
EEAA (97%)	T1 : <0.037	7/20	Ref.
	T2 : 0.037 ; 0.093	3/20	0.39 (0.03 ; 2.94)
	T3 : >0.93	7/10	1.79 (0.25 ; 12.62)
PhAA (99%)	T1 : <0.215	7/16	Ref.
	T2 : 0.215 ; 1.07	5/18	0.65 (0.11 ; 3.73)
	T3 : >1.07	5/16	0.49 (0.08 ; 2.79)
2-MPA (96%)	T1 : <0.018	4/16	Ref.
	T2 : 0.018 ; 0.038	4/17	0.60 (? ; 4.71)
	T3 : >0.038	9/17	9.82 (1.10 ; 8110)

2-MPA, 2-methoxypropionic acid; EAA, ethoxyacetic acid; EEAA, ethoxyethoxyacetic acid; LD, limite de détection; MAA, methoxyacetic acid; PhAA, phenoxyacetic acid; T1, premier tercile; T2, deuxième tercile; T3, troisième tercile.

^a Ajusté sur l'âge maternel (<25; 25-25; ≥35), le niveau d'études (≤bac ; >bac), consommation d'alcool (non; oui), indice de masse corporelle (continu) et niveau de créatinine (continu)

Résumé

Depuis plusieurs décennies, le rôle des expositions environnementales dans la survenue des anomalies de la reproduction suscite l'intérêt de la communauté scientifique. La période prénatale est une phase critique du développement et l'exposition à des substances chimiques au cours de la grossesse pourrait avoir des conséquences sur la santé de l'enfant et de l'adulte. De nombreuses études chez l'animal ont mis en évidence que diverses molécules chimiques étaient toxiques pour la reproduction ou le développement et, pour certaines d'entre elles, en interférant avec le système endocrinien. Chez l'Homme, les effets de l'exposition prénatale à des substances susceptibles d'altérer l'équilibre hormonal du fœtus restent mal documentés. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier l'effet de l'exposition prénatale à certains polluants chimiques en s'intéressant à deux indicateurs d'anomalie du développement du système reproducteur à la naissance : les niveaux d'hormones sexuelles et les malformations congénitales de l'appareil génital du garçon. Ce travail s'appuie sur les données issues de cohortes mère-enfants françaises ayant recruté des femmes enceintes au cours de leur grossesse et pour lesquelles des prélèvements biologiques ont permis la mesure de l'exposition prénatale. Les classes chimiques plus spécifiquement étudiées dans cette thèse comprennent les polluants organiques persistants (polychlorobiphényles, pesticides organochlorés et retardateurs de flamme bromés) et les éthers de glycol, une classe de solvants oxygénés. Les études menées mettent en évidence des risques accrus d'anomalies du développement du système reproducteur, potentiellement associées à des mécanismes de perturbation endocrinienne, en lien avec l'exposition prénatale aux deux familles de polluants étudiées. Des modifications des niveaux d'hormones sexuelles sont observées en association avec l'exposition prénatale à divers polluants organiques persistants. L'exposition prénatale à certains éthers de glycol est associée à une augmentation du risque d'hypospade ainsi qu'à des modifications des niveaux d'hormones sexuelles. Ces résultats suggèrent les effets d'expositions prénatales à des polluants chimiques ubiquitaires, sur le système endocrinien du fœtus.

Mots clés : Cohorte ; Exposition environnementale ; Grossesse ; Perturbation endocrinienne

Abstract

From last decades, researchers had increased interest about the impact of environmental exposures on reproductive impairment. The fetal life is a crucial period of development and exposure to chemicals during gestation may lead to adverse health outcomes at birth or later in life. A number of toxicological studies have reported that some chemicals are reproductive or developmental toxicants, some of them interacting with the endocrine system. In humans, evidence about the endocrine effects of these molecules is limited. The aim of this thesis is to study the effect of prenatal exposure to chemicals on two endocrine-sensitive endpoints at birth: sex hormone levels and congenital anomalies of the genitalia. This work is based on data collected in two French mother-child cohorts that included pregnant women during pregnancy and collected biological samples to perform exposure assessment. Two chemicals classes are studied namely persistent organic pollutants (polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, and polybrominated diphenyl ethers) and glycol ethers, a class of oxygenated solvents. The studies conducted suggest effects of prenatal exposure to both classes of chemicals on endocrine-sensitive endpoints related to reproductive health. Modifications of sex hormone levels are observed in association with exposure to various persistent organic pollutants. Prenatal exposure to some glycol ethers is associated with an increased risk of hypospadias and with modifications of sex hormone levels. These results highlight the potential effect of prenatal exposure to ubiquitous chemicals, on the endocrine system of the fetus.

Keywords: Cohorts ; Environmental exposure ; Pregnancy ; Endocrine disruption