

Les perturbateurs endocriniens et la grossesse

NORA BENACHOUR ET GILLES-ERIC SERALINI

Laboratoire Estrogènes et Reproduction EA 2608 et CRIIGEN,
Institut de Biologie IBFA, Université de Caen

résumé

L'exposition des fœtus à des combinaisons de xénobiotiques provenant de l'environnement maternel a été montrée comme ayant des effets synergiques, complexes, et des effets retard, ces dernières années.

L'ensemble de notre environnement est pollué et les cellules fœtales sont déjà contaminées *in utero* par des xénobiotiques qui se lient au moins par dizaines, de manière covalente, à leur ADN, favorisant des mutations et maladies génétiques, futurs cancers hormono-dépendants ou maladies endocriniennes. L'ensemble des gènes d'un fœtus est différenciellement exposé à ces perturbateurs, avec une sensibilité accrue des oncogènes les plus utilisés, les moins recouverts d'histones et protéines. Les cellules sexuelles très enclines aux mitoses sont aussi très sensibles. Les effets des xénobiotiques chez le fœtus peuvent provoquer de manière différée des troubles du comportement sexuel, une diminution de la fécondité, des issues néfastes de la grossesse ou des modifications des organes génitaux ou du système endocrinien correspondant, qui devient un sujet d'intérêt croissant pour l'étude des risques professionnels. Ces xénobiotiques sont souvent des perturbateurs endocriniens (PE) via les interactions avec des protéines de transport, les récepteurs d'hormones sexuelles ou les enzymes de la stéroïdogénèse. Nos travaux sur des cellules humaines embryonnaires ou placentaires se sont focalisés sur les effets cytotoxiques de certains xénobiotiques dont les pesticides à base de glyphosate, comme le Roundup, le desherbant le plus utilisé au monde, dont les résidus sont parmi les principaux polluants des eaux de rivière et de surface, et leur effet PE sur l'enzyme cruciale aromatase. Ces connaissances pourront contribuer à la compréhension de la toxicité placentaire humaine *in vivo*, et expliquer les problèmes des grossesses interrompues chez les femmes contaminées, et par récurrence les problèmes de leurs enfants exposés *in utero*.



Incidences des polluants chimiques PE potentiels chez la femme enceinte

Les études épidémiologiques, cliniques et expérimentales ont suggéré qu'une exposition excessive aux estrogènes, pendant la vie fœtale et/ou néonatale, pouvait conduire aux désordres des fonctions de reproduction observées à la naissance. L'imprégnation prénatale du fœtus par les polluants chimiques pourrait être responsable de l'augmentation observée depuis quelques années des malformations génitales chez les petits garçons (cryptorchidie, hypospadias, micropénis...), des troubles de la différenciation sexuelle (pseudo-hermaphrodisme), des retards de croissance intra-utérine, des pubertés précoces et chez l'adulte le cancer testiculaire et d'autres maladies comme les allergies, l'asthme, l'Alzheimer et le Parkinson.

La plupart de ces produits chimiques résidus industriels non biodégradables interfèrent avec le développement du système endocrinien, en particulier par leur tendance estrogéno-mimétique de nos propres hormones, tandis que leur activité anti-androgénique leur permet de s'opposer aux hormones mâles. C'est le cas de l'insecticide Chlordécone CD qui fait diminuer la fertilité masculine et du médicament Diéthylstilbestrol DES, commercialisé sous le nom de « Distilbène » utilisé entre 1950 et 1977, qui provoque des malformations congénitales chez les enfants des mères exposées au médicament ⁽¹⁾. Il a été administré pendant la vie fœtale de garçons nés malades d'hypospadias ⁽²⁾. Ainsi, des études épidémiologiques incriminent les PE par exemple dans les malformations sexuelles notamment chez les nouveaux nés mâles. Trois phénomènes ont attiré l'attention des épidémiologistes : l'augmentation des malformations de l'appareil urogénital masculin à la naissance ; l'augmentation de l'incidence du cancer du testicule ⁽³⁻⁴⁾ et la baisse de la qualité du sperme ⁽⁵⁾ ou l'hypospermie ⁽⁶⁾. Par exemple, les augmentations des malformations urogénitales et congénitales du pénis et des cryptorchidies seraient dues à une exposition aux estrogènes au début de la grossesse ou à des contaminants environnementaux ⁽⁷⁻⁹⁾.

Le Pr. Charles Sultan, endocrinologue au CHU de Montpellier a déclaré en décembre 2005, dans le rapport « des médecins accusent notre environnement » qu'il n'y a

mots-clés

Aromatase, grossesse, perturbateurs endocriniens, stéroïdogénèse, xénobiotiques.

pas forcément une relation directe de cause à effet entre les maladies et les produits chimiques PE, mais il existe plutôt une association.

De plus, les problèmes chez les filles peuvent se manifester sous forme de pubertés très précoces, alors que les problèmes chez les garçons se constatent dès la naissance ^(8,10-11).

Chez ces garçons plusieurs phénomènes de malformations génitales engrammées au cours de la grossesse se regroupent pour donner un nouveau syndrome dit de dysgénésie testiculaire ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Par ailleurs, le Dr Michel Odent a considéré que la pollution intra-utérine est la principale menace pour les générations non encore conçues, et d'après la "Banque de Données de la Recherche Primal Health" il a été confirmé que **notre santé est déterminée en grande partie lors de notre vie intra-utérine** (voir le site : www.birthworks.org/primalhealth). En effet, nous avons tous dans nos organismes de 300 à 500 produits de synthèse chimique qui n'existaient pas il y a seulement 50 ans ! Il serait très difficile de donner une liste exhaustive des polluants présents dans les liquides intra-utérins (et également dans le lait). Cependant, la liste s'allonge tous les jours : il suffit de mentionner les familles de polluants bien connus tels que les Dioxines, PCB, Furanos et les pesticides. Ces substances sont liposolubles et ont une longue durée de vie : elles s'accumulent dans nos tissus adipeux au fil du temps et passent à la génération suivante par le biais du placenta et de l'allaitement maternel comme il a été démontré par les études de Shen et al., en 2007 et en 2008 ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾, des données récoltées en Finlande et au Danemark. Ils ont démontré que les insecticides DDT et DDE et autres organochlorés se concentrent bien dans le lait maternel et le placenta et sont à l'origine des malformations urogénitales (cryptorchidie et hypospadias). Ainsi, il serait totalement **artificiel de différencier les conséquences de la pollution intra-utérine de celles du lait**. Ce sont les mêmes substances chimiques liposolubles qui sont concernées dans les deux cas. Toutefois, la contamination pendant la vie intra-utérine est plus préoccupante, car elle intervient à un stade plus précoce du développement du fœtus ⁽¹⁷⁾.

■ Augmentation de la vulnérabilité des mâles *in utero*

Les malformations des voies urogénitales mâles sont en augmentation dans différents pays industrialisés comme en France, Espagne, Finlande, Norvège, Colombie, aux États-Unis et au Danemark. En France, un taux de 2,7 % de malformations a été observé sur 1000 naissances en Languedoc Roussillon ⁽¹⁸⁾. Des taux de 2,4 % et 9 % ont respectivement été mis en évidence en Finlande (taux observé sur 1494 naissances à Turku), et au Danemark avec des taux observés sur 1068 naissances à Copenhague ⁽¹⁹⁻²⁰⁾. Par ailleurs, l'analyse des données sur tous les bébés de sexe masculin du Danemark, après qu'un diagnostic de cryptorchidie ou d'hypospadias a été fait entre 1983 et 1992, indique la prédo-

minance de cryptorchidie chez les bébés de 3 mois qui est de 6,2 %, indiquant une hausse significative de ce risque chez ces garçons nés de femmes travaillant dans le domaine du jardinage. Il est d'ailleurs très élevé vis-à-vis des données danoises de l'équipe de Boisen, examinées par les mêmes procédures ⁽²¹⁾. Cela suggère que l'exposition maternelle aux pesticides induit un effet nuisible sur le développement du système reproducteur des bébés, en dépit des mesures spéciales de protection des femmes enceintes.

De plus, l'équipe d'Andersen a réalisé des expériences sur des animaux pour reproduire ces malformations congénitales. Ainsi, ils ont exposé durant la gestation soit des rats aux phtalates, soit le porc au Flutamide, qui sont des substances à action œstrogéniques et anti-androgéniques. Ils ont démontré que ces substances dans les deux cas provoquaient une cryptorchidie qui est associée à une diminution du nombre de cellules germinales, et pour le cas du porc, il y a une diminution de l'expression des ARNm codant pour les récepteurs œstrogéniques (ERα) dans l'épididyme, mais avec une augmentation protéique du même récepteur dans le testicule. Au USA, il a été démontré par l'équipe de Bell en 2001 ⁽²²⁾, en Californie, sur 611 femmes enceintes et exposées au moins à 5 pesticides entre la 3^{ème} et 8^{ème} semaine de grossesse, l'existence de 73 cas de morts fœtales dues aux anomalies congénitales. Une étude espagnole a comparé les taux de cryptorchidies dans différentes régions de la Province de Grenade ⁽²³⁾. Etant donné que ce défaut de naissance peut-être aisément corrigé par un acte chirurgical, il a été facile de calculer la fréquence de cette intervention précise. Les cultures de fruits et de légumes de la région de Grenade sont traitées avec 51 % des pesticides utilisés en Espagne. Dans de nombreuses régions le long de la côte méditerranéenne, on pratique la culture sous serre avec des systèmes sous plastique. Dans ces serres fermées, les ouvriers agricoles (dont des femmes enceintes) sont soumis à des taux élevés de pesticides. On a montré que le nombre d'interventions spécifiques sur les testicules était significativement plus élevé dans les contrées où l'usage de pesticides était le plus important. En effet, en 1999, des biopsies d'enfants décédés habitant en zone rurale de Grenade ont décelé la présence de 1 à 13 pesticides dans leur organisme.

Par ailleurs, l'hypospadias, qui est la malformation la plus rencontrée du pénis, est aussi plus fréquente, comme il a été montré aux États-Unis dans quatre régions de 1970 à 1993. Durant la même période, les cancers des testicules avaient également augmenté ⁽²⁴⁾. De nos jours, il est communément admis que la plupart des cancers des testicules sont la conséquence des effets à long terme de troubles du développement apparus précocement.

La baisse spectaculaire de la moyenne du nombre des spermatozoïdes dans les spermogrammes depuis le milieu du 20^{ème} siècle est le signe le plus intrigant, montrant la vulnérabilité accrue du système génital mâle. La seule explication plausible est que toutes les substances chimiques synthétiques que

nous accumulons depuis des années dans nos tissus graisseux, se comportent comme des perturbateurs du système hormonal. Ils interfèrent tout particulièrement avec le développement des testicules dès le début de la vie intra-utérine. Par exemple, la consommation des poissons du lac d'Ontario semble raccourcir les cycles menstruels, chez les femmes de New York, du fait qu'ils contiennent 4,3 fois plus de PCB que les eaux potables ⁽²⁵⁾. En utilisant un modèle de culture organotypique de testicule fœtal et néonatal qui reproduit le développement observé *in vivo*, ces chercheurs ont montré que les estrogènes affectent directement le développement de la stéroïdogenèse et de la gamétogenèse et mis en évidence l'existence de fenêtres chronologiques de sensibilité.

En Juin 2005 le National Institute of Environmental Health Sciences (USA) établit qu'il est possible de corréler le taux d'exposition des mères aux phtalates durant leur grossesse avec un index composite résumant les dystrophies de l'appareil génital des bébés de sexe masculin ⁽²⁶⁾. Des effets sur le développement ont été décrits à des doses notablement inférieures à celles considérées jusque là sans effet sur les espèces animales modèles. D'autre part, Koopman-Esseboom et ses collaborateurs en 1996 ⁽²⁷⁾ ont déjà montré par des données cliniques que de jeunes enfants exposés pendant la grossesse, puis nourris au sein, présentaient davantage d'anomalies des sous-populations lymphocytaires que des témoins non exposés.

■ Malformations néonatales et accouchements prématurés

Si on se réfère à une étude américaine portant sur huit ans de collecte d'informations par les centres de contrôle des maladies (CDC: Center for Disease Control), de 1989 à 1996, le taux des malformations néonatales est en augmentation. De surcroît, sur la même période, le taux de **naissances prématurées a augmenté de 4,5%** lors des premières grossesses chez des femmes blanches. Ce taux était encore plus important chez les femmes américaines d'origine africaine. Les auteurs suggèrent que la pollution est la cause la plus probable de ces taux augmentés. Deux types de problèmes sont évoqués, soit des avortements spontanés, ou la baisse du rapport garçons / filles à la naissance.

Selon une estimation faite par Hassold en 1983 ⁽²⁸⁾, il y aurait **132 avortements spontanés concernant des embryons mâles contre 100 pour les embryons femelles**. Ainsi, le rapport entre le nombre des nouveaux nés mâles et femelles devrait diminuer. Pendant la première moitié du siècle, ce rapport était en légère augmentation. Récemment, la **proportion de mâles a significativement diminué au Japon et au USA ⁽²⁹⁾ et en Europe ⁽³⁰⁾**. Au Danemark et aux Pays-Bas elle a diminué parallèlement depuis les années 1950, et depuis 1970 au Canada (Allan et al., 1997), où il y a eu la perte de 2,2 bébés mâles pour 1000 naissances. En Italie (Mocarelli et al., 2008), bien que l'on puisse invoquer différentes explications pour ce déclin,

il est hautement probable que la pollution prénatale en soit la principale cause. Cette supposition est étayée par les observations faites à la suite de l'accident industriel survenu en 1976 à Seveso. Cet accident a été à l'origine de la plus importante documentation jamais recueillie sur une population soumise à une exposition au TCDD, une dioxine parmi les plus toxiques. Entre 1977 et 1984, 48 filles contre seulement 26 garçons sont nées de parents exposés au TCDD.

■ Développement neurologique et intellectuel

Une étude hollandaise s'est intéressée au développement neurologique chez 418 enfants de 18 mois ⁽³³⁾. La moitié d'entre eux avait reçu un allaitement maternel pendant au moins six mois. L'autre moitié avait reçu du lait maternisé. La mesure des PCB dans le plasma sanguin maternel et du cordon ombilical a permis d'apprécier l'exposition prénatale à ces polluants. Pour apprécier l'exposition postnatale, les PCB et les dioxines ont été mesurés dans le lait maternel et dans le lait maternisé. Dans ce dernier, ces polluants étaient en-dessous des limites de détection. Après avoir pris en compte de nombreux facteurs associés, il est apparu que **l'exposition aux PCB durant la vie fœtale avait une influence négative sur l'examen neurologique pratiqué au 18^{ème} mois**. Par contre, on n'a pu détecter aucun effet négatif de l'exposition aux PCB et aux dioxines par l'allaitement maternel. Bien au contraire, l'allaitement maternel avait un effet positif sur la coordination des mouvements. Les résultats d'une telle étude suggèrent qu'en ce qui concerne le développement neurologique, la pollution intra-utérine représente probablement un problème plus important pour les fœtus à venir que la pollution du lait maternel.



Sur les cellules humaines placentaires et embryonnaires

L'effet toxique des xénobiotiques sur les cellules humaines placentaires et embryonnaires et les effets directs sur les enzymes de la stéroïdogenèse ⁽³⁴⁻³⁵⁾ est un sujet peu connu ; ainsi avons-nous voulu montrer les impacts de certains polluants chimiques PE potentiels à ce niveau, tout en nous focalisant sur l'étude du complexe enzymatique aromatase ⁽³⁶⁻³⁹⁾. Le cytochrome P450 aromatase est l'une des enzymes clés responsable de la bioconversion irréversible des androgènes en estrogènes pendant l'étape terminale et cruciale de la stéroïdogenèse ⁽⁴⁰⁾. Ainsi, elle est déterminante dans le maintien de la balance androgène-estrogénique. **Les niveaux d'aromatase sont cruciaux dans divers tissus comprenant des gonades ⁽⁴¹⁾**. De ce fait, l'aromatase est impliquée en nombreuses fonctions physiologiques et dans plusieurs pathologies telles que les cancers hormono-dépendants pour lesquels plusieurs classes

d'inhibiteurs ont été conçues ⁽⁴²⁾. Les défauts d'expression d'aromatase peuvent ainsi provoquer des troubles structuraux et fonctionnels de la reproduction, du développement, de la différenciation sexuelle et de la croissance.

Jusqu'à présent, la majorité des études concerne un seul polluant chimique à la fois, alors que dans l'environnement les organismes sont quotidiennement exposés aux mélanges de divers produits ⁽⁴³⁻⁴⁶⁾. Dans la littérature scientifique, il est décrit que les cellules embryonnaires humaines 293 sont appropriées pour estimer l'activité hormonale de certains xénobiotiques ⁽⁴⁷⁾ et que les cellules placentaires humaines JEG3, présentant une activité aromatase normale, sont un bon modèle pour apprécier la toxicité placentaire ⁽⁴⁸⁾. Nos résultats confirment l'effet synergique et potentialisateur

très important des combinaisons binaires ou multiples de différents polluants à large utilisation industrielle et ayant une capacité de mimer les hormones endogènes, tels que les insecticides DDT et son métabolite DDE, l'herbicide Atrazine, le fongicide Vinclozoline et un polychlorobiphényle l'Aroclor 1254. D'autre part nous avons testé certains pesticides à base de glyphosate comme le Roundup qui est aujourd'hui l'herbicide le plus utilisé dans le monde. Le glyphosate est mélangé à plusieurs adjuvants considérés diluants sans effets et secrets de formulation ⁽⁴⁹⁾. Ce désherbant est un **bon modèle pour l'étude des effets combinés**. Les mammifères et les humains peuvent être exposés aux résidus de cet herbicide par les usages agricoles ⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾ ou quand ils entrent dans la chaîne alimentaire ⁽⁵²⁾. Cependant, le glyphosate est contaminant des rivières ^(49,53). Il a été classé par l'Institut Français de l'Environnement (IFEN) en 2001 comme le 3^{ème} polluant des eaux de surfaces derrière l'Atrazine et en 2006 il est devenu le 1^{er} ⁽⁵⁴⁾.

Nous avons démontré que les différentes substances citées qui n'ont aucun effet cytotoxique dans nos conditions à 20 µM, **deviennent cytotoxiques** et inhibitrices de l'aromatase en **mixture** à partir de 4 à 10 µM (Figure 1). De plus aux doses sub-agricoles et non toxiques les effets PE apparaissent avec l'action directe du glyphosate sur l'aromatase (Figure 2). Cependant, c'est le **mélange commercial Roundup™ qui est toujours plus cytotoxique et plus perturbateur endocrine que le glyphosate**. Les actions synergiques peuvent être au niveau enzymatique ou génétique *in vivo*. Nous suggérons que ces données puissent indiquer une toxicité placentaire humaine. En effet, il a déjà été observé que des couples d'agriculteurs utilisant le Roundup™ présentaient un nombre plus élevé de fausses couches ou autres problèmes de grossesses ⁽⁵⁵⁾.

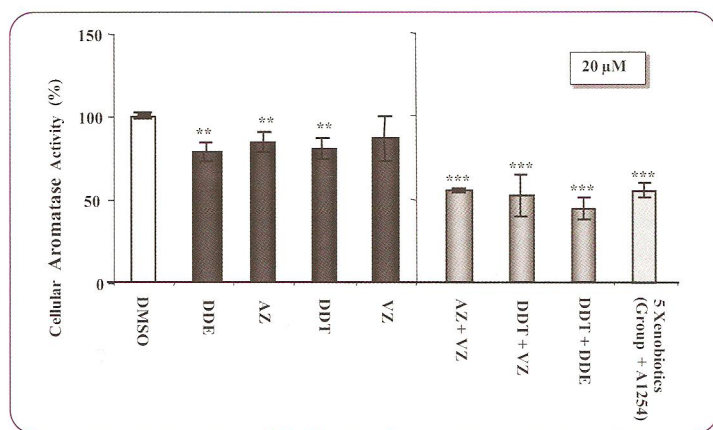


Figure 1 : Effets des xénobiotiques seuls ou en mélange binaires et multiple de DDT, son métabolite DDE, AZ, VZ, A1254 sur l'activité aromatase.

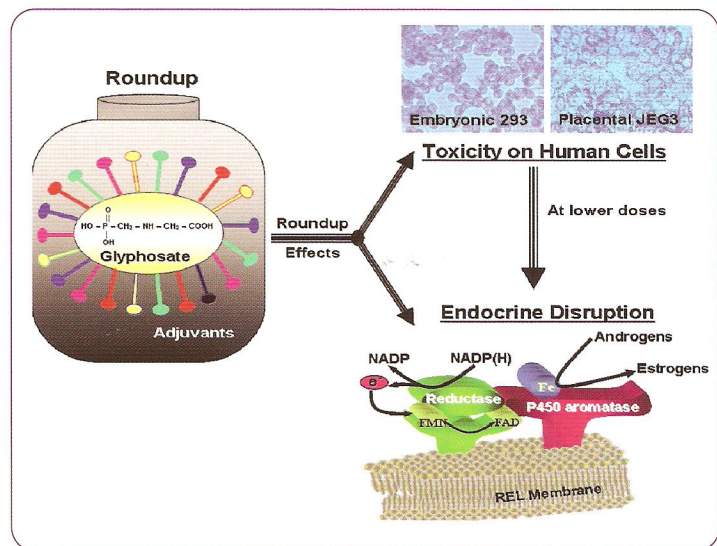


Figure 2 : Représentation schématique de l'effet cytotoxique du Roundup® sur les cellules placentaires et embryonnaires humaines, et perturbateur endocrine de l'aromatase.

Conclusion

Un nombre croissant d'évidences indique que la pollution fœtale est un fait avéré, et que celle-ci semble contribuer à des malformations congénitales et des anomalies de reproduction, nerveuses ou hormonales post-pubertaires. Les effets des xénobiotiques, synergiques, ont été négligés dans les études médicales et scientifiques alors que les résidus chimiques se sont accumulés dans notre environnement et la chaîne alimentaire depuis la seconde guerre mondiale. La stabilité (pour les plastifiants, les matériaux...) ou la toxicité (pour les pesticides) ont été des propriétés recherchées par les chimistes, sans que la spécificité ou la biodégradabilité n'aient vraiment été démontrées. La prévention et la détoxification doivent devenir des axes majeurs de recherche. ■

Conflits d'intérêts : aucun

RÉFÉRENCES

1. Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, et coll. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. *Reprod Toxicol* 1997; 11(4):465-81.
2. Klip H, Verloop J, van Gool JD, et coll. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 2002; 359(9312):1102-7.
3. Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, et coll. Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *BMJ* 2000; 321:789-92.
4. Ohlson CG, Hardell L. Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics. *Chemosphere* 2000; 40:1277-1282.
5. Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, et coll. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001; 16:1012-19.
6. Habert R, Delbes G, Duquenne C, et coll. [Effects of estrogens on the development of the testis during fetal and neonatal life]. *Gynecol Obstet Fertil [French]* 2006; 34(10):970-7.
7. Toppari J, Skakkebaek NE. Sexual differentiation and environmental endocrine disruptors. *Baill Clin Endocrin Metab* 1998; 12:143-56.
8. Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, et coll. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178:99-105.
9. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 2008; 89(2 Suppl):e33-8.
10. Sultan C, Paris F, Jeandel C, et coll. Clinical expression of precocious pubertal development in girls. *Gynecol Obstet Fertil* 2006; 33(4):197-207.
11. Paris F, Jeandel C, Servant N, et coll. Increased serum estrogenic bioactivity in three male newborns with ambiguous genitalia: A potential consequence of prenatal exposure to environmental endocrine disruptors. *Environ Res* 2006; 100:39-43.
12. Skakkebaek NE. Endocrine disruptors and testicular dysgenesis syndrome. *Horm Res* 2002; 57(S2):43.
13. Bay K, Askland C, Skakkebaek NE, et coll. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disruptors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20(1):77-90.
14. Sonne SB, Kristensen DM, Novotny GW, et coll. Testicular dysgenesis syndrome and the origin of carcinoma in situ testis. *Int J Androl* 2008; 31(2):275-87.
15. Shen H, Main KM, Virtanen HE, et coll. From mother to child: investigation of prenatal and postnatal exposure to persistent bioaccumulating toxicants using breast milk and placenta biomonitoring. *Chemosphere* 2007; 67(9):S256-62.
16. Shen H, Main KM, Andersson AM, et coll. Concentrations of persistent organochlorine compounds in human milk and placenta are higher in Denmark than in Finland. *Hum Reprod* 2008; 23(1):201-10.
17. Séralini GE. Livre : Génétiquement Incorrect. Ed Champs/Flammarion 2003; pp. 322.
18. Pascal L, Rambourg Schepens MO, Lasalle JL. Les malformations congénitales du petit garçon en Languedoc-Roussillon : Étude des cryptorchidies et des hypospadias opérés à partir des données du PMSI de 1998 à 2001. France Repro, Maisons-Alfort., ISBN 2005; 2-11-094828-0.
19. Boisen KA, Kaleva M, Main KM, et coll. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* 2004; 363(9417):1264-9.
20. Boisen KA, Chellakooty M, Schmidt IM, et coll. Hypospadias in a cohort of 1072 Danish newborn boys: prevalence and relationship to placental weight, anthropometrical measurements at birth, and reproductive hormone levels at three months of age. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(7):4041-6.
21. Andersen HR, Schmidt IM, Grandjean P, et coll. Impaired Reproductive Development in Sons of Women Occupationally Exposed to Pesticides during Pregnancy. *Environ Health Perspect* 2008; doi:10.1289/ehp.10790.
22. Bell EM, Hertz-Picciotto I, Beaumont JJ. Case-cohort analysis of agricultural pesticide applications near maternal residence and selected causes of fetal death. *Am J Epidemiol* 2001; 154(8):702-10.
23. Garcia-Rodriguez J, Garcia-Martin M, et coll. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ Health Perspect* 1996; 104:394-99.
24. Forman D, Moller H. Testicular cancer. *Cancer Surv* 1994; 19 20:323-41.
25. Mendola P, Buck GM, Sever LE, et coll. Consumption of PCB-contaminated freshwater fish and shortened menstrual cycle length. *Am J Epidemiol* 1997; 146:955-60.
26. Swan SH, Main KM, Liu F, et coll. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005; 113(8):1056-61. Erratum in: *Environ Health Perspect* 2005; 113(9):A583.
27. Koopman-Esseboom C, Weisglas-Kuperus N, de Ridder MA, et coll. Effects of polychlorinated biphenyl/dioxin exposure and feeding type on infants' mental and psychomotor development. *Pediatrics* 1996; 97(5):700-6.
28. Hassold T. Sex ratio in spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1983; 47:39-47.
29. Davis DL, Webster P, Stainthorpe H, et coll. Declines in sex ratio at birth and fetal deaths in Japan, and in U.S. whites but not African Americans. *Environ Health Perspect* 2007; 115(6):941-6.
30. Grech V, Vassallo-Agius P, Savona-Ventura C. Secular trends in sex ratios at birth in North America and Europe over the second half of the 20th century. *J Epidemiol Community Health* 2003; 57(8):612-5.
31. Allan BB, Brant K Seidel JE, Jarrel JF. Declining sex ratios in Canada. *Can Med Assoc J* 1997; 156:37-41.
32. Mocarelli P, Gerthoux PM, Patterson DG, et coll. Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environ Health Perspect* 2008; 116(1):70-7.
33. Huisman M, Koopman-Esseboom C, et coll. Neurological condition in 18-month-old children perinatally exposed to polychlorinated biphenyls and dioxins. *Early Human Development* 1995; 43:165-76.
34. Vinggaard AM, Hnida C, Breinholt V, et coll. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol In Vitro* 2000; 14:227-34.
35. Raun Andersen H, Vinggaard AM, Hoj Rasmussen T, et coll. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 179:1-12.
36. Nativelle-Serpentini C, Richard S, Séralini GE, et coll. 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.
37. Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, et coll. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect* 2005; 113:716-720.
38. Benachour N, Moslemi S, Sipahutar H, et coll. Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disruptors alone and in combination. *Toxicol Applied Pharmacol* 2007a; 222:129-140.
39. Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, et coll. Time and Dose-Dependent Effects of Roundup on Human Embryonic and Placental Cells and Aromatase Inhibition. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007b; 53(1):126-133.
40. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, et coll. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 1994; 15:342-55.
41. Sipahutar H, Sourdaine P, Moslemi S, et coll. Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:311-18.
42. Séralini GE. Aromatase inhibitors: past, present and future. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178:117-131.
43. Feron VJ, Cassee FR, Groten JP, et coll. International Issues on Human Health Effects of Exposure to Chemical Mixtures. *Environ Health Perspect* 2002; 110:893-899.
44. Tichy M, Borek-Dohalsky V, Rucki M, et coll. Risk assessment of mixtures: possibility of prediction of interaction between chemicals. *Int Arch Occup Environ Health* 2002; 75(S):133-136.
45. Lydy M, Belden J, Wheelock C, et coll. Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecology and Society* 2004; 9(6):1-15.
46. Monosson E. Chemical mixtures: considering the evolution of toxicology and chemical assessment. *Environ Health Perspect* 2005; 113:383-390.
47. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et coll. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 1998; 139:4252-63.
48. Letcher RJ, Van Holstein I, Drenth HJ, et coll. Cytotoxicity and aromatase (CYP19) activity modulation by organochlorines in human placental JEG-3 and JAR choriocarcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 160:10-20.
49. Cox C. Glyphosate (Roundup). *J Pest Reform* 1998; 18:3-17.
50. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for human. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 31:117-65.
51. Acquavella JF, Bruce H, Alexander BH, et coll. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. *Environ Health Perspect* 2004; 112:321-326.
52. Takahashi M, Horie M, Aoba N. Analysis of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in agricultural products by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2001; 42:304-08.
53. Cox C. Glyphosate. *J Pest Reform* 2004; 24:10-15.
54. IFEN, Institut Français de l'Environnement. Report on pesticides in waters. Data 2003-2004, www.ifen.fr. Orleans, France. Dossier 2006; 5:15-20.
55. Savitz D, Arbuckle T, Kaczor D, et coll. Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *American Journal of Epidemiology* 1997; 146:1025-36.