HAL
open science

Implication des effecteurs épigénétiques et apoptotiques dans l'hypospermatogenèse induite par les perturbateurs endocriniens

Léo Meunier

To cite this version:

Léo Meunier. Implication des effecteurs épigénétiques et apoptotiques dans l'hypospermatogenèse induite par les perturbateurs endocriniens. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10090 . tel-00705352

HAL Id: tel-00705352

https://theses.hal.science/tel-00705352v1

Submitted on 25 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 90-2010 Année 2010

THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le mardi 22 juin 2010

par

M. Léo MEUNIER

Implication des effecteurs épigénétiques et apoptotiques dans l'hypospermatogenèse induite par les perturbateurs endocriniens

Thèse co-dirigée par : Dr Claire MAUDUIT et Dr Mohamed BENAHMED

JURY :

Monsieur le Professeur Jean-François Michiels (président)
Madame le Dr Valérie Grandjean (rapporteur)
Monsieur le Dr Serge Carreau (rapporteur)
Monsieur le Dr Jean-Jacques Remy (rapporteur)
Madame le Professeur Mojgan Devouassoux-Shisheboran
Monsieur le Dr Patrick Balaguer
Monsieur le Dr David Rouquié
Madame le Dr Claire Mauduit
Monsieur le Dr Mohamed Benahmed

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur L. Collet**
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Secrétaire Général	M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. Gieres
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur C. Gautier
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur J. Lieto
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurance	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M R. Bernard

Remerciements

Ce travail a été initié au sein du laboratoire de recherche INSERM Unité 407 (Oullins), dirigé par le Dr Mohamed Benahmed puis poursuivi au sein du Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) INSERM Unité 895 dirigé par le Dr Yannick Le Marchand-Brustel.

Je tiens à remercier la société Bayer Cropscience et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) qui ont financé de cette thèse dans le cadre d'une convention CIFRE.

J'adresse mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance au Dr V. Grandjean, au Dr Jean-Jacques Remy et au Dr Serge Carreau pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je tiens à remercier le Pr Jean-François Michiels d'avoir accepté de présider le jury. Je remercie également le Pr M. Devouassoux-Shisheboran et le Dr P. Balaguer de me faire l'honneur de leur participation au jury.

Je tiens à remercier le Dr Mohamed Benahmed de m'avoir accueilli dans son laboratoire dès mon premier stage de licence, puis pour mon master et ma thèse. Je le remercie pour m'avoir initié à la thématique des perturbateurs endocriniens et pour m'avoir laissé entrevoir le monde de la recherche industrielle en parallèle de mon expérience dans son équipe de recherche. A son contact j'ai pu acquérir l'autonomie et, je l'espère, l'esprit scientifique critique qui me seront nécessaires tout au long de ma carrière professionnelle.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr Claire Mauduit qui a également joué un rôle clé pendant mon master et durant ma thèse. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour sa disponibilité de chaque instant, son aide précieuse et ses conseils durant les expérimentations et de la préparation de ma thèse. Merci Claire.

J'adresse mes remerciements au Dr David Rouquié avec qui nous avons collaboré tout au long de cette thèse. Je le remercie également pour m'avoir ouvert aux problématiques de recherche dans l'industrie.

Je remercie le Pr Patrick Fénichel qui a dirigé l'équipe 5 "Hormones, Reproduction et Cancers Hormonodépendants" du C3M à Nice.

Je remercie le Dr Yannick Le Marchand-Brustel qui a dirigé le Centre Méditérrannéen de Médecine Moléculaire (C3M) au sein duquel j'ai poursuivi ma thèse.

Un grand merci à Aline Bozec qui m'a fait faire mes premiers pas dans les expérimentations au laboratoire pendant mes stages de licence et de maîtrise.

A Aurélie (mon binôme de paillasse !). Tu as été une super collègue et amie tout au long de ce travail de thèse. Chaque jour j'ai pu compter sur ton aide précieuse. Au moment où j'écris ces remerciements, je me remémore : l'aventure du déménagement du laboratoire depuis Lyon, l'installation épique dans les locaux à Nice et surtout nos (interminables) séances d'autopsie à Lyon et à l'animalerie du C3M où je ronchonnais car nous ne pouvions capter que NRJ ou Nostalgie à la radio. Je te souhaite plein de bonheur et de réussite pour la suite. Au fait quand est-ce que tu m'invites en Martinique ?

A Géraldine. Merci pour tes conseils et ton aide au cours de la période niçoise de ma thèse. Et je tiens à le préciser une nouvelle fois : OUI j'avais bien mis l'enzyme… !

Je remercie tout naturellement mes collègues et ex-collègues de l'équipe 5 du C3M qui m'ont aidé tout au long de cette thèse et sans qui ce travail ne serait pas ce qu'il est : Mélanie, Marielle, David, Nadjem, Bénazir, Nicolas, Virginie et Jeannine.

Merci à tous les membres de l'équipe 6 du C3M pour leur bonne humeur quotidienne !

Je remercie également tous les autres collaborateurs avec qui j'ai pu travailler durant ma thèse ainsi que les membres du C3M que je n'ai pu citer ici.

A Marielle, Mélanie et David que j'ai appris à connaître et apprécier. Merci pour votre aide et votre soutien dans les moments de doute.

A mes amis Aurélie (toujours la même !), Virginie et Aurélien de l'unité Inserm U407 à Lyon. Le travail au sein du laboratoire m'a permis de faire votre rencontre et je n'oublierai pas les bons moments que nous avons passé ensemble. A bientôt !
A mes très chers amis Nadia et Guillaume (et vos deux loulous). Merci pour les bons moments que nous avons passés ensemble à Nice. Même si cela ne fait que deux ans et demi que nous nous connaissons, j'ai l'impression que vous êtes des amis d'enfance !

A mes potes JB et Ben. Ma thèse a fait que nous avons dû mettre entre parenthèse nos aventures musicales. J'aurai toujours ma guitare basse à disposition pour reprendre là où nous nous sommes arrêtés ! Et non je n'ai pas (encore) découvert un « vaccin » contre le cancer…

Merci à Laurence, Alain, Juju et la famille Rebuff' junior pour tout votre soutien à distance.

Je souhaite dédicacer cette thèse à mes parents, mes frères et ma grand-mère. Merci pour vos encouragements et votre confiance depuis toutes ces années.

A Valentine (ma Balou !). Cette thèse c'est aussi la tienne.
Depuis le début chaque jour, chaque instant tu as été là pour me soutenir (et me supporter). Tu as été là quand le doute s'installait et tu as toujours eu ton oreille de scientifique attentive pour m'écouter te raconter les derniers résultats (positifs !) du jour. Je n'aurai jamais assez de ces quelques lignes dans ce manuscrit pour te remercier pour ton amour. Je crois savoir que tu es contente que tout cela s'achève enfin, car maintenant de nouvelles aventures s'annoncent pour nous … Kiss kiss bang bang !

Table des matières

TABLE DES MATIERES ..... - 5 -

TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX ..... - 9 -

LISTE DES ABREVIATIONS ..... - 11 -

RESUME DE LA THESE ..... - 15 -

AVANT-PROPOS ..... - 17 -

I - LES FONCTIONS TESTICULAIRES ..... - 21 -

1 Généralités ..... - 21 -

2 Le testicule ..... - 22 -

3 Le compartiment tubulaire et la fonction exocrine du testicule ..... - 23 -
3.1 La spermatogenèse au sein des tubes séminifères ..... - 23 -
3.2 Les cellules de Sertoli : cellules de soutien pour la spermatogenèse ..... - 30 -

4 Le compartiment interstitiel et sa fonction endocrine ..... - 33 -
4.1 Structure de l'espace interstitiel ..... - 33 -
4.2 Les cellules de Leydig : cellules endocrines du testicule ..... - 34 -

5 Le développement testiculaire ..... - 38 -
5.1 Origine, spécification et migration des cellules germinales primordiales ..... - 38 -
5.2 Formation des gonades mâles ..... - 40 -
5.3 Développement postnatal des cellules germinales et initiation de la spermatogenèse ..... - 42 -

6 Le contrôle des fonctions testiculaires ..... - 43 -
6.1 Le contrôle hormonal ..... - 44 -
6.2 Les facteurs locaux paracrines ..... - 47 -

II - LES EFFECTEURS EPIGENETIQUES ..... - 49 -

1 Généralités sur le concept d'épigénétique ..... - 49 -

2 La chromatine support des mécanismes épigénétiques ..... - 50 -

3 Les différentes formes de régulation épigénétique ..... - 51 -

II.A - LA METHYLATION DE L'ADN ..... - 53 -

1 Définition et généralités ..... - 53 -

2 Les ADN méthyltransférases (DNMTs) ..... - 54 -
2.1 La famille DNMT1 – Méthylation de maintien ..... - 55 -

2.2 La famille DNMT3 – Méthylation de novo ..... - 58 -
2.3 Coopération entre DNMT1, DNMT3A et DNMT3B dans l'initiation et la maintenance des patrons de méthylation ..... - 64 -
2.4 DNMT2 – Méthylation des ARNt ..... - 66 -

3 Implications et dynamique de la méthylation de l'ADN ..... **- 67 -**
3.1 Implication de la méthylation de l'ADN dans la régulation d'expression des gènes ..... - 67 -
3.2 L'empreinte génomique parentale ..... - 70 -
3.3 L'inactivation du chromosome X ..... - 72 -
3.4 L'inactivation des éléments transposables ..... - 73 -
3.5 La méthylation de l'ADN : un processus dynamique ..... - 74 -

4 Régulation de l'expression et de l'activité des DNMTs ..... **- 77 -**
4.1 Régulation par des facteurs de transcription ..... - 77 -
4.2 Régulation par les microRNAs ..... - 78 -
4.3 Régulation par méthylation de l'ADN au niveau des gènes des DNMTs ..... - 79 -
4.4 Les facteurs régulant l'activité des DNMTs ..... - 80 -

5 La déméthylation de l'ADN ..... **- 80 -**
5.1 Implication de la déméthylation de l'ADN ..... - 80 -
5.2 Mécanismes potentiels de déméthylation de l'ADN ..... - 81 -

6 La méthylation de l'ADN et les ADN méthyltransférases dans le testicule et la spermatogenèse ..... **- 82 -**
6.1 Expression dynamique des différentes DNMTs dans le testicule et durant la maturation des cellules germinales ..... - 82 -
6.3 Dynamique et spécificités de la méthylation de l'ADN les cellules germinales mâles ..... - 89 -
6.4 Méthylation au cours de la différenciation testiculaire ..... - 91 -
6.5 Les ADN méthyltransférases ont un rôle crucial dans la spermatogenèse ..... - 92 -

7 Pathologies associées à des anomalies de méthylation de l'ADN ..... **- 94 -**
7.1 Méthylation de l'ADN et cancer ..... - 94 -
7.2 Anomalies de méthylation de l'ADN dans l'infertilité masculine ..... - 94 -
7.4 Les DNMTs et la méthylation de l'ADN dans les cancers testiculaires ..... - 96 -

II.B - LES MICRORNAS ..... - 99 -

1 Définition et généralités ..... **- 99 -**

2 Biogenèse des microRNAs ..... **- 101 -**
2.1 Gènes des miRNAs et leur transcription ..... - 101 -
2.2 Les étapes de maturation des miRNAs ..... - 103 -
2.3 Régulation de la biogenèse des microRNAs ..... - 105 -
2.4 Stabilisation et dégradation des microRNAs ..... - 109 -

3 Les différents modes d'action des microRNAs et du complexe RISC ..... **- 110 -**
3.1 Le complexe effecteur RISC ..... - 110 -
3.2 Le mécanisme de clivage des mRNA ou activité "slicer" par AGO2 ..... - 111 -
3.3 Les mécanismes d'inhibition par les protéines AGO ..... - 111 -
3.3 Les mécanismes d'activation induits par les miRNAs ..... - 114 -

4 Régulation de l'activité des microRNAs ..... **- 115 -**
4.1 Diminution de l'activité des miRNAs ..... - 115 -
4.2 Augmentation de l'activité des miRNAs ..... - 116 -

5 Les microRNAs dans le testicule et la spermatogenèse ..... **- 116 -**
5.1 Mise en évidence des microRNAs dans le testicule ..... - 116 -

5.2 Mise en évidence et rôle de la machinerie de biogenèse des microRNAs dans le testicule et dans la spermatogenèse ..... - 117 -

6 Pathologies associées à des altérations dans les microRNAs ..... **- 120 -**
6.1 Altération des microRNAs dans le cancer ..... - 121 -
6.2 Les microRNAs dans l'infertilité et les cancers testiculaires ..... - 124 -

III - LE CONCEPT D'ORIGINES DEVELOPPEMENTALES DE PATHOLOGIES ADULTES ..... - 127 -

1 Définition du concept ..... **- 127 -**

2 Programmation fœtale par les PEs des anomalies du tractus génital mâle : le Syndrome de Dysgénésie Testiculaire (SDT) ..... **- 129 -**
2.1 Mise en évidence du SDT ..... - 129 -
2.2 Le SDT : les arguments en faveur d'une origine fœtale ..... - 130 -
2.3 Programmation fœtale du SDT et des altérations du tractus génital masculin : les perturbateurs endocriniens environnementaux et autres facteurs ..... - 131 -

3 Mécanismes ? ..... **- 133 -**

IV - LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ..... - 135 -

1 Définitions et généralités ..... **- 135 -**
1.1 Définition ..... - 135 -
1.2 Nature chimique ..... - 135 -
1.3 Mécanismes d'actions ..... - 136 -

2 Exemples de perturbateurs endocriniens : effets sur le testicule et l'appareil reproducteur mâle .... **- 138 -**
2.2 Perturbateurs endocriniens d'origine naturelle ..... - 144 -
2.3 Composés modèles de PEs et leur action sur l'appareil reproducteur mâle ..... - 147 -

3 Effets épigénétiques des perturbateurs endocriniens ..... **- 153 -**
3.1 Effets des PEs sur la méthylation de l'ADN ..... - 153 -

V - RESULTATS ..... - 159 -

1 – Données supplémentaires : Validation du modèle expérimental d'exposition néonatale de rats à l'estradiol benzoate : (1) données phénotypiques macroscopiques et histologiques, (2) données phénotypiques moléculaires ..... **- 161 -**

2 - Article n°1 : Programmation néonatale de la mort des cellules germinales adultes : implication des microRNAs de la famille miR-29 dans l'inhibition des ADN méthyltransférases et de MCL-1 ..... **- 171 -**

3 - Article n°2 : Modifications à long terme du profil d'expression des protéines IAPs et SMAC/DIABLO dans le testicule de rat adulte après exposition *in utero* au flutamide ..... **- 209 -**

4 - Données supplémentaires : Altérations de l'expression des ADN méthyltransférases (DNMTs) au niveau du testicule de rat après exposition foetale au flutamide ..... **- 239 -**

VI - DISCUSSION ..... - 247 -

VII - PERSPECTIVES ..... - 265 -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... - 267 -

ANNEXES ..... - 301 -

Table des illustrations et tableaux

Figure 1. Structure de l'appareil reproducteur masculin chez l'homme. ..... - 21 -
Figure 2. Représentation schématique de la structure interne du testicule. ..... - 23 -
Figure 3. Structure des tubes séminifères. ..... - 24 -
Figure 4. Les évènements cellulaires au cours des différentes phases de la spermatogenèse. ..... - 25 -
Figure 5. Le renouvellement et les cycles de division des spermatogonies ..... - 26 -
Figure 6. Les différentes phases de la spermiogenèse ..... - 28 -
Figure 7. Différences entre le rat et l'homme au niveau des stades le long de l'épithélium séminifère ..... - 28 -
Figure 8. Représentation schématique des stades spermatogéniques chez le rat ..... - 29 -
Figure 9. Structure de la cellule de Sertoli en étroite interaction avec les cellules germinales ..... - 31 -
Figure 10. La voie de biosynthèse des stéroïdes au sein des cellules de Leydig ..... - 37 -
Figure 11. Les étapes de migration des CGPs chez la souris ..... - 39 -
Figure 12. Différenciation précoce de la gonade chez la souris ..... - 42 -
Figure 13. Evènements chronologiques lors de la première vague de spermatogenèse chez la souris ..... - 43 -
Figure 14. Contrôle hormonal de la spermatogenèse ..... - 46 -
Figure 15. Exemples de facteurs sécrétés par les cellules de Sertoli afin de contrôler leurs cellules cibles : les cellules germinales, cellules de Leydig et cellules péritubulaires myoïdes ..... - 47 -
Figure 16. Le concept classique de paysage épigénétique selon Waddington (1957) ..... - 49 -
Figure 17. Les différents niveaux de compaction de la chromatine : de la double hélice d'ADN au chromosome métaphasique ..... - 50 -
Figure 18. Représentation schématique des trois grands mécanismes de régulation épigénétique de l'expression des gènes ..... - 51 -
Figure 19. La réaction de méthylation de l'ADN ..... - 53 -
Figure 20. Structure schématique de la famille des ADN méthyltransférases ..... - 55 -
Figure 21. Les différentes formes de transcrit Dnmt1 (Dnmt1s, Dnmt1o et Dnmt1p) ..... - 56 -
Figure 22. Représentation simplifiée de la méthylation de novo et de la méthylation de maintien ..... - 58 -
Figure 23. Les différentes formes de DNMT3A chez la souris ..... - 60 -
Figure 24. Les différents épissages de DNMT3B chez la souris ..... - 61 -
Figure 25. Les différentes formes de transcrits de Dnmt3L mises en évidence dans la gonade mâle ..... - 63 -
Figure 26. Modèle pour l'un des processus de méthylation de novo associant DNMT3A puis DNMT1 ..... - 64 -
Figure 27. Modèle révisé de la maintenance des patrons de méthylation ..... - 65 -
Figure 28. Modèles de répression transcriptionnelle par méthylation de l'ADN ..... - 68 -
Figure 29. Lien entre la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones et la structure de la chromatine . - 69 -
Figure 30. L'empreinte génomique parentale chez la souris ..... - 71 -
Figure 31. Les cycles de reprogrammation du génome via la méthylation de l'ADN ..... - 75 -
Figure 32. Les deux vagues de méthylation au cours de la gamétogenèse et du développement embryonnaire précoce chez la souris ..... - 76 -
Figure 33. Les mécanismes potentiels pour la déméthylation de l'ADN chez les mammifères ..... - 82 -
Figure 34. Localisation et expression de Dnmt1/DNMT1 au cours du développement des cellules germinales chez la souris ..... - 84 -
Figure 35. Localisation et expression de Dnmt3A/DNMT3A au cours du développement des cellules germinales chez la souris ..... - 85 -
Figure 36. Localisation et expression de Dnmt3B/DNMT3B au cours du développement des cellules germinales chez la souris ..... - 87 -
Figure 37. Représentation schématique de la dynamique d'expression des DNMTs au cours de la spermatogenèse ..... - 88 -
Figure 38. Localisation et expression de Dnmt3L au cours du développement des cellules germinales chez la souris ..... - 89 -
Figure 39. La voie classique de biogenèse des microRNAs et leur action sur les transcrits ciblés ..... - 101 -
Figure 40. Localisation des miRNAs au niveau du génome ..... - 102 -
Figure 41. Le complexe Microprocesseur (DROSHA, DGCR8) interagit avec les pri-miRNAs ..... - 103 -
Figure 42. Exemples de mécanismes contrôlant la transcription des miRNAs ..... - 106 -
Figure 43. Inhibition de l'activité de DROSHA par le complexe E2-ERα ..... - 107 -

Figure 44. Représentation schématique du mécanisme d'action du complexe RISC.....- 110 -
Figure 45. Les différents mécanismes possibles pour le mécanisme d'inhibition par les miRNAs.....- 113 -
Figure 46. Modèle de répression ou d'activation de traduction de certains miRNAs spécifique du cycle cellulaire - 114 -
Figure 47. Profil d'expression des transcrits codant la machinerie de biogenèse de miRNAs au sein des sous-populations cellulaires du testicule.....- 118 -
Figure 48. Mécanismes potentiels impliqués dans la dérégulation d'expression des microRNAs dans le cancer.... - 123 -
Figure 49. Schéma récapitulatif des évènements impliqués dans la génèse de la dysgénésie testiculaire au niveau du testicule fœtal.....- 130 -
Figure 50. Mécanismes classiques d'interférence des perturbateurs endocriniens au niveau des récepteurs nucléaires aux hormones .....- 137 -
Figure 51. Différences de structure entre l'estradiol et le diethylstibestrol .....- 139 -
Figure 52. Structure de la génistéine comparée au 17β-estradiol .....- 144 -
Figure 53. Structure de la zéaralénone et ses dérivés comparée à l'estradiol (E2) .....- 146 -
Figure 54. Structures de l'estradiol (17β-estradiol) et des ses analogues synthétiques.....- 148 -
Figure 55. Représentation simplifiée des voies d'action génomique et non génomique des estrogènes et composés estrogéno-mimétiques .....- 148 -
Figure 56. Mécanismes d'action potentiels des composés antiandrogéniques (ex. hydroxyflutamide) liant le récepetur des androgènes.....- 152 -
Figure 57. Présentation du modèle expérimental d'exposition néonatale à l'estradiol benzoate .....- 163 -
Figure 58. Poids des animaux, poids des organes et comptages spermatiques.....- 167 -
Figure 59. Analyses morphologiques et de l'apoptose chez les animaux exposés à l'estradiol benzoate.....- 168 -
Figure 60. Analyse préliminaire à partir de la "Gene Ontology" de la liste des transcrits dérégulés au niveau du testicule adulte exposé durant la vie néonatale à 2,5 µg/jour d'EB.....- 169 -
Figure 61. Effet de l'exposition in utero au flutamide sur le taux d'ARNm et de protéine DNMT3A .....- 241 -
Figure 62. Effet de l'exposition in utero au flutamide sur le taux d'ARNm et de protéine DNMT3B.....- 242 -
Figure 63. Effet de l'exposition in utero au flutamide sur le taux d'ARNm et de protéine DNMT1.....- 243 -
Figure 64. Représentation schématique des effets d'une exposition développementale aux PEs sur les microRNAs, les DNMTs et les effecteurs apoptotiques. .....- 262 -

Tableau 1. Estimation des durées de la durée du cycle de l'épithélium séminifère et de la spermatogenèse chez la souris, le rat et l'homme.....- 30 -
Tableau 2. Quelques exemples de facteurs de transcription régulant l'expression des gènes DNMTs.....- 78 -
Tableau 3. Les microRNAs impliqués dans la régulation d'expression des DNMTs.....- 79 -
Tableau 4. Les différents types de petits ARNs associés aux protéines AGO, leur origine et mécanisme d'action .. - 100 -
Tableau 5. Liste des miRNAs différentiellement exprimés entre le testicule immature et mature chez la souris.... - 117 -
Tableau 6. Exemples de microRNAs supresseurs de tumeurs et oncogènes .....- 122 -
Tableau 7. Exemple de microRNAs altérés chez des patients atteints d'azoospermie non obstructive et leurs cibles .....- 125 -
Tableau 8. Récapitulatif non exhaustif des effets induits sur l'appareil reproducteur mâle par l'exposition aux estrogènes purs à différentes fenêtres d'exposition .....- 150 -
Tableau 9. Exposition aux perturbateurs endocriniens et leur impact sur l'expression des DNMTs ou sur la méthylation de l'ADN .....- 257 -

Liste des abréviations

A

ABP	Androgen Binding Protein
Abt	Activator of basal transcription
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGO	Argonaute
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ALCs	Cellules de Leydig Adultes
AMH	Hormone Anti-müllerienne
AMHR2	Récepteur de type 2 à l'hormone anti-müllerienne
Apo A1	Apolipoprotéine A1
AR	Récepeteur aux androgènes
ARE	Elément de réponse aux androgènes
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

B

BAH	Bromo adjacent domain
BBP	Benzyl butyl phthalate
Bdnf	Brain-derived neurotrophic factor
BLIMP1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
BMP	Bone morphogenetic protein
BORIS	Brother of the Regulator of Imprinted Sites
BPA	Bisphenol A

C

CGPs	Cellules germinales primordiales
CLL	Leucémie lymphoïde chronique
Cox	Cytochrome oxydase
CREB	cAMP response element-binding
CTCF	CCCTC-binding factor
Cyp	cytochrome P450

D

DBP	Dibutyl Phthalate
DEHP	Di(2-ethylhexyl) phthalate
DES	Diethylstilbestrol
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
Dhcr	Dehydrocholesterol reductase
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHH	Desert hedgehog
DHT	Dihydrotestostérone
Dlk1	Delta-like 1 homolog
DMAP1	DNMT1 associated protein 1

E

E2	Estradiol

E2F	Elongation 2 factor
EB	Estradiol benzoate
EE	Ethynil estradiol
EGF	Epidermal growth factor
EGME	Ethylène glycol monomethyl éther
ER	Récepteur aux estrogènes
ERE	Elément de réponse aux estrogènes
ERVK	Endogenous retrovirus K
ES	(Cellule) souche embryonnaire
EXP5	Exportin 5
F	
FGF	Fibroblast growth factor
FLCs	Cellules de Leydig Fœtales
FLU	Flutamide
FSH	Hormone folliculostimulante
G	
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
Gly	Glycine
GnRH	Gonadolibérine
GPR30	G Protein-coupled Receptor 30
GSTA2	Glutathion S transférase alpha type 2
GSTα	Glutathion S transférase alpha
Gtl2	Gene trap locus 2
GW182	Glycine-tryptophan protein of 182 kDa
H	
H3K27me3	Histone 3 Lysine 27 triméthylée
H3K9me1	Histone 3 Lysine 9 monométhylée
H3K9me2	Histone 3 Lysine 9 diméthylée
HDAC	Histone déacétylase
HDL	High density lipoprotein
HMT	Histone méthyltransférase
Hox	Homeobox
Hsd	Hydroxysteroid dehydrogenase
I	
IAP	Intracisternal A particle
IAPs	Inhibitors of apoptosis
Ibtk	Inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
ICRs	Imprinting control regions
IFN	Interferon
Igf2R	Insulin-like growth factor 2 receptor
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
J	
jpc	Jours postcoitum
jpn	Jours postnatals
jpp	Jours postpartum

K

KL	Kit ligand
KO	Knock out
KSRP	KH-type splicing regulatory protein

L

LDH	Lactate dehydrogenase
LDL	Low density lipoprotein
LH	Hormone lutéïnisante
LIF	Leukaemia inhibitory factor
Lys	Lysine

M

MAA	Acide methoxyacétique
MBD	Methyl binding domain
MBP	Methyl binding protein
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MEHP	Mono (2-ethylhexyl) *phtalate*
miR	MicroRNA

N

NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCoR	Nuclear corepressor
NFκB	Nuclear factor kappa B
NLS	Signal de localisation nucélaire
nt	Nucélotides

O

ORF	Open reading frame

P

P450	Cytochrome P450
PBD	Poly bromo domain
PCBs	Polychlorobiphényls
PcG	Polycomb group complex
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF-A	Platelet-derived growth factor A
PEs	Perturbateurs endocriniens
Pgk-2	Phosphoglycerate kinase 2
PHD	Plant homology domain
Pol	Polymerase
Polg	Polymerase gamma
Pou5f1	POU class 5 homeobox 1
Pro	Proline

R

Rasgrf1	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1
RFTD	Replication foci targeting domain
RHOX5	Reproductive homeobox 5
RISC	RNA-induced silencing complex
Rnase	Ribonucléase

S

SCF	Stem cell factor
SDF1	Stromal cell-derived factor-1
SDT	Syndrome dysgénésie testiculaire
SF1	Steroidogenic factor 1
Shbg	Sex hormone-binding globulin
SINE	Single interspersed nuclear element
SMAC	Second Mitochondrial Activator of Caspases
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9
SRD5A2	5 alpha reductase type 2
SRY	Sex determining region Y
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
Suv39h1	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1

T

Tcf3	Transcription factor 3
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TRBP	TAR RNA binding protein
Trp	Tryptophane
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labelling

U

UHRF1	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1

W

WT1	Wilms tumor 1

X

XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
XIC	X inactivation center
Xist	X (inactive)-specific transcript

Z

ZEA	Zearalenone

Résumé de la thèse

Un certain nombre d'études épidémiologiques ont montré au cours des cinquante dernières années une augmentation des infertilités, des malformations de l'appareil reproducteur masculin et des cancers testiculaires. Une des hypothèses est que, l'exposition durant la vie fœtale ou néonatale à des composés présents dans l'environnement capables d'interférer avec le système hormonal (perturbateurs endocriniens), serait responsable de l'augmentation de l'incidence de ces pathologies. Les molécules qui sont suspectées d'avoir des effets néfastes à long terme sur le tractus génital mâle possèdent des activités de type estrogénique ou antiandrogénique. Parmi les mécanismes impliqués dans l'effet à long terme, un certain nombre d'auteurs mettent en avant l'intervention de mécanismes de type épigénétiques. Dans ce contexte, nous avons utilisé deux types de modèles expérimentaux reposant sur l'exposition développementale de rats à ces composés : un modèle d'exposition néonatale à un estrogène (estradiol benzoate) et un modèle d'exposition fœtale à un antiandrogène (flutamide). Les deux modèles expérimentaux induisent chez le rongeur un phénotype d'hypospermatogenèse. Dans le cas de l'exposition néonatale à l'estradiol benzoate nous montrons que l'hypospermatogenèse observée chez les animaux à l'âge adulte est due à l'activation chronique de l'apoptose des cellules germinales testiculaires. Cette apoptose mettrait en jeu, par un mécanisme post-transcriptionnel, la diminution à long terme de l'expression de protéines clés de la machinerie épigénétique de méthylation de l'ADN, les ADN méthyltransférases (DNMT 3A, 3B et 1), et du facteur antiapoptotique, MCL-1. D'un point de vue fonctionnel, la chute d'expression des DNMTs se traduit notamment par l'augmentation d'expression des éléments transposables *LINE-1* et du gène *Ibtk* normalement contrôlés par méthylation de l'ADN. En amont, la chute d'expression des DNMTs et de MCL-1 serait dépendante de l'augmentation d'expression d'autres effecteurs épigénétiques, les microRNAs de la famille miR-29. Dans le cas, de l'exposition in utero au flutamide, notre travail indique que l'apoptose chronique des cellules germinales serait liée à la diminution à long terme de l'expression des inhibiteurs d'apoptose cIAP1 et cIAP2, et une augmentation d'expression de leur inhibiteur SMAC/DIABLO. En revanche, l'absence de mort des cellules somatiques testiculaires (Sertoli et Leydig) dans ce modèle serait due à l'augmentation d'expression spécifiquement dans ces cellules des inhibiteurs d'apoptose

XIAP et SURVIVIN. Par ailleurs, le phénotype d'apoptose observé à l'âge adulte impliquerait également une altération précoce de l'expression des DNMTs.

En conclusion, nous apportons une réponse mécanistique au phénotype de programmation fœtale/néonatale d'apoptose des cellules germinales testiculaires adultes. En effet, l'augmentation des miR-29s provoquerait : (1) une chute d'expression des DNMTs altérant ainsi le profil de méthylation des gènes, et (2) une chute d'expression de facteurs protégeant les cellules germinales contre l'apoptose comme le facteur MCL-1.

Avant-propos

Un certain nombre d'études épidémiologiques ont indiqué que le risque de développer certaines pathologies (pathologie métaboliques, cancers, autres) pourrait provenir d'altérations survenant durant les périodes (fœtale, néonatale) de développement de l'organisme. A partir de ces observations, il a été proposé un concept général dans lequel, certains évènements qui ont lieu pendant les périodes de plasticité (fœtale, néonatale) sont mémorisés par l'organisme en développement et peuvent se révéler à l'âge adulte, lorsque les fonctions des organes sont fixées, par le déclenchement d'une pathologie. On parle ainsi de concept de programmation développementale des pathologies adultes.

En ce qui concerne les atteintes de l'appareil reproducteur masculin, les études épidémiologiques ont montré lors de ces cinquante dernières années une détérioration de la qualité et de la production de sperme en association avec une augmentation des malformations de l'appareil reproducteur (hypospadias, cryptorchidies) et du taux de cancers testiculaires. Il a été suggéré que ces altérations seraient liées entre elles et constitueraient le syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT). Ce syndrome résulterait d'une exposition durant la vie fœtale/néonatale à des composés présents dans l'environnement qui affectent le système hormonal : les perturbateurs endocriniens (PEs). Ainsi, les PEs induiraient des altérations développementales conduisant à la programmation à long terme des pathologies du tractus génital mâle. Les liens directs entre l'exposition aux PEs et le SDT sont difficiles à appréhender chez l'homme. En revanche, les modèles expérimentaux développés chez le rongeur établissent un lien clair entre une exposition développementale à des composés modélisant l'action des PEs ou aux PEs à activité antiandrogénique ou estrogénique (ex. pesticides, produits industriels) et les altérations similaires au SDT (hypospermatogenèse, malformations du tractus génital). Mais à ce jour, les mécanismes moléculaires expliquant ces altérations ou leur induction à long terme ne sont pas encore bien connus, bien que par des approches globales certaines études aient impliqué des mécanismes épigénétiques dans l'effet à long terme des PEs. Lorsque j'ai débuté mon travail de thèse les questions restant ouvertes étaient : (i) est-ce que l'expression des effecteurs épigénétiques ADN méthyltransférases est modifiée après exposition développementale aux PEs ?, (ii) si l'expression des DNMTs est altérée, est-ce que cette perturbation à un impact

fonctionnel ?, et (iii) quels pourraient être les mécanismes en amont qui contribuent à altérer l'expression des DNMTs ?

Dans ce contexte, sera présenté dans ce mémoire mon travail de thèse qui a permis de mettre en évidence l'implication des effecteurs épigénétiques et apoptotiques dans l'hypospermatogenèse induite à long terme après exposition développementale à des composés reproduisant l'action des perturbateurs endocriniens environnementaux (estrogénique et antiandrogénique). La première partie de ce travail, a donc consisté à mettre en place un modèle d'exposition néonatale de rats à un estrogène (estradiol benzoate). La partie suivante, a été consacrée à décrire le processus apoptotique des cellules germinales testiculaires, mais également d'en comprendre les mécanismes via l'implication des ADN méthyltransférases dans ces altérations. Enfin, ce travail a été complété par la description des mécanismes apoptotiques et de l'intervention des ADN méthyltransférases dans un modèle d'exposition in utero à un antiandrogène (flutamide) déjà développé au sein du laboratoire.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai également été amené à travailler sur d'autres projets (voir liste des résultats et articles en annexe).

Etude bibliographique

I - Les fonctions testiculaires

1 Généralités

L'appareil reproducteur mâle est constitué (figure 1) :

- de deux **testicules** (ou **gonades mâles**) qui assurent deux fonctions essentielles : la production des gamètes mâles et des hormones sexuelles mâles.
- des voies excrétrices (**canaux efférents**, **épididyme**, **canaux déférents**) constituées des voies spermatiques intra et extra testiculaires permettant l'acheminement des spermatozoïdes.
- des glandes annexes (**vésicules séminales**, **prostate** et **glandes de Cowper**) contribuant à la sécrétion du liquide de transport et de nutrition des spermatozoïdes, permettant de constituer avec ces derniers le sperme.
- du tractus uro-génital formé par l'**urètre** (prostatique, périnéal et pénien) qui s'ouvre à l'extérieur par le méat urinaire.

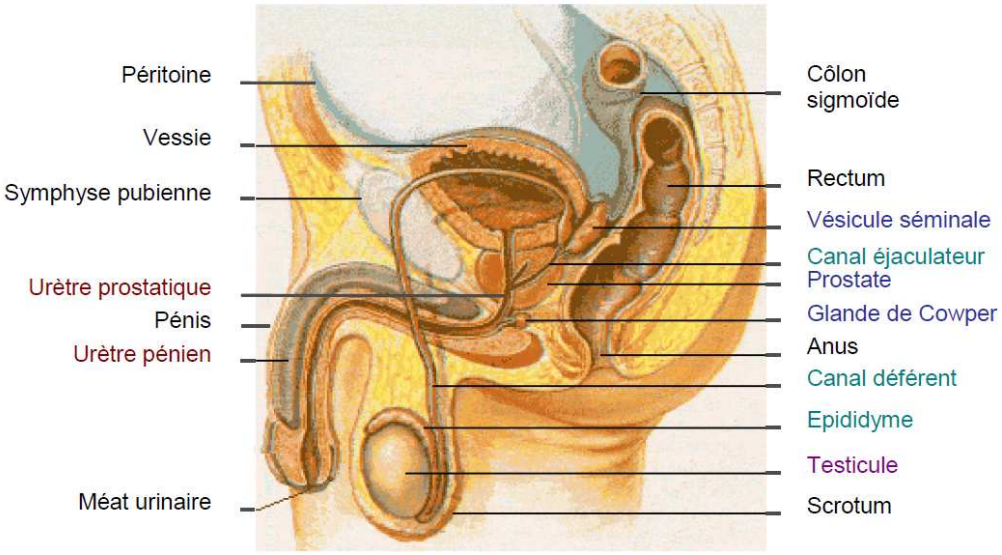


Figure 1. Structure de l'appareil reproducteur masculin chez l'homme. (d'après http://kcampbell.bio.umb.edu/Oct01gifs/Malerepr.gif)

Les testicules, les épididymes, les vésicules séminales et la prostate sont des organes dits hormono-dépendants, ce qui signifie que leur développement et leur fonctions sont contrôlés de manière étroite par les hormones, principalement les androgènes et les estrogènes.

2 Le testicule

Le testicule est un organe qui possède une double fonction: il assure la gamétogenèse mâle ce qui constitue sa fonction exocrine, et une fonction endocrine de production et sécrétion des hormones sexuelles chez l'homme (Dadoune and Demoulin, 2001).

Le testicule est présent sous forme d'organes ovoïdes pairs logés dans une poche revêtue d'une peau appelée scrotum (figure 1 et 2). Chaque testicule est suspendu dans le sac scrotal par le cordon spermatique constitué du canal déférent, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des fibres nerveuses. Le testicule est protégé par une épaisse capsule conjonctive qui l'entoure appelée albuginée (figure 2). Au niveau de la partie supérieure du testicule, l'albuginée s'épaissit pour s'enfoncer ensuite dans le testicule afin de former une structure fibreuse appelée corps de Highmore. A partir du corps de Highmore, des cloisons conjonctives (septa testis) partent en rayon permettant de délimiter entre 200 à 300 lobules testiculaires. Au sein de chaque lobule testiculaire on peut trouver de 2 à 4 tubes séminifères (Holstein et al. 2003).

Ainsi, sur une coupe transversale de testicule on observe un ensemble de tubes séminifères séparés les uns des autres par un espace interstitiel. Ces deux compartiments assurent des fonctions distinctes : le compartiment tubulaire constitué par les tubes séminifères permet la formation des spermatozoïdes tandis que l'espace interstitiel permet la production d'hormones dont la principale est la testostérone.

Une fois produits les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière du tube séminifère et sortent du testicule par un réseau de canalicules (rete testis) où convergent les tubes séminifères (figure 2). Les spermatozoïdes poursuivent ensuite leur maturation après avoir emprunté alors les canaux efférents pour rejoindre l'épididyme. C'est au niveau de l'épididyme grâce à l'activité sécrétoire des cellules qui le constituent que les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité et deviennent fécondant (Soler et al. 1994).

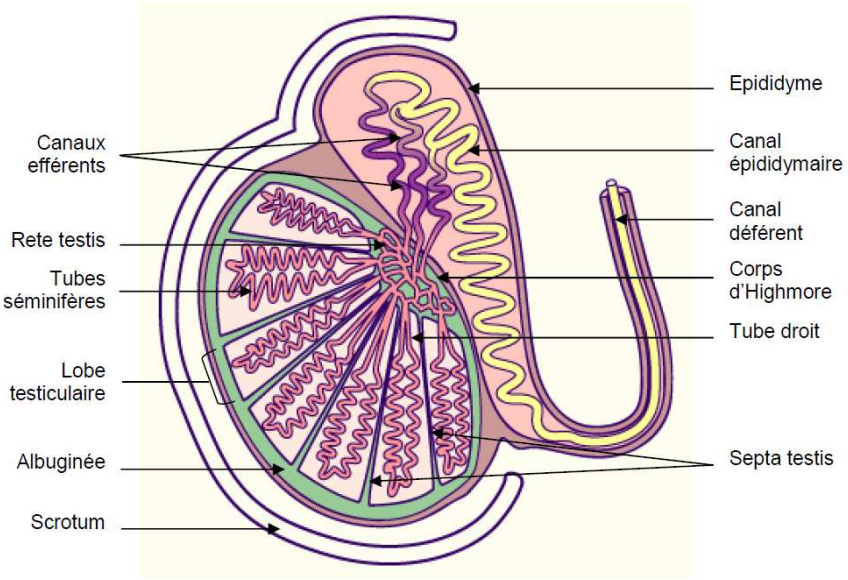


Figure 2. Représentation schématique de la structure interne du testicule. (d'après http://www.embryology.ch/images/uimggenital/u3diffmorpho/u3o_stroma.gif)

Afin de décrire les deux types de fonctions testiculaires (exocrine et endocrine), nous allons dans un premier temps décrypter la fonction exocrine à travers la structure de tube séminifère au sein duquel se déroule le processus de spermatogenèse. Au sein du tube séminifère nous décrirons également le rôle majeur des cellules de Sertoli qui jouent un rôle de soutien des cellules germinales au cours de la spermatogenèse et le rôle des cellules de Leydig dans la fonction endocrine du testicule. Nous reviendrons sur quelques données développementales concernant les origines des types cellulaires majoritaires du testicule pendant la vie fœtale. Finalement, nous traiterons du contrôle endocrine et paracrine des fonctions testiculaires.

3 Le compartiment tubulaire et la fonction exocrine du testicule

3.1 La spermatogenèse au sein des tubes séminifères

3.1.1 Structure des tubes séminifères

L'épithélium séminifère est un épithélium stratifié formé par l'association deux types de cellules majoritaires : les cellules germinales, à différents stades de développement qui participent au processus de spermatogenèse et les cellules de Sertoli, des cellules somatiques jouant le rôle de cellules de soutien aux cellules germinales (figure 3) (Holstein et al. 2003).

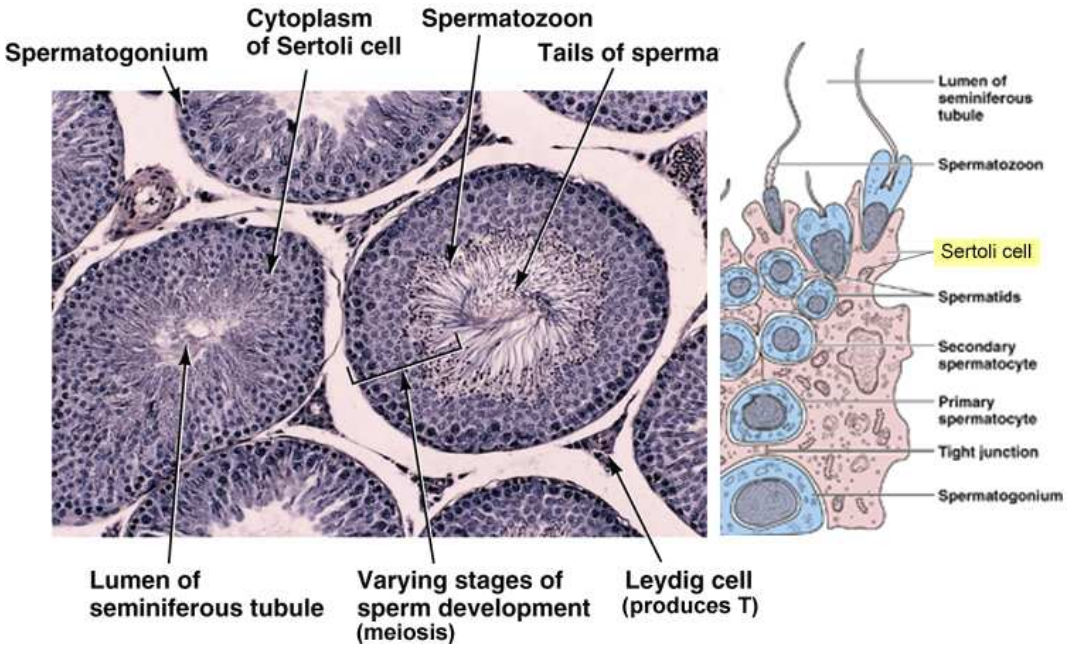


Figure 3. Structure des tubes séminifères.
(d'après http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/image/figure20f.jpg).

Au niveau de l'épithélium séminifère, les cellules germinales sont hautement organisées et suivent une maturation dite "centripète". En outre, les cellules germinales les moins différenciées sont situées près de la lame basale en périphérie du tube séminifère, tandis qu'au cours de leur maturation les cellules différenciées se dirigent vers la lumière du tube séminifère (figure 3) (Holstein et al. 2003).

Le compartiment tubulaire est limité par une gaine (membrana propria) constituée d'une lame basale, de tissu conjonctif et de fibroblastes. Une partie de ces fibroblastes contient des filaments contractiles ce qui constitue les cellules péritubulaires myoïdes (Maekawa et al. 1996). Ces cellules par leur activité contractile permettent l'expulsion des spermatozoïdes qui ne sont pas encore mobiles dans le testicule.

3.1.2 La spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus par lequel les cellules germinales se différencient afin de donner les spermatozoïdes. Ainsi, des cellules germinales diploïdes (2n chromosomes), les spermatogonies souches, permettent de donner des gamètes masculins haploïdes (n chromosomes), les spermatozoïdes. Ce processus de maturation des cellules germinales a lieu dans le tube séminifère.

D'un point de vue fonctionnel la spermatogenèse peut être scindée en trois phases impliquant des types de cellules germinales différents (figure 4) :

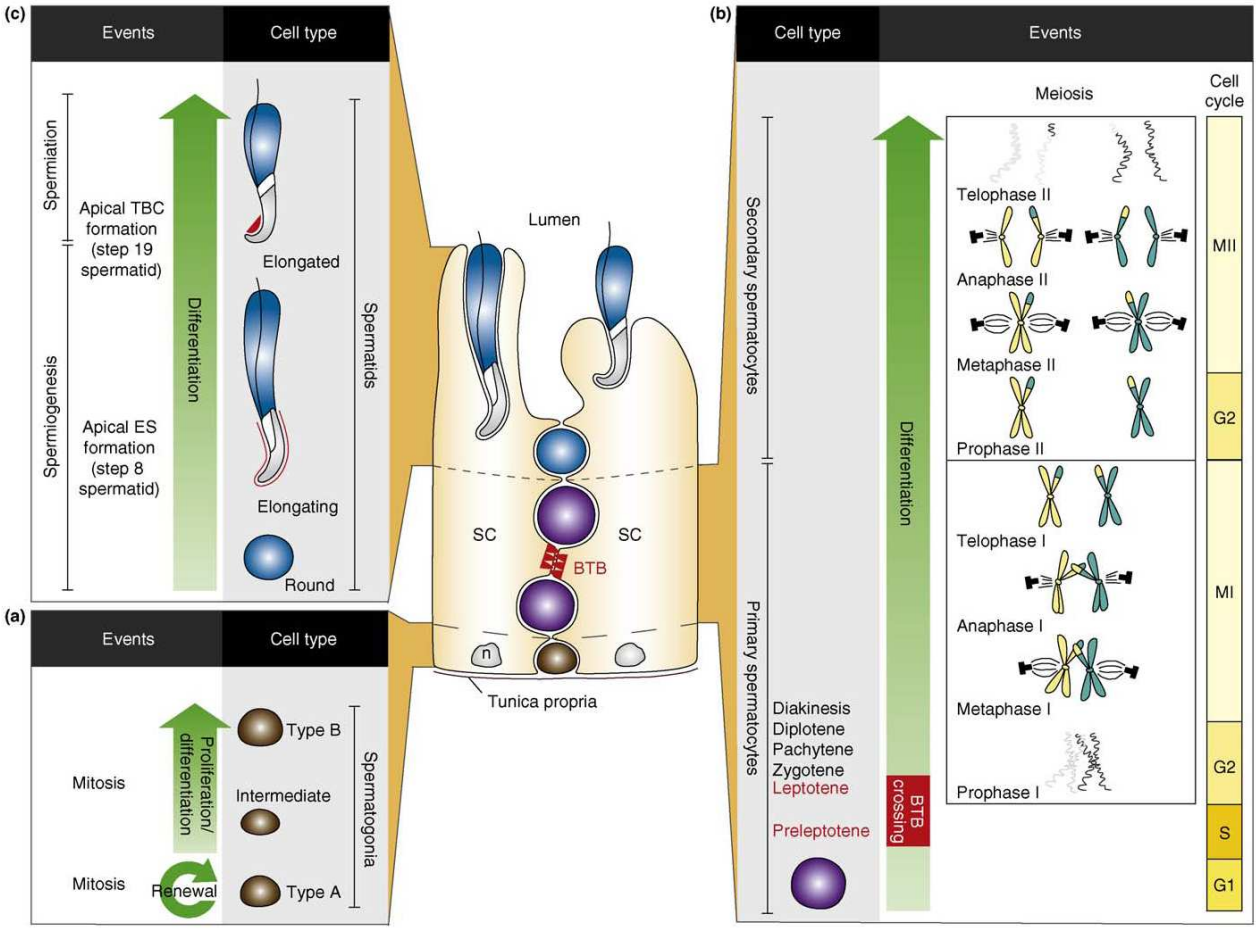


Figure 4. Les évènements cellulaires au cours des différentes phases de la spermatogenèse.

(d'après Lie et al. 2009). (*a) La phase proliférative : elle implique les spermatogonies de type A et B au niveau du compartiment basal de l'épithélium séminifère, leur division mitotique permet de renouveler le stock de spermatogonies de type A mais également par divison des spermatogonies de type B de donner les spermatocytes primaires préleptotènes qui vont subir la méiose, (b) La phase méiotique : après avoir franchi les jonction serrées de la barrière hémato-testiculaire les spermatocytes primaires (type I) subissent la méiose I (MI) pour donner des spermatocytes secondaires (type II) qui subissent la méiose II (MII) aboutissant à la formation de spermatides rondes, (c) La phase de spermiogenèse : par un processus de maturation elle permet de passer des spermatides rondes aux spermatides allongées qui libérées dans la lumière du tube séminifère par le processus de spermiation donnent le spermatozoïde (BTB : Barrière hémato-testiculaire, SC : cellule de Sertoli).*

- La phase proliférative :

C'est la première phase de la spermatogenèse reposant sur la mitose des cellules germinales souches : les spermatogonies. La division mitotique des spermatogonies de type

A qui a lieu de manière continue permet le maintien et le renouvellement de l'épithélium séminifère (Holstein et al. 2003).

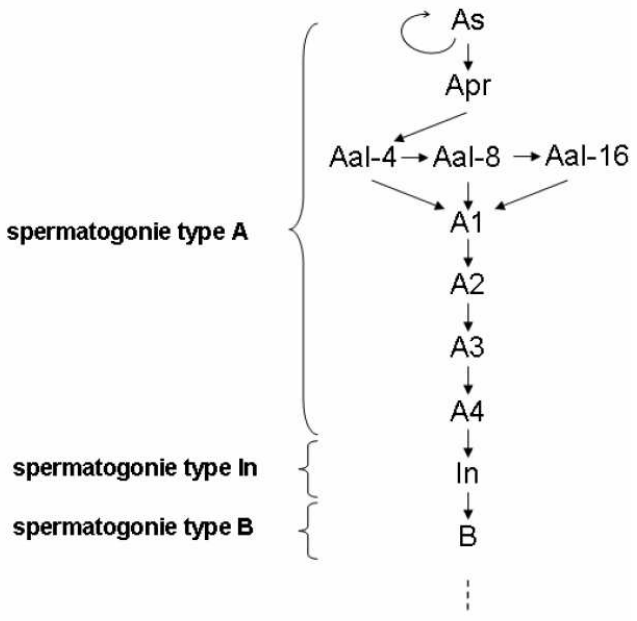


***Figure** 5. Le renouvellement et les cycles de division des spermatogonies*
***(d'après de De Rooij 2001)** As : spermatogonies de type A isolée (single), Apr : spermatogonies de type A appariée (paired), Aal : spermatogonies de type A alignées (aligned) de 2 à 16 divisions (Aal-2-16), In : spermatogonie intermédiaire, B : spermatogonie de type B.*

Au départ, une spermatogonie indifférenciée et isolée de type As (single) appartenant au stock de cellules germinales souches au se divise de manière asymétrique en 2 cellules filles : une spermatogonie de type As qui permet le maintien du pool de spermatogonies souches et une spermatogonie de type appariée Apr (paired) (de Rooij 2001). Ces dernières subissent plusieurs cycles de divisions mitotiques successifs en passant par différents stades de spermatogonies A (Apr→Aal→A1→A2→A3→A4) dont les stades de spermatogonies alignées (Aal) ce qui permet d'aboutir aux spermatogonies In intermédiaires qui se divisent en spermatogonies de type B (figure 5). Une mitose finale des spermatogonies de type B permet de donner naissance aux spermatocytes primaires (spermatocytes I) dits préleptotènes.

- La phase méiotique :

Durant cette seconde phase, le processus de méiose permet de passer de spermatocytes primaires (spermatocytes I) diploïdes (2n chromosomes, 2 chromatides), à

des spermatocytes secondaires (spermatocytes II) haploïdes (n chromosomes, 2 chromatides) qui se différencient ensuite en spermatides haploïdes (n chromosomes, 1 chromatide).

La méiose est ainsi constituée d'une succession de deux divisions cellulaires consécutives. La première division méiotique (méiose I) ou division réductionnelle comporte une prophase I longue (se subdivisant en 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse), la métaphase I, l'anaphase I et la télophase I. Au cours de la prophase I a lieu le brassage génétique (par crossing-over) qui assure la diversité génétique des gamètes. De cette manière, les spermatocytes I (2n chromosomes, 2 chromatides) donnent des spermatocytes II (n chromosomes, 2 chromatides). Ces spermatocytes II subissent la seconde division méiotique (méiose II) ou division équationnelle où les chromatides sœurs se répartissent entre les deux cellules filles : les spermatides rondes (n chromosomes, 1 chromatide).

- La spermiogenèse :

Au cours de cette phase les spermatides rondes immatures se différencient en spermatozoïdes (figure 6). Lors de leur différenciation en spermatozoïde les spermatides vont subir plusieurs modifications et changements morphologiques. Tout d'abord leur noyau se condense et se place en position sous-membranaire. On assiste également au remplacement des histones par des protéines nucléaires plus basiques puis des protamines. L'acrosome se forme par le rassemblement des vésicules de l'appareil de Golgi, il contiendra notamment les enzymes protéolytiques nécessaires lors de la fécondation. Au niveau de la partie proximale, les mitochondries s'assemblent en spirale au niveau de la pièce intermédiaire. Le flagelle se développe à partir du centriole distal. Des microtubules se développement en arrière de l'acrosome et les corps résiduels (fragments de cytoplasme non utilisés) seront éliminés par la cellule puis phagocytés par les cellules sertoliennes. Au cours de la spermiogenèse, la tête des spermatides fait face au compartiment basal des tubes séminifères et la dernière étape consiste en la translocation des spermatozoïdes de la partie adluminale du tube séminifère vers la lumière du tube. Cette phase de libération des spermatozoïdes matures qui se détachent de la cellule de Sertoli dans la lumière du tube séminifère est appelée spermiation.

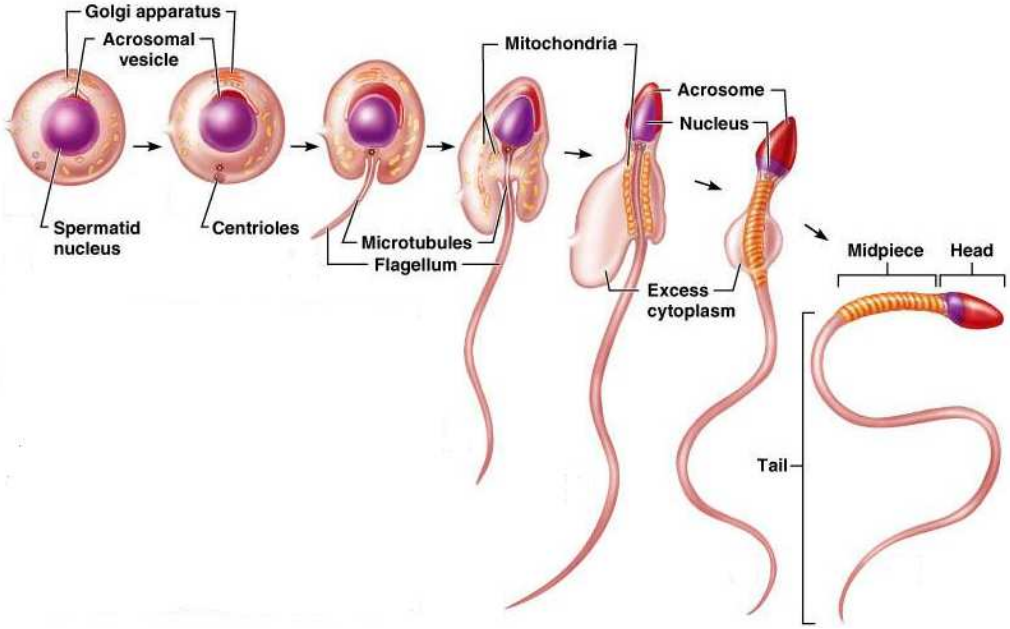


Figure 6. Les différentes phases de la spermiogenèse
(d'après http://www.ccs.k12.in.us/chsBS/kons/kons/images/spermiogenesis.jpg)

3.1.3 Les stades spermatogéniques et cinétique de la spermatogenèse

Un cycle de l'épithélium séminifère est divisé en stades spermatogéniques définis par les associations spécifiques entre cellules de Sertoli et cellules germinales à différentes phases de maturation, c'est grâce à l'état de différenciation des cellules germinales qu'il est possible de distinguer ces stades (figures 7 et 8).

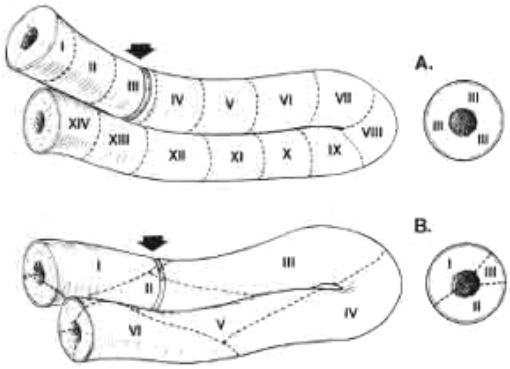


Figure 7. Différences entre le rat et l'homme au niveau des stades le long de l'épithélium séminifère
(d'après http://www.infertile.com/images/publicat/maleage/figure4.jpg) (A) *Succession à intervalles réguliers des stades de l'épithélium séminifère chez le rat et mise en évidence d'un seul stade lors d'une coupe transversale,* ***(B)*** *Succession irrégulière des stades de l'épithélium séminifère chez l'homme et mise en évidence de plusieurs stades sur une coupe transversale.*

Chez l'animal, au sein d'un même tube séminifère l'ensemble des stades spermatogéniques se déroulent de manière séquentielle le long de l'axe longitudinal du tube

séminifère. De ce fait, un même stade occupe toute la section transversale d'un tube séminifère. A l'inverse, chez l'homme le patron des stades spermatogéniques n'est pas organisé en vagues ordonnées ce qui fait qu'au niveau d'une section transversale de tubule séminifère humain on retrouve très souvent une mosaïque de stades associés (figure 7).

Chez les mammifères le nombre de stades peut varier d'une espèce à l'autre : 12 (I à XII) chez la souris, 14 (I à XIV) chez le rat (figure 8) et 6 (I à VI) chez l'homme (Clermont 1972). La production de spermatozoïdes se fait de façon permanente et en continu car le processus de spermatogenèse ne se fait pas de façon simultanée en tous les points du tube séminifère. La durée du cycle de l'épithélium séminifère est définie par le temps qui sépare deux salves d'entrée des spermatogonies dans la spermatogenèse au même endroit du tube.

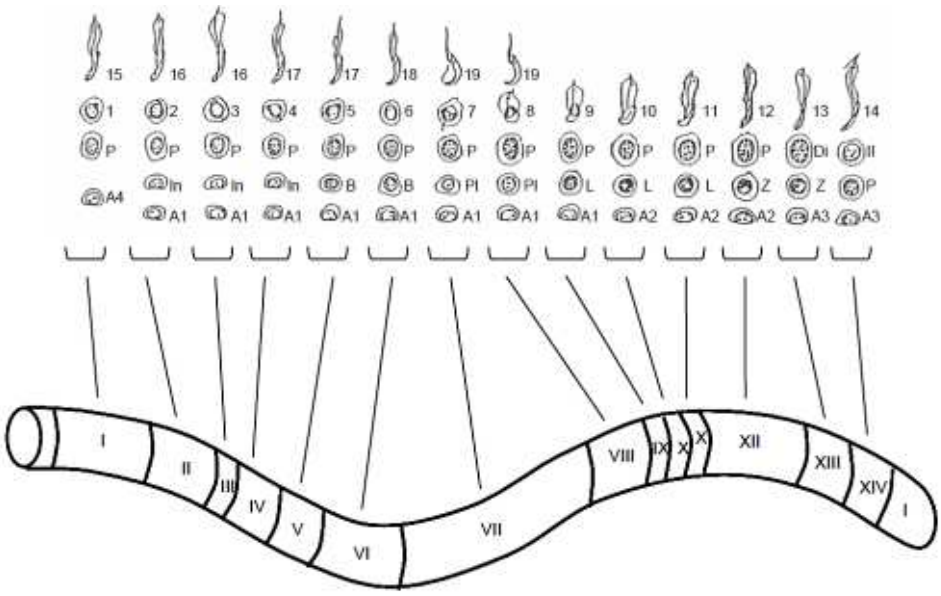


Figure 8. Représentation schématique des stades spermatogéniques chez le rat

Chacun des 14 stades est représenté par une association précise et unique de cellules germinales à différents niveaux de maturation.

En ce qui concerne la durée du cycle spermatogénique, elle correspond au temps nécessaire pour qu'une spermatogonie ayant entamé sa méiose parvienne au stade de spermatozoïde mature. Si le nombre de cycles de l'épithélium séminifère est assez similaire entre les différentes espèces, la durée d'un cycle spermatogénique est néanmoins variable en fonction de l'espèce (tableau 1). Ainsi, un cycle de spermatogenèse dure 74 jours chez l'homme, 35 jours chez la souris et 53 jours chez le rat (tableau 1).

			Souris	Rat	Homme
	Puberté		25 jours	30 jours	12 à 16 ans
Spermatogenèse	Cycle épithélium séminifère	Nombre stades	12	14	6
		Durée	9 jours	13 jours	16 jours
	Cycles spermatogéniques	Nombre cycles épithélium séminifère	4	4	4,5
		Durée	35 jours	53 jours	74 jours

Tableau 1. Estimation des durées de la durée du cycle de l'épithélium séminifère et de la spermatogenèse chez la souris, le rat et l'homme
(d'après Clermont 1972)

3.2 Les cellules de Sertoli : cellules de soutien pour la spermatogenèse

3.2.1 Généralités et structure de la cellule de Sertoli

Les cellules de Sertoli ont été mises en évidence pour la première fois en 1865 par Enrico Sertoli. Elles ont été caractérisées comme des cellules somatiques ayant un rôle crucial de cellules nourricières en lien étroit avec les cellules germinales (Figure 9) (Holstein et al. 2003, Hess & França 2005). Les cellules de Sertoli ont une forme irrégulière et cylindrique s'étendant depuis le compartiment basal, avec lequel elles sont directement en lien, en direction du compartiment adluminal. Ces cellules occupent ainsi 17 à 19% du volume de l'épithélium séminifère chez le rat adulte (Mruk & Cheng 2004). Grâce à leur énorme surface cellulaire, elles peuvent soutenir le développement d'un grand nombre de cellules germinales. De cette manière, le ratio est d'une cellule de Sertoli pour 50 cellules germinales au sein du testicule de rat adulte. D'autre part, leur structure étendue joue non seulement un rôle dans la maturation mais également permet le mouvement des cellules germinales au niveau de l'épithélium séminifère.

Au fur et à mesure de l'avancement dans le cycle de l'épithélium séminifère, la cellule de Sertoli va adapter sa forme et sa structure afin d'optimiser le contact avec les cellules germinales et permettre leur mouvement.

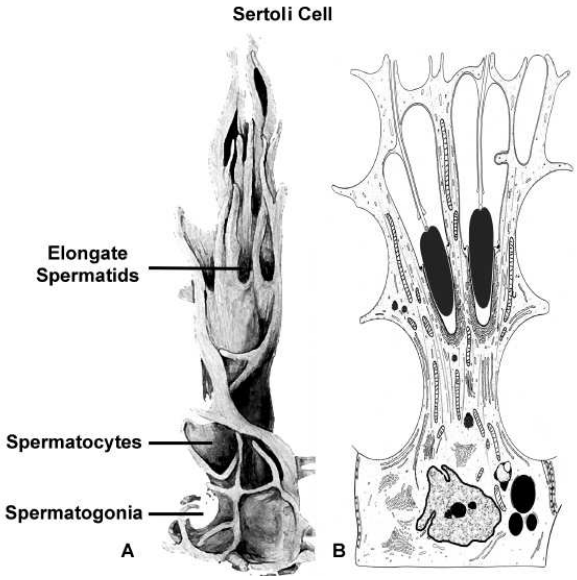


Figure 9. Structure de la cellule de Sertoli en étroite interaction avec les cellules germinales (d'après Hess & França, 2005) (A) *Représentation schématique de la surface cellulaire d'une cellule de Sertoli de rat (stade V de l'épithélium séminifère),* ***(B)*** *Illustration montrant l'inclusion profonde du noyau des spermatides allongées dans des structures cryptiques formées par le cytoplasme et la membrane de la cellule de Sertoli.*

On décrit ainsi des cellules de Sertoli de type A présentant des cryptes cytoplasmiques dans lesquelles se trouvent les spermatides matures prêtes à être relarguées dans la lumière du tube séminifère, et des cellules de Sertoli de type B chez lesquelles les cryptes sont peu visibles voire absentes (Mruk & Cheng 2004).

Au sein d'un épithélium séminifère la cellule de Sertoli peut également se distinguer par son noyau ovale ou en forme de poire, bosselé, au nucléoplasme riche en euchromatine et un gros nucléole, caractéristiques des cellules ayant une activité métabolique élevée (Johnson et al. 2008).

3.2.2 Fonctions de la cellule de Sertoli

Les fonctions majeures des cellules Sertoli au niveau de l'épithélium séminifère sont toutes en lien avec leur rôle de cellule de soutien des cellules germinales :

(1) Rôle de structure : les cellules de Sertoli jouent un rôle de support des cellules germinales en développement en jouant un rôle d'échafaudage notamment en participant à la constitution de la matrice extracellulaire mais également en entrainant la formation de jonctions cellulaires spécialisées (Mruk & Cheng 2004).

(2) Rôle dans la barrière hémato-testiculaire : les cellules de Sertoli sont reliées entre elles par différents jonctions cellulaires spécialisées (jonctions communicantes, adhérentes et serrées). Au niveau du tiers basal de l'épithélium séminifère les jonctions serrées sertoliennes participent à la barrière hémato-testiculaire. Ces jonctions génèrent ainsi deux compartiments distincts : un compartiment basal au sein duquel on retrouve les spermatogonies et les spermatocytes primaires préleptotènes, et un compartiment adluminal dans lequel on retrouve les cellules méiotiques et post-méiotiques à tous les stades de maturation.

Ces jonctions serrées : (i) créent un environnement spécialisé pour les cellules germinales, par exemple, les cellules de Sertoli sécrètent un ensemble de molécules nécessaires à la croissance et la différentiation des cellules germinales (facteurs de croissances, lactate, stéroïdes) (Petersen & Soder 2006); (ii) régulent et filtrent sélectivement le passage de substances en direction des cellules germinales; (iii) servent de barrière immunologique (Mruk & Cheng 2004, Johnson et al. 2008). Il existe un phénomène transitoire de remaniement de la barrière hémato-testiculaire au stade VII du cycle de l'épithélium séminifère pour permettre le passage des spermatocytes préleptotènes, mais les mécanismes précis restent à ce jour peu connus.

(3) Rôle dans le mouvement des cellules germinales : les cellules de Sertoli interviennent grâce à leur cytosquelette (microtubules) dans la progression des cellules germinales au sein de l'épithélium séminifère au fur et à mesure de leur maturation (Mruk & Cheng 2004).

(4) Rôle dans la phase de spermiation et phagocytose des corps résiduels : les cellules de Sertoli sont indispensables pour le relarguage des spermatides matures à partir de l'épithélium séminifère. Par des modifications au niveau de leur cytoplasme elles vont permettre la libération des têtes de spermatides ainsi que la phagocytose des corps résiduels (Mruk & Cheng 2004).

(5) Rôles sécrétoires : les cellules de Sertoli ont une activité de sécrétion importante notamment pour le soutien et la maturation des cellules germinales. Parmi les protéines qui sont sécrétées on retrouve des protéases (ex. cathepsines D, L et S), des anti-protéases (ex.

cystatin C), des hormones, des substrats énergétiques, des facteurs de croissance (ex. TGF-α, FGF), des facteurs autocrines et paracrines (ex. SCF, inhibin B, IL-1) et des composants de la matrice extracellulaire (ex. collagène, laminine) (Mruk & Cheng 2004, Petersen & Soder 2006). L'une des premières protéines à avoir été identifiée est l'Androgen Binding Protein permettant le transport de la testostérone depuis la partie basale vers les cellules germinales chez les rongeurs (Hagenäs et al. 1975).

(6) Rôle dans l'apport de nutriments : les cellules de Sertoli synthétisent un certain nombre de composés nécessaires aux spermatocytes et spermatides isolés par les jonctions serrées. Ainsi les cellules de Sertoli leurs apportent des acides aminés, des glucides, des lipides, des vitamines et des ions métalliques (Mruk & Cheng 2004). Le substrat énergétique préférentiel des cellules germinales étant le lactate, la cellule de Sertoli captent le glucose sanguin à partir de leur partie basale qui après avoir été métabolisé en pyruvate par la glycolyse sera convertit en lactate grâce à la lactate déshydrogénase (LDH) (Boussouar & Benahmed 2004).

3.2.3 Etablissement du ratio cellules de Sertoli-cellules germinales

De part leur rôle de cellules de soutien des cellules germinales, les cellules de Sertoli ne peuvent assurer leur rôle qu'auprès d'un nombre limité de cellules germinales. Comme nous l'avons indiqué plus haut le nombre de cellules germinales est de 50 pour une cellule de Sertoli. Ainsi, lors de la première vague de spermatogenèse se produit un phénomène physiologique d'apoptose massive permettant d'adapter le nombre de cellules germinales au nombre de cellules de Sertoli (Rodriguez et al. 1997).

4 *Le compartiment interstitiel et sa fonction endocrine*

4.1 Structure de l'espace interstitiel

L'espace interstitiel est le tissu qui sépare les tubes séminifères les uns des autres. C'est un tissu conjonctif lâche possédant de nombreux vaisseaux sanguins, lymphatiques et des terminaisons nerveuses. La présence de ces éléments au sein de l'espace interstitiel

permet d'alimenter le compartiment tubulaire en nutriments et facteurs de croissance nécessaires à la spermatogenèse.

L'espace interstitiel contient différents types cellulaires spécialisés qui se retrouvent dispersées entre les tubes séminifères. Tout d'abord, les cellules de Leydig, ce sont des cellules endocrines majoritaires dans le tissu interstitiel permettant notamment la synthèse et la sécrétion de testostérone (Haider 2004). Puis, les macrophages qui jouent un rôle primordial dans la régulation des fonctions endocrines des cellules de Leydig par la sécrétion de cytokines (ex. IL-1, TNF-α), mais également dans le contrôle de la prolifération et le développement des cellules de Leydig par des cytokines et facteurs de croissance (Hales 2002). De même, les macrophages peuvent phagocyter les cellules de Leydig qui dégénèrent. Enfin, le tissu interstitiel contient également des fibroblastes.

4.2 Les cellules de Leydig : cellules endocrines du testicule

4.2.1 Généralités et structure des cellules de Leydig

La cellule de Leydig a été décrite pour la première fois en 1850 par Franz Leydig. C'est seulement en 1903 que Bouin et Ancel apportent les premiers éléments montrant que la cellule de Leydig est une cellule glandulaire endocrine contrôlant le développement des caractères sexuels secondaires mâles (Christensen 2007). On retrouve au sein du testicule deux types de cellules de Leydig au cours du développement. Ces deux types de cellules de Leydig sont soit présentes durant la vie embryonnaire et postnatale pré-pubertaire (cellules de Leydig fœtale, FLCs) soit présentes durant la vie adulte (cellules de Leydig adultes, ALCs).

Ainsi, les cellules de Leydig fœtales synthétisent pendant la vie fœtale la testostérone essentielle à la formation de la gonade mâle, la formation des progéniteurs ALCs, la différenciation et morphogenèse du tractus génital mâle, la masculinisation et la différenciation sexuelle au niveau du système nerveux central (Haider et al. 2007). Les cellules de Leydig adultes apparaissant à la puberté et sont responsables de la sécrétion des androgènes tout au long de la vie adulte permettant le maintien de la spermatogenèse et des caractères sexuels secondaires mâles (Griswold & Behringer 2009).

D'une manière générale, les cellules de Leydig représentent moins de 5% des cellules testiculaires. Elles ont une forme polygonale et présentent les caractéristiques des cellules synthétisant les stéroïdes : présence de nombreuses inclusions lipidiques (cholestérol), un

réticulum endoplasmique lisse abondant et des mitochondries à crêtes tubulaires. Les FLCs sont disposées en clusters au sein de l'espace interstitiel. Elles sont larges, rondes ou ovales avec un noyau bien visible et leur cytoplasme contient de nombreuses gouttelettes lipidiques. Tous les regroupements de FLCs sont entourés par une fine couche de fibrocytes et les FLCs sont séparées par des fibres de collagène au sein d'un cluster. Les FLCs sont en contact les unes avec les autres mais également avec les cellules vasculaires endothéliales adjacentes. Au fur et à mesure du développement des cordons testiculaires, le nombre, la forme et la taille des clusters diminuent. Après la naissance les FLCs sont progressivement remplacées par les cellules de Leydig adultes (Adult Leydig Cells, ALCs). Contrairement aux FLCs les cellules de Leydig adultes ne sont pas obligatoirement arrangées en clusters. Elles sont ovales voire rondes, leur noyau est large et rond possédant une euchromatine condensée et un ou deux nucléoles. D'autre part, leur cytoplasme contient des gouttelettes lipidiques mais en proportion moindre en comparaison des FLCs. Les ALCs sont en contact entre elles par des systèmes de jonctions communicantes (jonctions gap) mais également avec les autres types cellulaires du compartiment interstitiel (cellules endothéliales vasculaires, macrophages, fibroblastes).

4.2.2 La stéroïdéogenèse

Chez le mâle, la cellule de Leydig présente dans le testicule est le seul type cellulaire possédant l'ensemble des enzymes nécessaires à la synthèse des hormones stéroïdes sexuelles. De ce fait, le testicule est capable de synthétiser et sécréter la principale hormone sexuelle mâle, la testostérone. Ce processus appelé "Stéroïdéogenèse" utilise le cholestérol comme précurseur commun à la synthèse de l'ensemble des stéroïdes. La transformation du cholestérol en testostérone se fait par des enzymes spécialisées présentes au niveau des membranes mitochondriales et microsomales (figure 10).

Les sources de cholestérol sont diverses dans l'organisme : (1) le cholestérol peut être fourni par les lipoprotéines circulantes (HDL, LDL) (Benahmed et al. 1981), (2) le cholestérol peut provenir du stock de cholestérol estérifié présent dans les gouttelettes lipidiques au sein du cytoplasme des cellules de Leydig , (3) le cholestérol peut être synthétisé par les cellules de Leydig à partir de l'acétate (Hou et al. 1990), (4) le cholestérol peut provenir des membranes plasmiques (Azhar & Reaven 2007). L'étape initiale et limitante de la stéroïdéogenèse est le transport du cholestérol depuis la membrane externe

jusqu'à la membrane interne de la mitochondrie. Ce passage est réalisé par la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) qui possède un rôle majeur dans le processus de stéroïdéogenèse. En outre, les individus porteurs de mutation au niveau du gène de StAR ou les animaux invalidés pour ce gène, présentent une pathologie d'hyperplasie lipoïde congénitale des surrénales (Stocco 2007).

Afin de produire la testostérone à partir du cholestérol, cinq étapes enzymatiques successives impliquant deux types de familles enzymatiques (les enzymes Cytochrome P450s et les Hydroxystéroïdes Déshydrogénases) sont nécessaires (figure 10). La première étape de biosynthèse des androgènes est une étape clé aboutissant à la conversion du cholestérol en prégnénolone par le cytochrome P450scc (Cyp11a1). Le cytochrome P450scc est situé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et permet le clivage de la chaîne latérale du cholestérol. La prégnénolone diffuse ensuite à travers la membrane mitochondriale pour être métabolisée par des enzymes présentes au sein du réticulum endoplasmique lisse. L'enzyme 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3β-HSD ou Hsd3b1) permet donc de convertir la prégnénolone en progestérone. La 3β-HSD est également responsable de la synthèse des autres hormones biologiquement actives par la conversion des Δ5-3β-hydroxystéroïdes en Δ4-3-kétostéroïdes. Puis l'action du cytochrome P450c17 (CYP17A1) permet de convertir successivement la progestérone en 17α-Hydroxyprogestérone (activité 17α-hydroxylase) puis en androstènedione (activité C17-20-lyase). Finalement l'androstènedione est transformée en testostérone par la 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase (17β-HSD ou Hsd17b3) (Payne 2007).

Il est a noté qu'il existe deux types de voies (voie Δ4 ou voie Δ5) permettant d'aboutir à la testostérone. En fonction de l'espèce et du statut hormonal, l'une ou l'autre de ces voies sera préférentiellement utilisée. Chez l'homme, c'est la voie Δ5 qui prédomine conduisant notamment à la synthèse d'un intermédiaire, la déhydroépiandrostérone (DHEA). Chez le rat, c'est la voie Δ4 qui constitue la voie préférentielle dans cette espèce. La différence entre les deux espèces se fait au niveau de l'activité lyase du cytochrome P450c17 qui chez le rat favorise les substrats de la voie Δ4 (progestérone), et chez l'homme les substrats de la voie Δ5 (prégnénolone) (Brock & Waterman 1999).

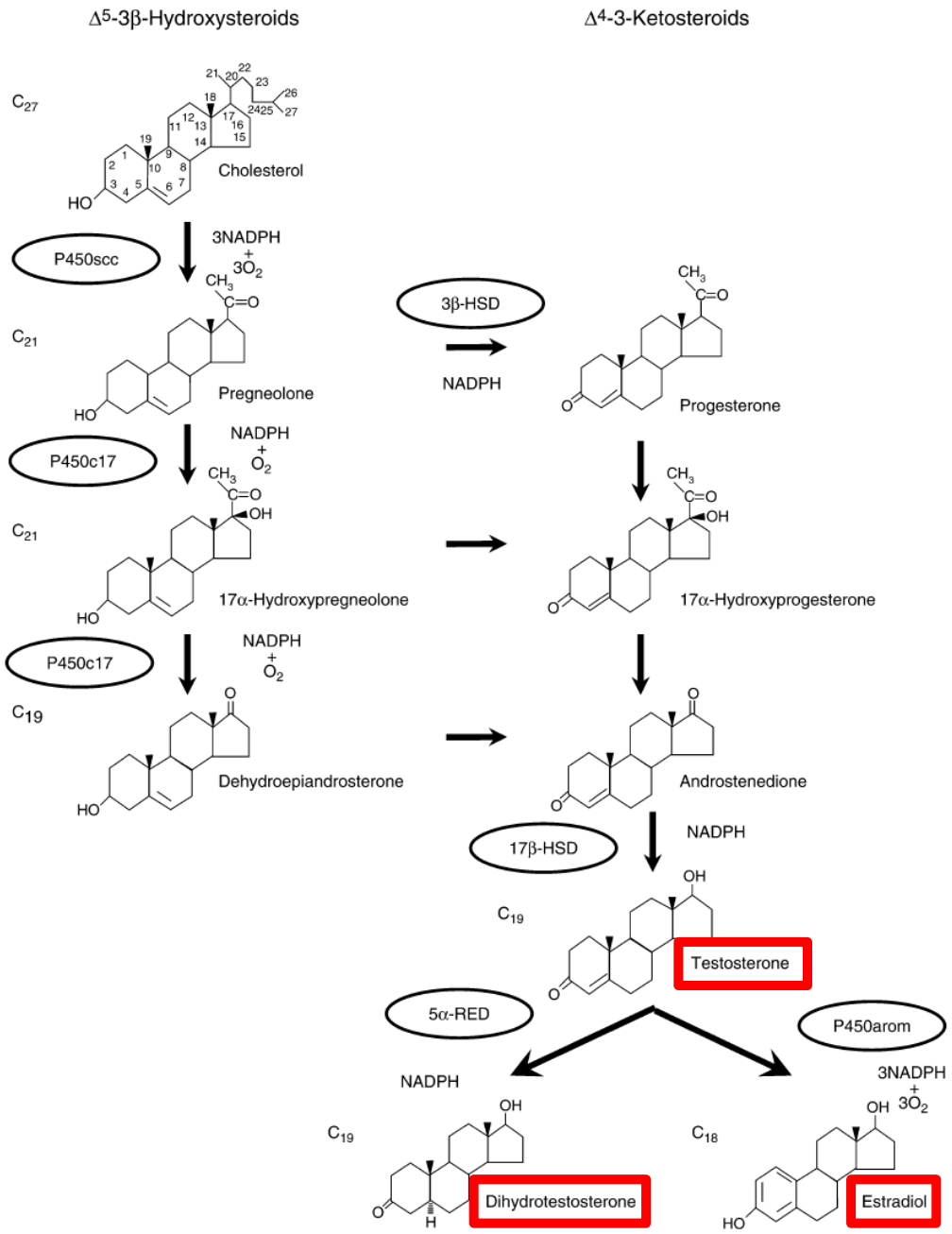


Figure 10. La voie de biosynthèse des stéroïdes au sein des cellules de Leydig (d'après Payne, 2007)

4.2.2 Métabolisme des androgènes

- Production d'estrogènes :

Sous l'action de l'enzyme Cytochrome P450 Aromatase (CYP19A1) codée par le gène *Cyp19*, la testostérone peut être transformée en estradiol (estrogène) (figure 10) (Sierens et al. 2005). Au sein du testicule de rongeurs la localisation d'expression de la P450 aromatase va varier en fonction de l'âge : chez des individus immatures la localisation sera préférentiellement sertolienne, tandis que chez des animaux adultes la P450 aromatase a

été mise en évidence dans les cellules de Leydig et les cellules germinales (spermatocytes pachytènes, spermatides rondes et spermatozoïdes) (Nitta et al. 1993, Carreau et al. 2007). Un profil d'expression sensiblement identique a été mis en évidence chez l'homme (Carreau et al. 2008). Même si la majeure partie des estrogènes est produite au niveau des tissus périphériques (graisses, foie, reins, tissu osseux et cerveau), le testicule est tout de même responsable de 15% de la production totale d'estrogènes (Simpson et al. 2000).

- Production de dihydrotestostérone (DHT) :

Pour agir sur ses cellules cibles dans la majorité des cas la testostérone a besoin d'être transformée en dihydrotestostérone (DHT) sous l'action irréversible des enzymes 5 α-réductases (isoformes de type 1 et 2) (figure I.10) (Jin & Penning 2001). En effet, l'affinité de la DHT pour le récepteur des androgènes est supérieure à celle de la testostérone (10^{-11} M pour la DHT > 10^{-10} M pour la testostérone). Les 5 α-réductases sont des enzymes de la membrane microsomale NADPH-dépendantes. La 5 α-réductase de type 1 possède une expression ubiquitaire avec une expression élevée dans les follicules pileux, le glandes sébacées de la peau et le foie. La 5 α-réductase de type 2 (SRD5A2) est quant à elle est exprimée majoritairement dans les tissus de l'appareil reproducteur (prostate, épididyme et vésicules séminales).

5 Le développement testiculaire

5.1 Origine, spécification et migration des cellules germinales primordiales

5.1.1 Origine et spécification des cellules germinales primordiales (CGPs)

Chez la souris, la lignée germinale apparaît en dehors sinus urogénital la spécification des cellules germinales primordiales (CGPs) commence durant la période fœtale aux alentours de 6,5 jours post-coïtum (jpc) au stade pre-gastrula lorsque des cellules de l'épiblaste près de l'ectoderme extraembryonnaire acquièrent la compétence de devenir des CGPs, sous l'induction de signaux paracrines sécrétés par l'ectoderme extraembryonnaire et l'endoderme viscéral (ex. TGFβ, BMP-2/-4/-8b, SMAD-1/-5)(Ewen & Koopman 2009). Cette induction induit une régulation transcriptionnelle au niveau des cellules épiblastiques impliquant le répresseur transcriptionnel BLIMP1 (B Lymphocyte-Induced Maturation

Protein 1) ce qui permet l'activation de gènes spécifiques des CGPs comme *Stella* et la répression des gènes de cellules somatiques comme les gènes *Hox* (Richardson & Lehmann 2010). Ainsi, seulement une partie de ces cellules sont compétentes pour devenir CGPs (environ 6 cellules). Ces cellules vont continuer de proliférer pour ensuite se différencier en CGPs qui sont clairement identifiées au stade gastrula (7,25 jpc chez la souris, 22-23 jpc chez l'homme) à la base de la paroi du sac vitellin (McLaren 2003).

5.1.2 Migration des CGPs

L'étape qui suit la spécification des CGPs est la migration des CGPs depuis le territoire extraembryonnaire en direction des crêtes génitales. Ainsi, les CGPs sont d'abord intégrées à l'endoderme de l'embryon à 7,5 jpc puis par une migration passive à 8,5 jpc chez la souris (33-37 jpc chez l'homme) à l'intestin postérieur en formation (figure 11).

Entre 9,5 jpc-11,5 jpc (5-6 semaines chez l'homme), les CGPs quittent l'intestin postérieur vers le mésoderme puis migrent de façon bilatérale en direction des crêtes génitales en formation (figure 11). La migration des CGPs dans la gonade est vraisemblablement contrôlée par les cellules somatiques par l'intermédiaire de facteurs de croissance (ex. SCF, LIF, bFGFs, SDF1) ou encore les constituants de la matrice extracellulaire (ex. collagènes type I/III/IV, fibronectine, laminine) (Wylie 1999, Stebler et al. 2004, Gu et al. 2009, Ewen & Koopman 2009). Les CGPs colonisent les crêtes génitales entre 10 et 12,5 jpc.

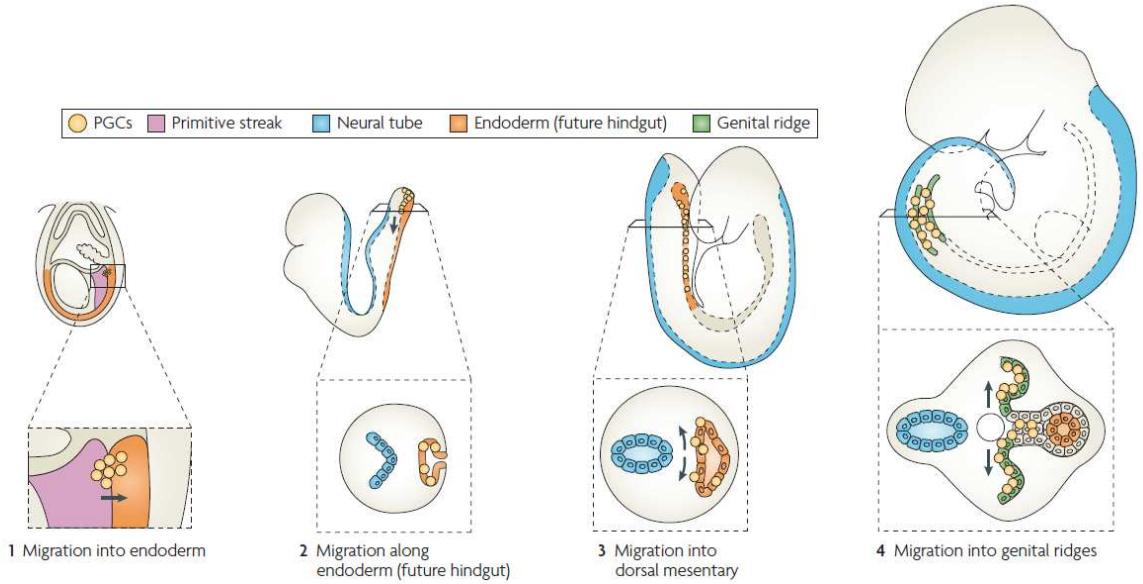


Figure 11. Les étapes de migration des CGPs chez la souris (d'après Richardson & Lehmann 2010)

Au cours de leur migration, on assiste à une multiplication des cellules germinales primordiales (Vergouwen et al. 1991). Les CGPs sont au nombre de 10 à 100 au moment où elles quittent le sac vitellin, de 2500 à 5000 lorsqu'elles atteignent le territoire gonadique où elles terminent leur prolifération à 12 jpc pour atteindre un nombre de 20000 à 25000. Chez le mâle, entre 12-14 jpc les cellules germinales cessent de proliférer et subissent un arrêt mitotique au sein des cordons sexuels. A ce stade les gonocytes sont donc quiescents en phase G1/G0 du cycle cellulaire jusqu'à la puberté.

C'est au cours de leur migration et de la colonisation des crêtes génitales, que les cellules germinales primordiales subissent un remaniement global de leurs profils de méthylation au niveau de l'ADN, nous reviendrons sur ces modifications au niveau des CGPs dans le chapitre II.A.

5.2 Formation des gonades mâles

Bien que le sexe de l'embryon soit défini dès la fécondation par les chromosomes sexuels, la première ébauche gonadique n'apparaît qu'aux environs de 10 jpc chez la souris (Ross & Capel 2005) et 5 semaines post conception chez l'homme.

5.2.1 Le stade de gonade indifférenciée

L'ébauche gonadique (ou crêtes génitales) est formée par la prolifération cellulaire au niveau du mésonéphros ou corps de Wolff lors de la colonisation de ce territoire par les CGPs. Le mésonéphros est constitué de cellules mésenchymateuses et est recouvert par de l'épithélium cœlomique. L'arrivée des CGPs provoque la prolifération de ces deux types cellulaires. A leur arrivée au niveau des crêtes génitales les CGPs sont également appelées à gonocytes. Les CGPs (lignée germinale), les cellules mésenchymateuses et les cellules épithéliales (lignée somatique) se rassemblent pour former des agrégats qui constituent les crêtes génitales. Ces agrégats s'organisent en deux compartiments : (1) le compartiment stromal constitué des cellules mésenchymateuses, fibroblastes et vaisseaux, (2) les cordons sexuels primitifs constitués des CGPs et cellules épithéliales (11-12 jpc chez la souris, 40-44 jpc chez l'homme). A ce stade les gonades ne sont ni mâle ni femelle, c'est la phase ambisexuée. Les gènes qui stimulent la formation des gonades indifférenciées sont des facteurs de transcription pour la plupart (ex. WT1, SF1, Lim 1 et 9). A titre d'exemple, le gène

WT1 (exprimé à partir de 10,5 jpc chez la souris) et le gène SF1 (exprimé entre 9 et 12 jpc) stimulent le développement des gonades indifférenciées.

5.2.2 La différenciation en testicule

- Initiation de la différenciation testiculaire :

Les gènes SRY, SOX9 et SF1 permettent la différenciation de la gonade indifférenciée en testicule. Les premiers évènements morphologiques sont l'appariation d'une membrane basale autour des cordons séminifères (cordons sexuels) en formation (12-12,5 jpc chez la souris) qui donneront plus tard les tubes séminifères (figure 12).

- Différenciation des cellules de Sertoli :

En parallèle les cellules de l'épithélium cœlomique (somatiques) adjacentes aux gonocytes commencent à exprimer le gène SRY et se différencient en pré-cellules de Sertoli (10,5-12 jpc chez la souris, 44 jpc chez l'homme) (Koopman et al. 1990, Ross & Capel 2005). Durant cette période initiale du développement gonadique, la différenciation des cellules de Sertoli est dépendante de l'action de SRY, SOX9 et SF1 qui stimulent leur activité de sécrétion de l'AMH (Sekido & Lovell-Badge 2009). Durant la phase fœtale de prolifération des cellules de Sertoli, l'effet des androgènes sur les cellules de Sertoli passe par l'intermédiaire des cellules péritubulaires myoïdes qui expriment l'AR.

- Différenciation des cellules de Leydig :

La seconde étape est la différenciation des cellules de Leydig à partir de précurseurs issus du mésenchyme du lobe antérieur du mésonéphros, de l'épithélium cœlomique ou encore des crêtes neurales (12,5-13,5 jpc chez la souris) (figure 12) (Ross & Capel 2005, Barsoum & Yao 2010). Leur différenciation est sous le contrôle de facteurs issus des cellules de Sertoli comme DHH (Desert Hedgehog) ou PDGF-A (Platelet Derived Growth Factor A) (O'Shaughnessy et al. 2006). Les cellules de Leydig fœtales sont présentes, dès la détermination sexuelle mâle environ 24 heures après l'apparition des cellules de Sertoli (de 12,5-13,5 jpc chez la souris), cette population de cellules disparaitra progressivement après la naissance (Ross & Capel 2005). Elles seront responsables de la sécrétion d'androgènes à au cours de la masculinisation du fœtus.

La gonade mâle différenciée produit alors les hormones responsables de la différenciation de l'appareil génital mâle : (1) l'AMH produite par les cellules de Sertoli dès 13,5 jpc provoque la régression des canaux de Müller, (2) la testostérone produite par les cellules de Leydig (14,5 jpc chez la souris, 8 semaines chez l'homme) est responsable du maintien des canaux de Wolf qui donneront naissance à l'épididyme, aux canaux déférents et aux vésicules séminales, (3) la DHT permet la virilisation du sinus urogénital et des organes génitaux externes.

Durant la vie fœtale et néonatale, les cellules de Sertoli ont une activité accrue de prolifération pour atteindre leur nombre maximum au sein du testicule de souris vers 14 jours postnatals.

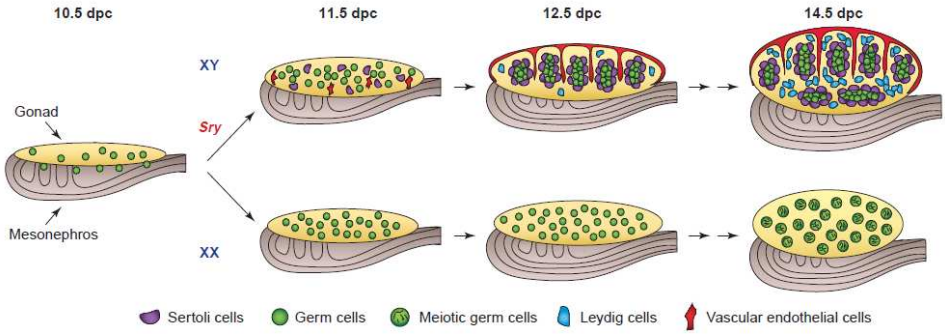


Figure 12. Différenciation précoce de la gonade chez la souris
(d'après Ross & Capel 2005) *Entre 9,5-11,5 jpc les CGPs (en vert) migrent en direction des crêtes génitales et colonisent la gonade primitive. Entre 10,5-12 jpc le gène SRY s'exprime uniquement au niveau des gonades XY et stimule la différenciation testiculaire. Les premiers événements sont la différenciation des cellules de Sertoli (en violet) qui entourent les gonocytes au niveau des cordons testiculaires. Puis intervient aux environs de 12,5 jpc la différenciation des cellules de Leydig au niveau interstitiel.*

5.3 Développement postnatal des cellules germinales et initiation de la spermatogenèse

Après la naissance aux alentours de 4-6 jpp chez la souris, les gonocytes quiescents arrêtés en G0/G1 reprennent leur cycle cellulaire pour terminer la mitose. A ce stade les cellules germinales sont appelées spermatogonies (cf partie 3.1.2 de ce chapitre). Après le déclenchement de la puberté à 7-8 jpp chez la souris, l'initiation de la méiose s'effectue à l'âge de 10 jours (Bellvé et al. 1977).

Actuellement les signaux requis pour l'initiation de la méiose dans la lignée germinale ne sont pas encore bien connus. Un des candidats potentiels serait l'acide rétinoïque qui semble favoriser l'entrée en méiose (Ewen & Koopman 2009).

Pour les étapes ultérieures, la première vague de la spermatogenèse se déroule entre 5 et 35 jpp suivant les mêmes étapes que celles décrites précédemment durant la spermatogenèse chez l'adulte (figure 13). A 35 jpp les premiers spermatozoïdes sont détectés dans la lumière du tube séminifère. C'est la fin de la première vague de la spermatogenèse, le testicule peut être considéré comme pubère.

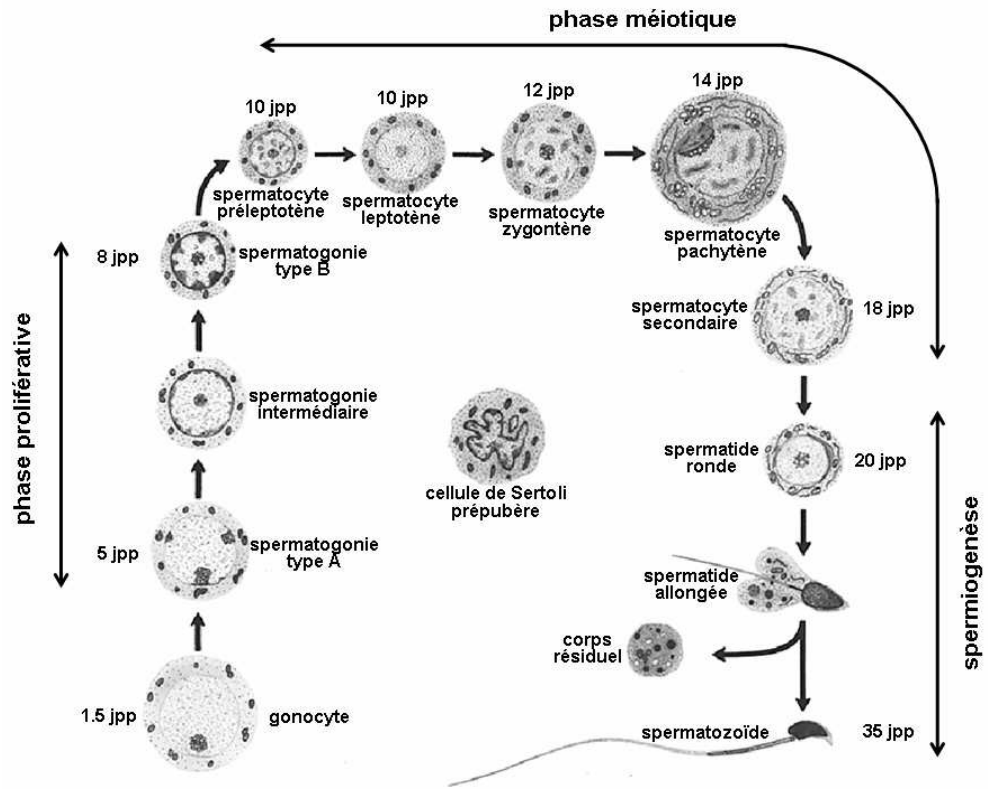


Figure 13. Evènements chronologiques lors de la première vague de spermatogenèse chez la souris (d'après Bellvé et al 1977)

6 *Le contrôle des fonctions testiculaires*

Les différentes fonctions testiculaires sont soumises au contrôle par différents facteurs comprenant des signaux hormonaux (ex. testostérone, FSH…), des facteurs locaux (facteurs de croissance, cytokines…) qui permettent le contrôle de l'expression de gènes cibles impliqués dans la régulation de la prolifération, de la méiose, de la différenciation et de l'apoptose des cellules germinales.

6.1 Le contrôle hormonal

La spermatogenèse est principalement régulée par des interactions endocriniennes entre l'hypothalamus, l'hypophyse, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig (Dohle et al. 2003).

6.1.1 Le contrôle par les hormones hypothalamo-hypophysaires

L'axe hypothalamo-hypophysaire régule les fonctions testiculaires en deux temps (figure 14). Tout d'abord, l'hypothalamus sécrète de manière pulsatile le GnRH qui va agir au niveau des cellules endocrines de l'hypophyse. Ceci entraine la sécrétion pulsatile des gonadotrophines LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle-Stimulating Hormone). Ces hormones vont aller agir directement sur les cellules somatiques testiculaires (Leydig et Sertoli) :

(1) Au niveau des cellules de Leydig, la LH va lier son récepteur au niveau de la membranaire afin d'activer la stéroidéogenèse et la sécrétion de testostérone.

(2) Au niveau des cellules de Sertoli, la FSH via le récepteur à la FSH permet d'activer les fonctions de la cellule de Sertoli comme par exemple la sécrétion de l'Androgen Binding Protein (ABP) permettant de transporter et de concentrer la testostérone au niveau des tubes séminifères. La FSH en complément des androgènes est requise pour le processus de spermatogenèse mais pas indispensable

6.1.2 Rôle des androgènes (testostérone)

Au cours de la spermatogenèse, la testostérone produite en majeur partie par la cellule de Leydig, agit de manière locale au niveau des cellules de Sertoli qui expriment le récepteur des androgènes (AR). La testostérone est indispensable à la spermatogenèse (Wang, Yeh, et al. 2009). Ainsi, la liaison de la testostérone au niveau de sont récepteur est indispensable à la maturation du testicule, au déclenchement et au maintien de la spermatogenèse mais également en inhibant l'apoptose des cellules germinales. Il est intéressant de noter que la concentration intra-testiculaire de testostérone est plus élevée que la concentration plasmatique. Ce gradient de concentration est nécessaire au bon déroulement de la spermatogenèse. D'autre part, le taux d'expression du récepteur des androgènes au niveau des cellules de Sertoli va dépendre du stade du tube séminifère. Ainsi, ce sont les stades VII et VIII où l'expression de l'AR est la plus élevée et qui sont les plus

touchés par l'apoptose des cellules germinales lors d'un retrait androgénique (Holdcraft & Braun 2004).

6.1.3 Rôle des estrogènes (estradiol)

L'action des estrogènes sur la spermatogenèse a longtemps fait débat, mais il est maintenant clairement admis qu'ils peuvent influencer la prolifération, la différenciation et la fonction des cellules testiculaires (pour revue Carreau & Hess 2010). Les cellules somatiques et germinales du testicule ont la capacité d'aromatiser les androgènes en estrogènes (Carreau et al. 2007, Carreau et al. 2009). De plus au sein du testicule de rat adulte, les cellules de Leydig expriment le récepteur ERα, les cellules somatiques (Leydig, Sertoli) et certaines cellules germinales (spermatogonies, spermatocyte pachytène, spermatides rondes) expriment le récepteur ERβ (O'Donnell et al. 2001, Sierens et al. 2005, Carreau & Hess 2010). Les estrogènes auraient également la capacité de réguler le processus de spermatogenèse à travers des voies de réponse rapide impliquant le récepteur membranaire couplé aux protéines G (GPR30). Ce récepteur serait par exemple exprimé au niveau des spermatogonies et des spermatocytes pachytènes (Chimento et al. 2010).

6.1.4 Arguments appuyant le rôle des différentes hormones dans la spermatogenèse

Les travaux réalisés chez l'animal ont permis de mieux caractériser le rôle de la LH, de la FSH, des androgènes et des estrogènes :

(1) Les rats hypophysectomisés présentent une perte de LH, de FSH et par voie de conséquence de testostérone. Ceci a pour effet d'entrainer un arrêt de spermatogenèse au niveau méiotique (perte du nombre de spermatides rondes et allongées) qui peut être rétabli par l'administration de LH et testostérone (Holdcraft & Braun 2004).

(2) Les souris mâles invalidées par le récepteur à la LH présentent une déficience de production de testostérone, des défauts dans la maturation sexuelle postnatale, des cryptorchidies et un arrêt de spermatogenèse au stade spermatide ronde rétabli par l'administration de testostérone (Holdcraft & Braun 2004).

(3) Les souris mâles invalidées pour le récepteur à la FSH ou la FSHβ présentent une réduction du poids testiculaire et de production de sperme associées à une diminution de la prolifération des cellules de Sertoli. Ceci montre que la FSH à un rôle primordial dans le

contrôle du nombre de cellules de Sertoli qui contrôle lui-même le nombre de cellules germinales (O'Shaughnessy et al. 2009).

(4) L'invalidation ou la réduction du taux de récepteur des androgènes (AR) au niveau du testicule ou de manière spécifique au niveau des cellules de Sertoli a le plus souvent pour effet d'entrainer des altérations de la spermatogenèse à différents stades (spermatocytes diplotènes ou pachytènes, spermatides rondes) ou dans la spermiogenèse. Ceci souligne le rôle majeur de la testostérone dans la progression de la spermatogenèse et l'achèvement de la méiose (Wang, Yeh, et al. 2009).

(5) L'invalidation des deux récepteurs aux estrogènes (ERα et β) chez les souris ERKO entraine un phénotype d'infertilité caractérisé par des pertes de cellules germinales (Eddy et al. 1996). Il semble que ce soit plus spécifiquement l'invalidation de l'ERα qui soit responsable des altérations observées (Hess et al. 1997), tandis que les souris invalidées pour ERβ sont fertiles (Krege et al. 1998).

(6) L'invalidation du gène *Cyp19* entraine des altérations de la spermatogenèse chez les animaux vieillissants notamment par des arrêts de la spermatogenèse au niveau des étapes de la spermiogenèse et une augmentation de l'apoptose se traduisant par une diminution du nombre de spermatides (Robertson et al. 1999, Robertson et al. 2001).

6.1.5 Les boucles de rétro-contrôle

En retour, à l'action des hormones gonadotropes on observe une double rétro-inhibition (figure 14) :

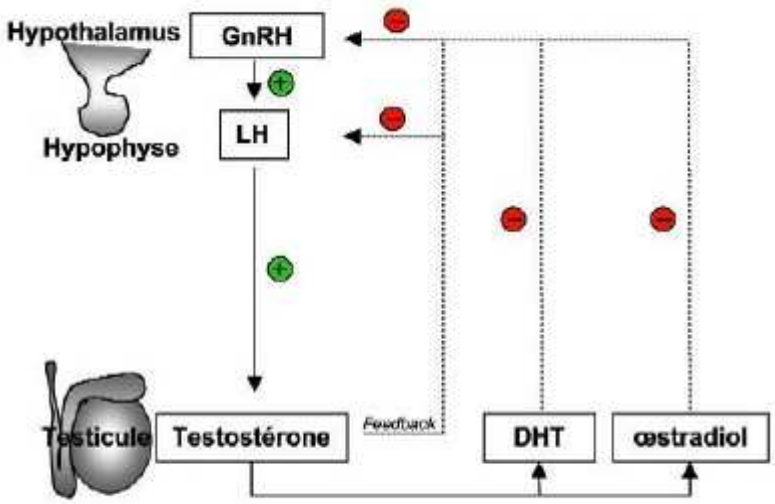


Figure 14. Contrôle hormonal de la spermatogenèse (d'après Tostain et al. 2004).

(1) Lorsqu'elles sont stimulées par la LH, les cellules de Leydig sécrètent de la testostérone, qui elle-même va inhiber la production de la GnRH par l'hypothalamus, et de la LH par l'hypophyse.

(2) Lorsqu'elles sont stimulées par la FSH, les cellules de Sertoli sécrètent l'inhibine, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la FSH soit en en diminuant la sécrétion de la GnRH par l'hypothalamus, soit directement en agissant sur l'hypophyse.

6.2 Les facteurs locaux paracrines

Etant donné que les hormones LH, FSH et testostérone ne possèdent pas de récepteur sur les cellules germinales, leur effet sur la spermatogenèse doit être médié par un relais local au sein du tube séminifère. C'est donc les cellules de Sertoli qui, sous le contrôle du système hormonal, vont produire et sécréter des facteurs locaux régulant le développement des cellules germinales et certaines fonctions testiculaires. Ce contrôle local par les cellules de Sertoli est constitué de nombreuses interactions complexes entre les différentes populations cellulaires du testicule et un certain nombre de données moléculaires restent à découvrir concernant ces interactions.

6.2.1 Le contrôle direct de la spermatogenèse par les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli produisent un certain nombre de cytokines et de facteurs de croissances régulant directement les différentes phases de la spermatogenèse (figure 15) :

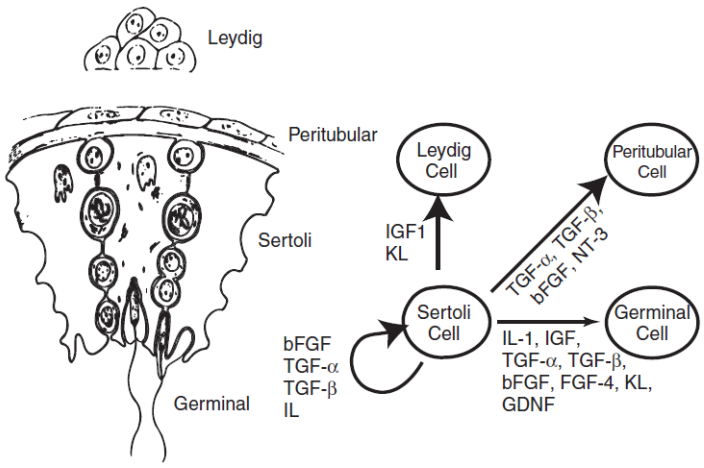


Figure 15. Exemples de facteurs sécrétés par les cellules de Sertoli afin de contrôler leurs cellules cibles : les cellules germinales, cellules de Leydig et cellules péritubulaires myoïdes (d'après Skinner 2005)

(1) Facteurs régulant la phase de prolifération des spermatogonies : le Stem Cell Factor (SCF) (ou Kit Ligand, KL) produit par les cellules de Sertoli agit via son récepteur C-KIT présent sur la membrane des cellules germinales. D'autres facteurs comme GDNF, LIF, EGF ou activine stimulent la prolifération (Sofikitis et al. 2008). Des facteurs comme inhibine ou TGF-β inhibent la prolifération.

(2) Facteurs contrôlant la phase de méiose des cellules germinales : ex. TGF-β, EGF.

(3) Facteurs contrôlant la phase de spermiogenèse : ex. EGF.

(4) Facteurs contrôlant la survie et l'apoptose des cellules germinales : LIF, interleukine 4, FGF, SCF, BMP-4, BPM-8A, BMP-8P stimulent la survie de cellules germinales, tandis que TRAIL, TGF-β stimulent l'apoptose des cellules germinales (Sofikitis et al. 2008).

6.2.2 Le contrôle des fonctions leydigienne

En plus du contrôle hormonal exercé par la LH, certains facteurs produits par la cellule de Sertoli vont réguler la stéroidéogenèse et la production de testostérone par les cellules de Leydig (figure 15) :

(1) Facteurs stimulant la production de testostérone : ex. EGF, FGF, IGF-I.

(2) Facteurs inhibant la production de testostérone : ex. TNF-α, TGF-β, IL-1 α.

6.2.3 Le contrôle des fonctions sertoliennes

En plus du contrôle hormonal exercé par la FSH, il existe également un dialogue entre cellules de Leydig et cellules de Sertoli, entre cellules germinales et cellules de Sertoli ou encore entre cellules péritubulaires myoïdes et cellules de Sertoli via les facteurs locaux afin de contrôler leurs fonctions. Etant donné le rôle majeur de la cellule de Sertoli dans le contrôle de la spermatogenèse, le contrôle de ses fonctions aura des répercussions indirectes sur la spermatogenèse. Ces différents facteurs sont :

(1) Facteurs régulant la production de substrats énergétiques : ex. EGF, TNF-α.

(2) Facteurs contrôlant la production de transferrine : ex. TNF-α.

(3) Facteurs régulant la synthèse de métalloprotéases contrôlant l'ouverture des jonctions serrées : ex. TNF-α, bFGF.

II - Les effecteurs épigénétiques

1 Généralités sur le concept d'épigénétique

Historiquement, le terme "épigénétique" a été utilisé afin de décrire les évènements ne pouvant pas être expliqués par les principes génétiques.

Conrad Waddignton, en 1942, a été le premier à utiliser le terme d'épigénétique en le définissant comme la branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, conduisant à l'apparition d'un phénotype. Progressivement, un certain nombre de phénomènes biologiques inexplicables (comme l'extinction spécifique d'un locus paternel ou maternel) ont été classés comme des phénomènes épigénétiques. En 1957, Waddington a proposé le concept de paysage épigénétique afin d'illustrer le processus de prise de décision d'une cellule au cours de son développement et sa différenciation. Dans ce concept, la cellule en différenciation (représentée par la boule) peut prendre différentes trajectoires possibles (représentées par les vallons) conduisant à un devenir et une fonction différente pour la cellule (figure 16) (Goldberg et al. 2007).

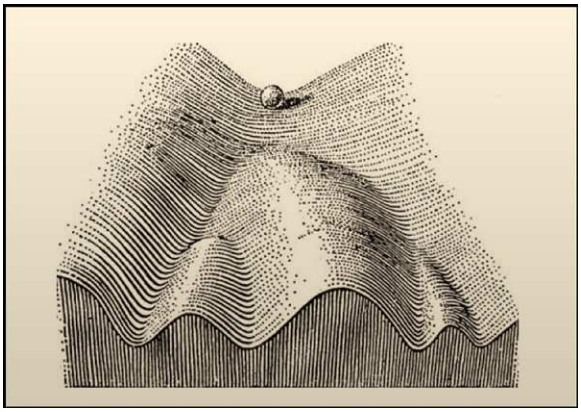


Figure 16. Le concept classique de paysage épigénétique selon Waddington (1957)

L'épigénétique constitue donc d'une manière générale un "pont" entre le génotype et le phénotype par un mécanisme qui change le devenir d'un locus ou d'un chromosome (son expression) sans changer la séquence d'ADN.

De nos jours, l'épigénétique est un mécanisme incontournable dans l'étude des processus biologiques et est définie comme l'ensemble des modifications de l'expression des gènes, transmises au cours des divisions cellulaires, mais n'impliquant pas de changement

dans la séquence propre de l'ADN. Ainsi, l'ensemble de ces modifications épigénétiques est regroupé sous le terme d' "épigenome" par homologie avec le terme "génome".

2 La chromatine support des mécanismes épigénétiques

Dans les cellules l'ADN est enroulé sur une distance de 146 pb autour d'un complexe protéique, le nucléosome, composé de 8 protéines histones (octamère) associées par paires : deux histones H2A, deux histones H2B, deux histones H3 et deux histones H4. L'ensemble composé par l'ADN et le nucléosome est l'élément de base de la chromatine (figure 17). Les nucléosomes sont reliés entre eux par de courts segments d'ADN de liaison interagissant avec une histone H1 pour constituer une fibre chromatinienne ou nucléofilament (diamètre 11 nanomètre), puis un second niveau compaction (facteur 2 à 3) par l'interaction spécifique entre les nucléosomes permet d'aboutir à une fibre de 30 nm de diamètre. Il existe un troisième niveau de compaction qui est moins bien identifié permettant de former des boucles de chromatine qui s'enroulent en spirales pour donner le chromosome métaphasique. Ainsi ces différents degrés d'enroulement permettent d'atteindre un taux de compaction de 10 000 fois par rapport à une molécule d'ADN linéaire (Belmont 2002).

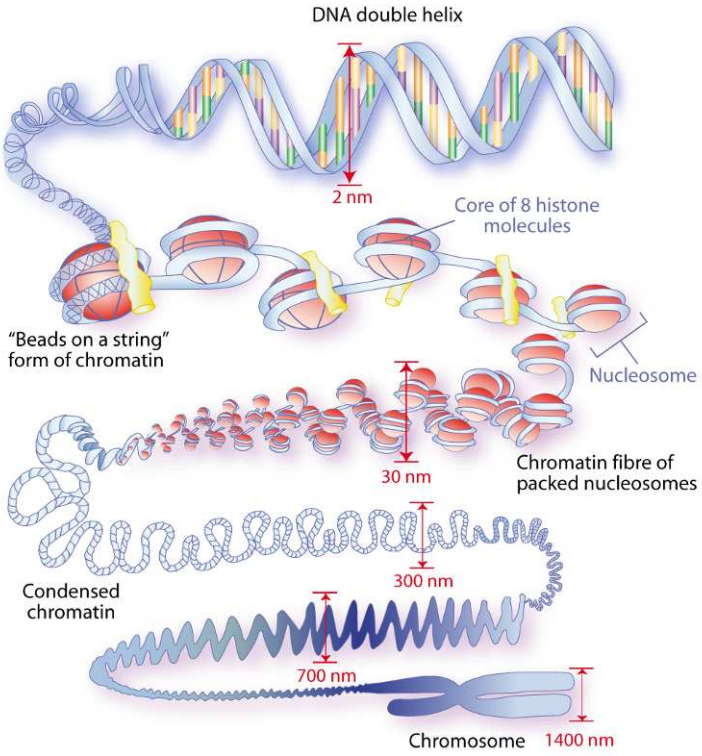


Figure 17. Les différents niveaux de compaction de la chromatine : de la double hélice d'ADN au chromosome métaphasique (d'après http://www.epitron.eu/img/chromatin.tif).

La chromatine est le support de la majeure partie de mécanismes de régulation épigénétiques par la méthylation directement au niveau de l'ADN de l'ADN ou les modifications post-traductionnelles des histones qui conduisent à la compaction ou la décompaction locale de la chromatine aboutissant au contrôle de l'expression des gènes.

3 *Les différentes formes de régulation épigénétique*

Il existe trois grands types de régulations épigénétiques (figure 18) :

(1) Le premier est constitué par les modifications directes de l'ADN : la méthylation de l'ADN,

(2) Le second est constitué par des modifications post-traductionnelle au niveau des queues des protéines histones (ex. acétylation, méthylation, sumoylation, ubiquitination). Ces deux premiers mécanismes influencent directement la structure de la chromatine,

(3) Le troisième mécanisme identifié plus récemment, est constitué par les microARNs, des petits ARNs capables notamment de dégrader les transcrits ou de réprimer l'expression des protéines sans modifier la structure du gène en amont (Xu 2009).

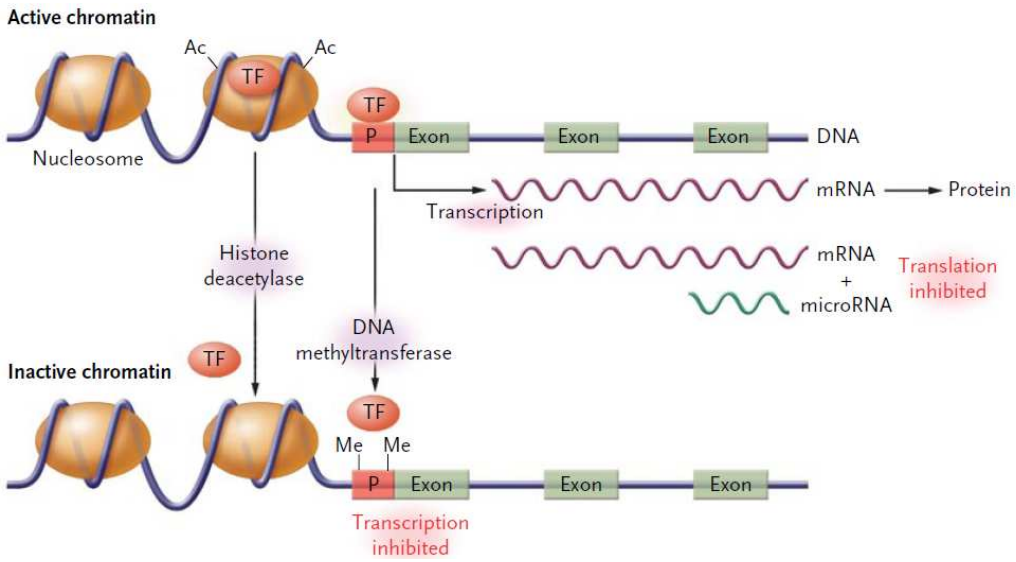


Figure 18. Représentation schématique des trois grands mécanismes de régulation épigénétique de l'expression des gènes
(d'après Gluckman et al. 2008).

Dans ce chapitre nous avons focalisé notre étude bibliographique sur les deux des grands types d'effecteurs épigénétiques qui ont été abordés au cours de ce travail de thèse : méthylation de l'ADN et microARNs. Etant donné qu'une majeure partie de ce travail de

thèse à porté sur l'étude du testicule notre revue bibliographique a été focalisée sur les mécanismes de méthylation de l'ADN et les microRNAs, à chaque fois que cela a été possible, nous avons essayé de rapporter les données de la littérature concernant les modifications épigénétiques au processus de spermatogenèse et à la physiopathologie testiculaire.

II.A - La méthylation de l'ADN

1 Définition et généralités

La méthylation de l'ADN est la modification épigénétique la plus connue. Elle a été mise en évidence pour la première fois au niveau de l'ADN sur des extraits thymus de veau par les travaux d'Hotchkiss en 1948 (Hotchkiss, 1948). Le mécanisme de méthylation de l'ADN a été mis en évidence dans la plupart des espèces allant de la bactérie jusqu'à l'homme mais certains organismes comme *Caenorhabdtis Elegans*, *Saccharomyces Cervisiae* ou *Saccharomyces Pombe* en sont dépourvus.

Chez les eucaryotes supérieurs, dont les mammifères, la réaction de méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (-CH3) sur le cinquième carbone de l'anneau pyrimidine des cytosines situées au niveau des dinucléotides CpG contribuant ainsi à former des 5-methylcytosines. Cette réaction est catalysée par des enzymes spécialisées, les ADN méthyltransférases souvent abrégées en DNMTs de l'anglais *DNa MethylTransferases*. Les DNMTs utilisent le substrat S-adénosyl-L-méthionine comme donneur de groupement méthyle pour réaliser la méthylation de l'ADN (figure 19).

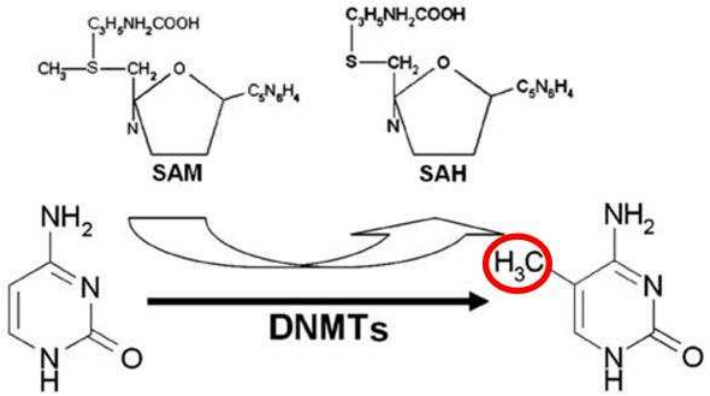


Figure 19. La réaction de méthylation de l'ADN (d'après Luczak & Jagodziński 2006)

Chez les eucaryotes, la méthylation de l'ADN intervient de façon prédominante au niveau des cytosines situées en 5' de guanines connus sous la dénomination de dincléotides CpG. La méthylation de l'ADN en C5 des cytosines est la seule modification covalente de l'ADN connue chez les métazoaires. La 5-methylcystosine est souvent considérée comme la cinquième base de l'ADN chez les mammifères (Hermann et al. 2004). La méthylation au

niveau des résidus cytosine représente 3 à 8 pour cent de l'ensemble des cytosines. De façon approximative 60 à 80 pour cent des sites CpG sont méthylés chez les mammifères. La majorité des séquences méthylées se trouve au niveau des rétrotransposons, des séquences répétées, des séquences intergéniques et dans une moindre proportion au niveau des gènes à copie unique, ou encore les régions différenciellement méthylées des gènes soumis à empreinte. Une exception est faite pour les CpG présents dans de courtes régions à forte densité CpG appelées ilôts CpG. En effet, les ilôts CpG se trouvant le plus souvent au niveau des promoteurs ou des premiers exons des gènes à expression ubiquitaire sont le plus souvent non méthylés (Chen et al. 2006, Illingworth et al. 2009, Rottach et al. 2009). Ainsi, la méthylation de l'ADN intervient généralement dans des phénomènes de régulation de l'expression des gènes ou des séquences d'ADN parasites (voir partie de ce chapitre). Enfin, la réaction de méthylation de l'ADN est un phénomène réversible (voir plus loin).

2 *Les ADN méthyltransférases (DNMTs)*

Historiquement la première ADN méthyltransférases a été mis en évidence en 1964 par Gold et Hurwitz chez *Escherichia Coli* (Gold et al. 1964) tandis que chez les mammifères, la première activité de type ADN méthyltransférases a été découverte par les travaux du groupe de Razin en 1982 (Gruenbaum et al. 1982).

A ce jour trois familles d'ADN méthyltransférases ont été mises en évidence chez les mammifères : DNMT1, DNMT2 et DNMT3.

D'une manière générale les DNMTs sont constituées de deux domaines : un domaine N terminal de "régulation" et un domaine C terminal catalytique. Le domaine C terminal dit "catalytique" présent dans les trois familles de DNMTs est caractérisé par la présence de 10 motifs conservés (motifs I à X). En revanche le large domaine N terminal qui constitue le domaine de "régulation" diffère entre les DNMTs. Ce domaine, présent uniquement dans les familles DNMT1 et DNMT3, possède différentes régions permettant notamment les interactions de type protéine-protéine ou encore la localisation nucléaire de ces DNMTs (figure 20).

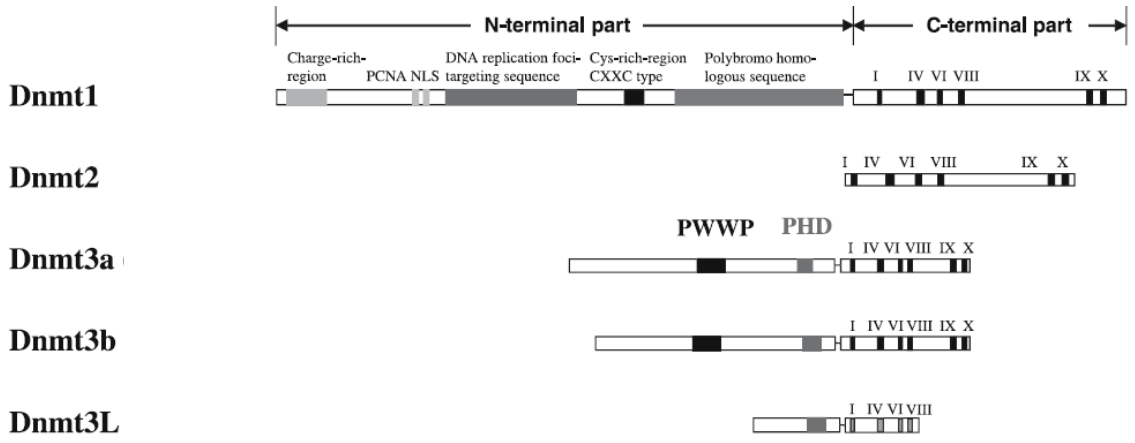


Figure 20. Structure schématique de la famille des ADN méthyltransférases (d'après Jeltsch, 2006)

2.1 La famille DNMT1 – Méthylation de maintien

L'enzyme DNMT1 est la première à avoir été mise en évidence et clonée chez les mammifères (Bestor et al. 1988). Elle est classiquement décrite comme une ADN méthyltransférase de maintien c'est-à-dire qu'elle recopie les profils de méthylation déjà en place au cours de la réplication (Chen & Li 2006).

- *Structure générale de la protéine :*

DNMT1 possède un long domaine N terminal de régulation qui lui confère de nombreuses propriétés spécifiques d'interaction avec d'autres protéines ou encore pour la reconnaissance de séquences spécifiques au niveau de l'ADN (figure 20). Tout d'abord, au début de la partie régulatrice on peut observer un domaine riche en charges lui permettant d'interagir avec le répresseur transcriptionnel DMAP1 (DNMT Associated Protein-1), puis on trouve une région contenant le PCNA Binding Domain (PBD) permettant la liaison à PCNA (Proliferating Nuclear Antigen), un signal de localisation nucléaire (NLS) et une région permettant le ciblage au niveau des foyers de réplication (Replication Foci Targeting Domain, RFTD) (Goll & Bestor, 2005), ensuite près du centre de DNMT1 une région riche en cystéine permet la liaison de plusieurs ion Zn2+ permettant de former des structures en doigt de zinc, puis vers la fin du domaine de régulation on observe une région contenant deux Bromo Adjacent Domain (BAH) qui permettrait les interactions de type protéine-protéine mais également un rôle dans le transport de DNMT1 vers les foyers de réplication (Hermann et al.

2004, Siedlecki et al. 2006). Le domaine C terminal catalytique est relié au domaine N terminal par un court enchaînement de dipeptides Gly-Lys. Ce domaine catalytique ne peut fonctionner seul s'il est isolé du domaine de régulation (Fatemi et al. 2001). Enfin, ce domaine catalytique possède les 10 motifs caractéristiques des cytosines-C5-méthyltransférases parmi lesquels cinq permettent la liaison du substrat (motifs I, IV, VI, VIII et X) (figure 20).

- *Les différentes formes de DNMT1 :*

Il a été mis en évidence des variants de *Dnmt1* provenant d'épissages à partir de l'utilisation alternative de trois types d'exons 5' différents (exons **1s**, **1o** et **1p**) en fonction du sexe aboutissant au contrôle de l'expression et de la localisation de DNMT1 notamment au moment de la gamétogenèse (figure 21).

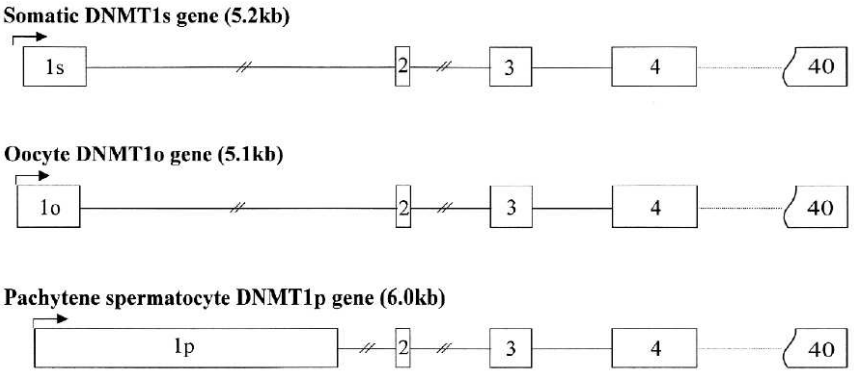


Figure 21. Les différentes formes de transcrit Dnmt1 (Dnmt1s, Dnmt1o et Dnmt1p) (d'après Turel-Plewa et al., 2005)

La forme DNMT1s dite "somatique" est exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules germinales et somatiques. Cette forme longue de DNMT1 provient de l'épissage alternatif à partir de l'exon 1s donne un messager traduit en une protéine active d'environ 180-190 kilodaltons (kDa) (figure 21). Une autre forme de DNMT1 est exprimée exclusivement dans l'ovocyte et dans l'embryon préimplantatoire, cette forme identifiée comme DNMT1o provient d'un épissage alternatif utilisant l'exon 1o donnant un ARNm codant pour une protéine active plus courte d'environ 175 kDa (figure 21) qui est l'unique forme de DNMT1 durant la croissance ovocytaire et le développement embryonnaire préimplantatoire. Enfin, une dernière possibilité d'épissage alternatif, à partir de l'exon 1p, donne un transcrit *Dnmt1p* exprimé à un taux élevé et uniquement dans la lignée germinale

mâle au stade pachytène de méiose (figure 21). Il n'est pas très clair si ce transcrit *Dnmt1p* à la capacité de coder pour une protéine. Certains auteurs ont conclu que cette La forme de transcrit *Dnmt1p* ne permet pas la production de protéine DNMT1, probablement en raison d'un effet inhibiteur sur la traduction dû à la présence de nombreux cadres de lectures ouverts (ORFs) (Mertineit et al. 1998, Dean et al. 2005, Turek-Plewa et al. 2005, Schaefer et al. 2007). Cependant, un travail a rapporté l'expression d'un transcrit d'une forme identique à *Dnmt1p* qui à la capacité de produire une protéine dans les cellules musculaires différenciées (Aguirre-Arteta et al. 2000).

- *DNMT1, ADN méthyltransférase de maintien :*

DNMT1 est l'ADN méthyltransférase majoritaire au sein des tissus somatiques. Elle est classiquement décrite comme une ADN méthyltransférase de maintien, c'est à dire qu'elle recopie et maintient les profils de méthylation au cours des divisions cellulaires successives (figure 22). En effet, DNMT1 est la plupart du temps transcrite pendant la phase S du cycle cellulaire et présente une forte affinité pour les sites hémiméthylés. En conséquence, DNMT1 lit la séquence d'ADN et applique des groupements méthyls en face de sites CpG hémiméthylés nouvellement répliqués (Jones & Liang 2009). Via son interaction avec PCNA ou encore UHRF1/NP95, DNMT1 est adressée au niveau sites CpG hémiméthylés au sein de la fourche de réplication afin de copier l'ensemble des profils de méthylation mis en place au cours du développement ou de la gamétogenèse (Rottach et al. 2009).

L'invalidation de DNMT1 chez la souris entraine une déméthylation massive du génome se traduisant par des anomalies d'expression des gènes à empreinte, d'inactivation des deux chromosomes X et réactivation d'éléments transposables (tels que la famille Intracisternal A Particle (IAPs)) et une létalité embryonnaire par un phénomène d'apoptose à la moitié de la gestation (Li et al. 1992, Goll & Bestor 2005b).

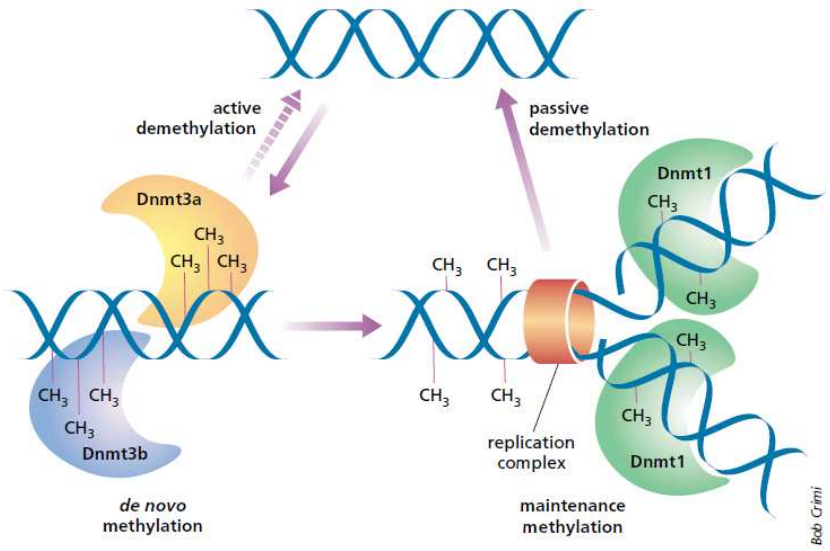


Figure 22. Représentation simplifiée de la méthylation de novo et de la méthylation de maintien (d'après Reik et al. 1999)

2.2 La famille DNMT3 – Méthylation de novo

La famille des DNMT3 a été identifiée pour la première fois en 1998 par Okano et al. chez la souris et l'homme sur la base d'homologie de séquences EST (Expressed Sequence Tag) avec une cytosine méthyltransférase bactérienne (Okano et al. 1998a). Il a été mis en évidence trois membres dans cette famille (3A, 3B et 3L). DNMT3A et 3B sont des protéines ubiquitaires généralement considérée comme des ADN méthyltransférases de novo, c'est-à-dire qu'elles établissent les nouveaux patrons de méthylation au niveau de l'ADN durant l'embryogenèse et le développement des cellules germinales.

2.2.1 Structure, fonction de DNMT3A et DNMT3B

- *Structure générale des protéines :*

Même si la structure générale des membres DNMT3A, 3B et 3L est très similaire, ces enzymes sont cependant codées par des gènes différents. DNMT3A et DNMT3B sont deux ADN méthyltransférases fonctionnelles tandis que DNMT3L ne possède pas d'activité enzymatique (Goll & Bestor 2005).

Au niveau de leur région de régulatrice N terminale, DNMT3A et 3B possèdent un domaine PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) de 100-150 acides aminés qui a pour fonction la liaison enzymes à l'ADN ainsi que de les cibler vers l'hétérochromatine péricentromérique (figure 20). En N terminal, DNMT3A et 3B possèdent également un domaine PHD (Plant

Homeodomain) ou domaine ATRX (ATRX-homology domain) constitué d'une région riche en cystéines permettant la formation d'une région en doigt de zinc fixant deux ions Zn2+. Ce domaine PHD qui permet des interactions protéine-protéine (par exemple avec l'histone déacétylase HDAC1), est généralement retrouvé au sein des protéines impliquée dans la régulation de la transcription chez les eucaryotes (Hermann et al. 2004, Chen & Li 2006). D'autre part le domaine PHD de DNMT3A, suffirait à lui seul pour réprimer la transcription indépendamment de l'activité méthyltransférase (Bachman et al. 2001, Fuks et al. 2001). Le domaine catalytique est celui qui est caractéristique des cytosines-C5-méthyltransférases avec la présence des motifs I à X (figure 20).

- *Les différentes formes de DNMT3A :*

Deux isoformes de DNMT3A ont été mises en évidence à ce jour, une forme longue appelée DNMT3A (comprenant les exons 1 à 24 sans l'exon 7) et une forme courte DNMT3A2 (comprenant les exons 7a-b + les exons 8 à 24) (figure 23A). Ces deux formes actives qui diffèrent en taille par les 223 (chez l'homme) ou 219 (chez la souris) premiers acides aminés proviennent de l'utilisation de différents promoteurs. Ainsi, la première forme active DNMT3A provient d'un transcrit codant pour une protéine d'environ 130 kDa (figure 23B), cette forme est présente au niveau de l'hétérochromatine et a une expression ubiquitaire (Weisenberger et al. 2002, Hermann et al. 2004).

La deuxième forme active courte DNMT3A2 généralement retrouvée au sein de l'euchromatine est la forme préférentiellement exprimée par les cellules ES et dans les gonocytes, elle intervient donc dans la méthylation de l'ADN au cours de la vie fœtale. Elle provient de l'utilisation alternative d'un second promoteur contenu dans la région intronique adjacente à l'exon 7 qui n'est présent que dans la forme *Dnmt3A2* (figure 23A). L'utilisation de ce second promoteur donne des transcrits aboutissant à une protéine d'environ 100 kDa (figure 23B) (Chen et al. 2002, Weisenberger et al. 2002).

Chez l'homme, 3 formes différentes de *DNMT3A* (*3A1*, *3A2* et *3A3*) ont été identifiées. La forme longue *DNMT3A1*, donne une protéine catalytiquement active d'environ 101 kDa correspondant à la forme DNMT3A chez la souris. La forme courte *DNMT3A2* code pour une protéine active de 77 kDa comparable à la forme DNMT3A2 murine. Le transcrit codant pour troisième forme *DNMT3A3* donne une protéine inactive de

16 kDa tronquée dans sa partie catalytique qui jouerait un rôle de régulateur de la méthylation de l'ADN (Galetzka et al. 2006, 2007).

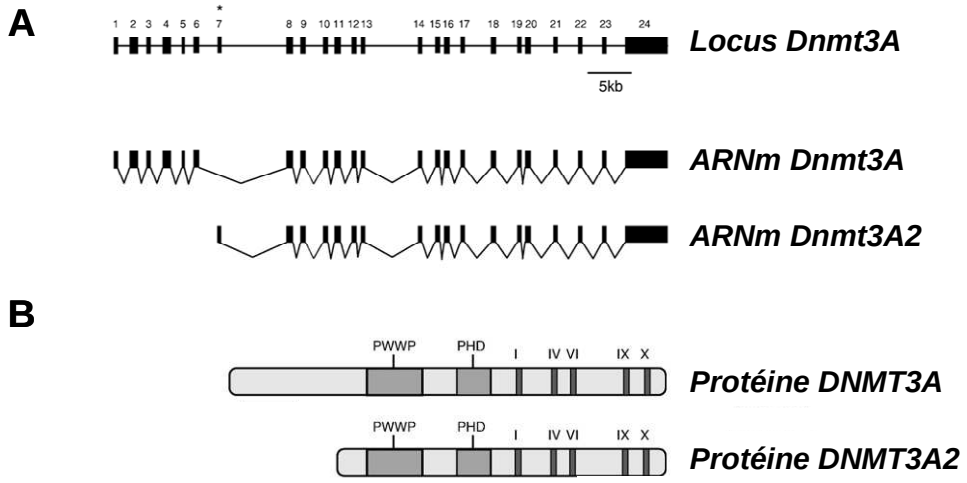


Figure 23. Les différentes formes de DNMT3A chez la souris
(d'après La Salle et al. 2006) *(A) Structure du locus Dnmt3A et des transcrits Dnmt3A et Dnmt3A2, (B) Structure des protéines DNMT3A et DNMT3A2.*

- *Les différentes formes de DNMT3B :*

Plusieurs transcrits différents de DNMT3B ont également été mis en évidence. Ces transcrits proviennent de l'épissage alternatif des exons 10, 11, 21 et/ou 22 et sont exprimés à des taux variables au cours du développement (figure 24).

Les formes DNMT3B1 et 3B2 sont actives tandis que la forme DNMT3B3 est inactive en raison d'une délétion dans le motif catalytique IX. Cette forme DNMT3B3 jouerait un rôle de régulateur positif de la méthylation (Weisenberger et al. 2004). Les formes DNMT3B4 et 3B5 codent pour des protéines inactives tronquées au niveau des motifs IX et X dont le rôle de régulateur positif/négatif ou indépendant de la méthylation n'est pas bien connu. Il existe également des formes DNMT3B6, 3B7 et 3B8 provenant de l'épissage alternatif des exons 22 et 23 (figure 24).

Ces épissages donnent lieu à l'expression de différentes protéines dont la taille est comprise entre 82 et 120 kDa. Ainsi DNMT3B1 et 3B6 sont identifiées aux alentours des 120 kDa et DNMT3B2 et 3B3 migrent aux alentours de 93 kDa (Weisenberger et al. 2004, La Salle et al. 2006). L'ensemble de ces différents transcrit donne lieu à une régulation complexe de l'expression de DNMT3B au cours du développement et en fonction des tissus. Le rôle des

différents variants de DNMT3B n'est pas encore bien identifié, mais ils apparaissent souvent surexprimés dans différents types de cancers (Wang et al. 2008, Su et al. 2010).

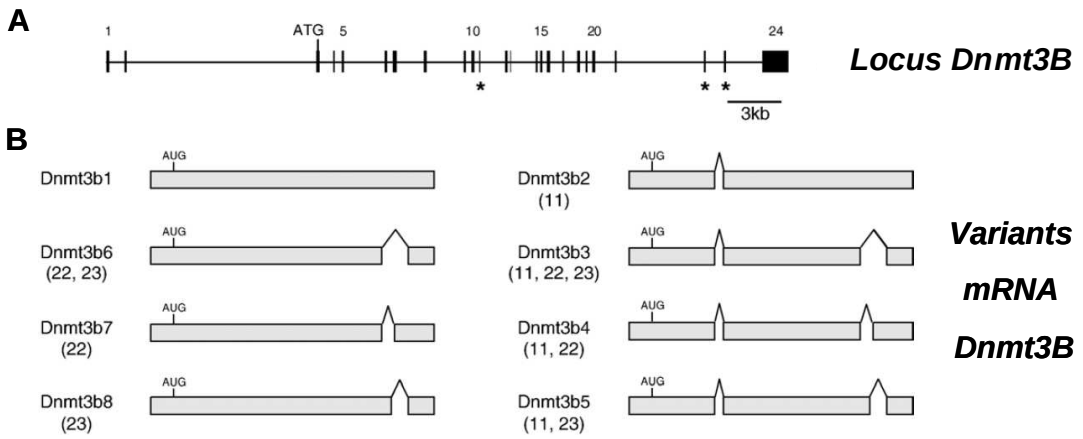


Figure 24. Les différents épissages de DNMT3B chez la souris
(d'après Weisenberger et al. 2004, La Salle et al. 2006) (A) *Organisation du locus Dnmt3B,* ***(B)*** *Epissages alternatifs donnant les différents variants de Dnmt3B à partir des exons 11 et/ou 22 et/ou 23 différentiellement épissés, entre parenthèse les exons épissés utilisés pour la production des variants.*

- *DNMT3A et DNMT3B, ADN méthyltransférases de novo :*

La méthylation d'ADN *de novo* joue un rôle principalement durant l'embryogenèse et la vie fœtale, mais on peut également retrouver de la méthylation de l'ADN durant la vie adulte pour le contrôle d'expression de gènes régulant le devenir d'une cellule ou encore l'extinction d'expression de séquences d'ADN parasites (ex. éléments transposables)(Fatemi et al. 2002). DNMT3A et DNMT3B sont fortement exprimées au sein des cellules embryonnaires, dans les tissus non différenciés et au cours du développement des cellules germinales au moment où on assiste aux vagues de déméthylation et de méthylation. Elles participent ainsi plus généralement à la mise en place les profils de méthylation, elles sont donc généralement décrites comme des ADN méthyltransférases *de novo* (figure 22).

L'inactivation de *Dnmt3A* et *3B* bloque la méthylation *de novo* au sein des cellules ES et au niveau des embryons. Les souris invalidées pour *Dnmt3A* meurent rapidement en raison d'un fort retard dans leur développement conduisant à la mort quatre semaines après la naissance alors que l'ensemble des profils de méthylation apparaissent normaux. Tandis que l'invalidation de *Dnmt3B* engendre une létalité embryonnaire au milieu de la gestation en raison d'anomalies développementales sévères associées à une déméthylation des séquences répétées satellites mineures (Okano et al. 1999, Goll & Bestor 2005).

Des études plus récentes utilisant des invalidations de *Dnmt3A* ou *Dnmt3B* spécifiques des cellules germinales ont montré l'implication de DNMT3A dans la méthylation *de novo* des gènes à empreinte *H19*, *Dlk1-Gtl2* et l'implication de DNMT3A et 3B dans la méthylation de *Rasgrf1*. Il a également été montré dans ces travaux que DNMT3A et 3B étaient nécessaires à la méthylation de séquences répétées : DNMT3A pour les séquences de type *SINE B1*, DNMT3B pour les séquences satellites mineures et majeures, DNMT3A et 3B pour les éléments *IAPs* et *LINE-1* (Kaneda et al. 2004, Kato et al. 2007).

2.2.2 Structure et fonction de DNMT3L

- *Structure générale de la protéine :*

Le membre DNMT3L (DNMT3-like) présente de fortes homologies avec DNMT3A et 3B. Cependant, DNMT3L ne possède que la partie PHD au niveau de son domaine de régulation, tandis que le domaine PWWP n'est pas présent. Au niveau de sa région régulatrice DNMT3L possède seulement les motifs I à VIII où les résidus catalytiques clés se retrouvent mutés ou supprimés dans la plupart des motifs conservés (Hermann et al. 2004, Goll et al. 2005) (figure 20).

- *Les différentes formes de DNMT3L :*

La mise en évidence de différentes formes de *Dnmt3L* a été réalisée essentiellement sur les cellules germinales. En effet au cours de la gamétogenèse différentes formes vont être transcrites à partir de l'activation de 3 promoteurs distincts spécifiques du sexe (figure II.A.6).

La forme entière de *Dnmt3L* codante est initiée à partir d'un promoteur actif spécifiquement au niveau des prospermatogonies et du testicule périnatal, cette forme contient l'exon 9a et code pour une protéine d'environ 48 kDa (figure 25). Dès lors que les cellules germinales mâles rentrent en méïose, la transcription initiée par le premier promoteur diminue fortement voire cesse et un second promoteur situé dans l'intron 9 est activé donnant lieu à la production de trois transcrits différents (figure 25). Ces trois transcrits, plus courts et non codants, sont obtenus par un épissage alternatif utilisant un exon 9b et des exons supplémentaires 9cL ou 9cS (figure 25). Ces transcrits plus courts exprimés chez l'adulte sont suspectés de jouer un rôle dans la régulation de la production de la protéine par inhibition de la transcription ou de la traduction.

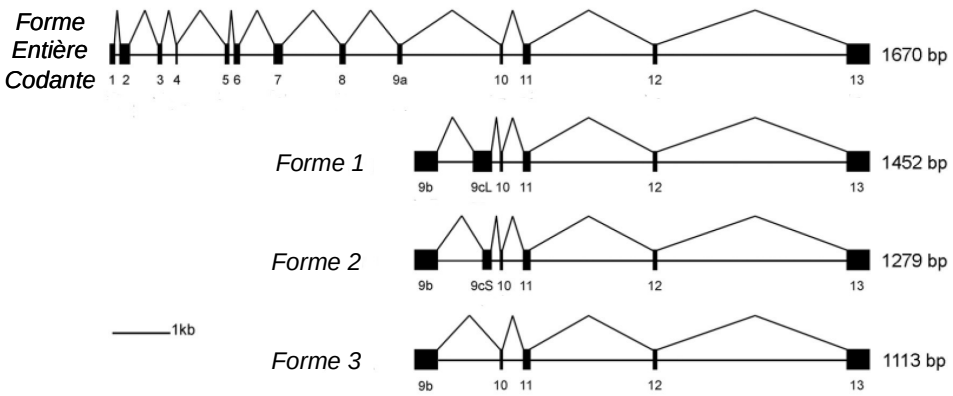


Figure 25. Les différentes formes de transcrits de Dnmt3L mises en évidence dans la gonade mâle (d'après Showlin et al. 2007)

Enfin, il a été mis en évidence au niveau de l'ovaire d'un troisième type de promoteur situé dans un intron du gène adjacent Aire. Ce promoteur donne lieu à la production d'un transcrit qui code la forme entière de la protéine DNMT3L dans l'ovocyte (Shovlin et al. 2007) (figure 26).

- *DNMT3L : cofacteur indispensable à la méthylation de novo :*

DNMT3L est particulière à deux niveaux. Tout d'abord elle ne possède de domaine catalytique donc pas d'activité méthyltransférase, d'autre part elle ne joue un rôle uniquement au cours du développement de la lignée germinale mâle (Goll & Bestor 2005, Jeltsch 2006). La fonction principale de DNMT3L est d'intervenir comme cofacteur pour stimuler l'activité de méthylation *de novo*, notamment par son interaction avec DNMT3A, 3A2 ou encore DNMT3B (Suetake et al. 2004, Rottach et al. 2009). DNMT3L possède notamment la propriété d'adresser les DNMTs de novo au niveau de l'ADN nucléosomal par l'interaction de son domaine N-terminal avec les histones H3K4 (non méthylées sur la lysine 4) (Ooi et al. 2007). Au niveau des cellules germinales l'invalidation de Dnmt3L a montré que cette protéine aurait un rôle majeur dans la méthylation de l'ensemble des séquences impliquant les ADN méthyltransferases *de novo* comme les gènes à empreintes paternelles et maternelles, les éléments transposables (Bourc'his & Bestor 2004, Goll and Bestor 2005, Kato et al. 2007, La Salle et al. 2007).

2.3 Coopération entre DNMT1, DNMT3A et DNMT3B dans l'initiation et la maintenance des patrons de méthylation

Comme nous l'avons décrit plus haut, le modèle classique de méthylation de l'ADN repose sur une action de méthylation *de novo* par DNMT3A et 3B durant la gamétogenèse et le développement précoce, tandis que DNMT1 agit au cours de la réplication pour assurer la maintenance des profils de méthylation initiés par DNMT3A et 3B. Cependant certaines données suggèrent que DNMT1, DNMT3A et DNMT3B interviendraient en collaboration pour initier et maintenir les profils de méthylation.

La fonction de DNMT1 ne peut pas être limitée à celle de méthylation de maintenance. En effet, des données obtenues in vitro suggèrent que DNMT1 pourrait collaborer avec DNMT3A dans le processus de méthylation *de novo* (Fatemi et al. 2002, Gowher et al. 2005).

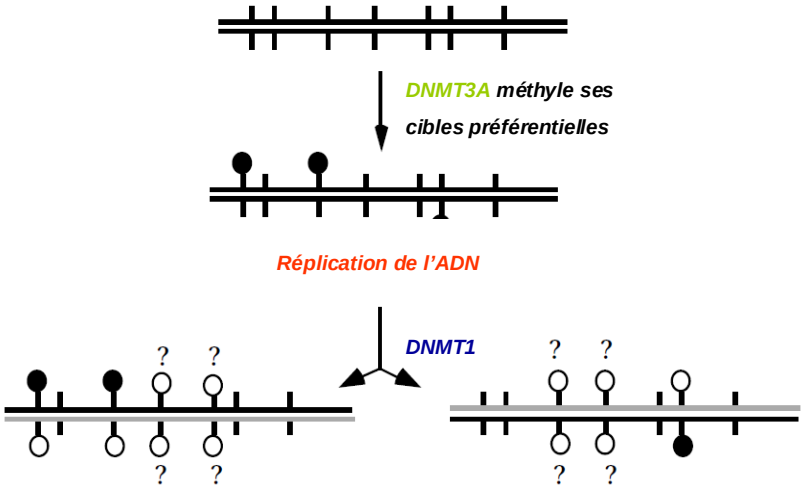


Figure 26. Modèle pour l'un des processus de méthylation de novo associant DNMT3A puis DNMT1 (d'après Hsieh, 2005) *DNMT3A initie la méthylation sur un des brins d'ADN au niveau de sites CpG spécifiques (cercles noirs). Après réplication de l'ADN, DNMT1 va méthyler l'autre brin d'ADN (cercles ouverts) au niveau des sites hémiméthylés (méthylation de maintenance). L'ADN hémiméthylé stimule également une activité de type de novo de DNMT1 pour la méthylation de sites CpG non méthylés au préalable (cercles ouverts indiqués par ?).*

Dans ce modèle, une première étape de méthylation intervient par l'action de DNMT3A au niveau de séquences cibles spécifiques sur un brin de l'ADN (figure 27). Par la suite, ces brins d'ADN hémiméthylés nouvellement formés conduiraient à la stimulation de DNMT1 pour étendre la méthylation sur les deux brins d'ADN au niveau de CpG non méthylés au préalable. Cette fonction de DNMT1 dans un processus *de novo* interviendrait en plus de sa capacité à méthyler au niveau de sites hémiméthylés au cours de la méthylation de maintenance (Fatemi et al. 2002, Hsieh 2005).

De la même façon, le rôle de DNMT3A et 3B ne peut pas être réduit à la seule méthylation *de novo.* En effet, lorsque l'on regarde la méthylation d'ADN au sein de cellules ES déficientes en DNMT3A ou 3B, on constate une augmentation de 30% du taux d'ADN méthylé sur un seul brin. Au sein de ces cellules ES on constate également une perte graduelle de méthylation au niveau des séquences répétées et des gènes soumis ou non à empreinte au cours des divisions cellulaires (Chen et al. 2003). Très récemment, Jones et al. ont proposé un nouveau modèle permettant d'intégrer l'implication de DNMT3A et DNMT3B dans la méthylation de maintenance en coopération avec DNMT1 (figure 28)(Jones & Liang 2009).

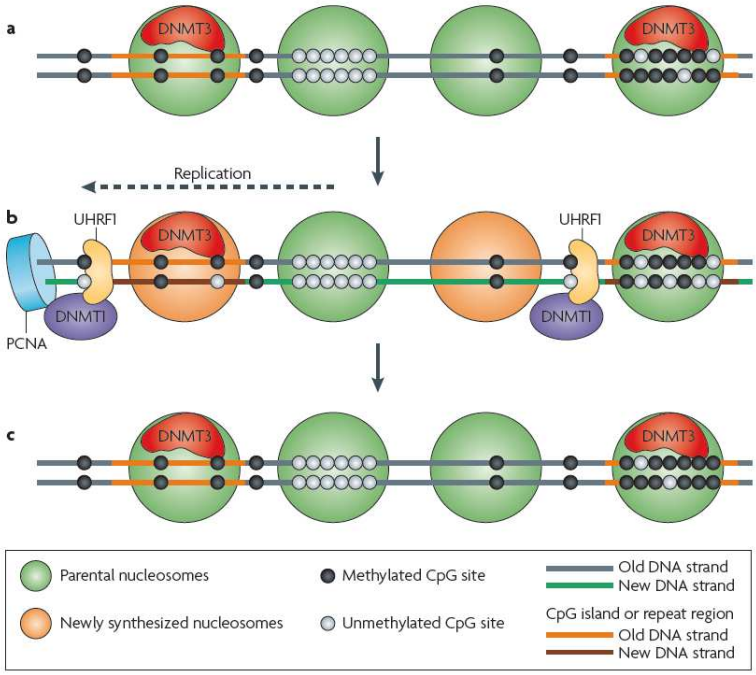


Figure 27. Modèle révisé de la maintenance des patrons de méthylation
(d'après Jones et Liang, 2009) *Dans ce modèle DNMT3A et DNMT3B agissent après la méthylation par DNMT1 pour compléter et corriger les profils de méthylation recopiés par DNMT1 au cours de la réplication.*

Dans ce modèle, DNMT1 permet la maintenance de la plupart de la méthylation de l'ADN en collaboration avec UHRF1 et PCNA. En parallèle, au sein des cellules somatiques, DNMT3A et 3B sont fixées en permanence au niveau des nucléosomes dans les régions riches en CpG et au niveau des séquences répétées. Juste après le passage de la fourche de réplication, DNMT3A et 3B agiraient alors en complétant la méthylation de l'ADN et corrigeant les erreurs laissées par DNMT1. A la différence de DNMT1, l'action des DNMT3 dans ce contexte ne nécessite pas de lecture du brin parental, elles agiraient directement en méthylant le brin d'ADN nouvellement synthétisé.

2.4 DNMT2 – Méthylation des ARNt

2.4.1 Généralités et structure de la protéine

DNMT2 est la protéine la plus largement conservée et la plus représentée parmi les eucaryotes mais également chez des organismes qui ne possèdent que ce type de DNMT comme *Drosophila Melanogaster.* La structure de DNMT2 se rapproche des méthyltransférases bactériennes (exemple, M.HhaI) notamment par l'absence de domaine N terminal de "régulation" (figure 20).

Bien que l'on retrouve une conservation des motifs catalytiques caractéristiques des DNMTs au sein de DNMT2, son activité méthyltransférase est faible et son invalidation chez la souris n'entraine pas d'anomalies particulière ni de modification dans les taux de méthylation au niveau de l'ADN (Okano et al. 1998, Dean et al. 2005). Par ailleurs, une étude réalisée à partir de protéine DNMT2 recombinante humaine a permis de montrer une activité résiduelle de méthylation de l'ADN avec peu ou sans spécificité de séquence (Hermann et al. 2003). L'explication de la faible activité méthyltransférase de DNMT2 pourrait venir en partie de la nécessité d'un cofacteur particulier mais également de la présence d'un résidu tyrosine dans son Target Recognition Domain, il semble donc que DNMT2 possède d'autres fonctions que la méthylation de l'ADN (Schaefer & Lyko 2009).

Le transcrit de DNMT2 est exprimé à des taux relativement faibles dans l'ensemble des tissus adultes chez l'homme ou encore la souris, on en retrouve également dans les cellules souches embryonnaires murines. Aussi, il a été mis en évidence une expression plus forte de DNMT2 dans certaines lignées cancéreuses (Hermann et al. 2004).

2.4.2 Rôle particulier de DNMT2 dans la méthylation des ARNt

DNMT2 possède une activité majeure de méthylation des ARN de transfert (ARNt) dont le mécanisme ressemble à celui utilisé par lors de la méthylation de l'ADN (Goll et al. 2006). Cette activité a notamment été mise en évidence sur la cytosine 38 de l'ARN de transfert de l'acide aspartique. Ceci fait de DNMT2 plus une ARN méthyltransférase qu'une ADN méthyltransférase. Le mécanisme de méthylation des ARN de transfert étant impliqué dans leur stabilité, une altération de ce processus peut avoir des conséquences sur le taux et la fidélité de la synthèse protéique.

Une suppression de DNMT2 au niveau de cellules souches embryonnaires n'entraine pas de phénotype particulier et les souris invalidées pour le gène Dnmt2 sont viables et présentent une fertilité normale (Goll et al. 2006). Cependant, l'utilisation de l'azacytidine, inhibiteur global de DNMTs, entraine une déméthylation des ARNt faisant chuter l'activité métabolique de cellules cancéreuses humaines. Ceci permet ainsi de suggérer d'éventuelles implications de DNMT2 dans les voies de signalisation du cancer via son activité de méthylation des ARNt (Schaefer & Lyko 2009).

3 *Implications et dynamique de la méthylation de l'ADN*

La méthylation de l'ADN est un processus clé au cours de processus biologiques majeurs comme : la régulation de l'expression des gènes, la mise en place de l'empreinte génomique parentale, l'inactivation du chromosome X chez la femelle ou encore l'inactivation des éléments transposables. Ces processus biologiques impliquant la méthylation de l'ADN suivent une dynamique particulière au cours de la gamétogenèse et du développement embryonnaire précoce.

3.1 Implication de la méthylation de l'ADN dans la régulation d'expression des gènes

Deux modèles sont classiquement admis pour la régulation d'expression des gènes par méthylation de l'ADN.

Le premier modèle repose sur l'inhibition directe de la liaison d'activateur de transcription (ex. facteurs de transcription) au niveau des régions régulatrices des gènes après méthylation (figure 29). Aussi des facteurs de transcription comme AP-2, cMyc, CREB, E2F et NFκB ont été montré comme sensible à la méthylation empêchant leur liaison au niveau du promoteur des gènes (Sulewska et al. 2007). On peut également prendre l'exemple de la méthylation au niveau de la région régulatrice du locus *H19/Igf2* qui empêche la liaison directe de l'activateur transcriptionnel *CTCF*.

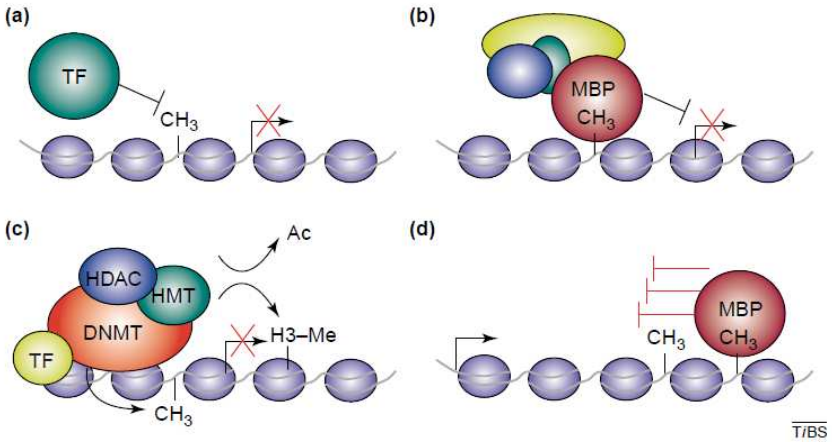


Figure 28. Modèles de répression transcriptionnelle par méthylation de l'ADN
(d'après Klose & Bird, 2006) (a) *Les groupements CH3 au niveau du promoteur empêchent la liaison de facteurs de transcription,* ***(b)*** *Les methyl-CpG-binding proteins (MBDs) reconnaissent les groupements CH3 et recrutent des co-répresseurs afin d'inhiber la transcription en modifiant la chromatine,* ***(c)*** *En plus de leur activité ADN méthyltransférase les DNMTs peuvent se lier aux histone déacétylases et méthyltransférases permettant ainsi de coupler méthylation de l'ADN et modifications des histones,* ***(d)*** *La reconnaisance par les MBDs de groupements CH3 au sein des gènes et la modification locale de la chromatine peut également inhiber la progression de la machinerie de transcription.*

Le second modèle repose sur une "lecture" des séquences d'ADN méthylées par des Methyl Binding Proteins (MBPs) qui recrutent des co-répresseurs transcriptionnels au niveau des sites méthylés afin d'éteindre la transcription des gènes (figure 29) (Klose & Bird 2006). A ce jour trois familles de MBPs ont été décrites : les Methyl-CpG Binding Domain (MBDs), les UHRF et la famille Kaiso. Afin d'inhiber la transcription, les protéines MBPs peuvent recruter des protéines de modification des histones comme les Histones Déacétylases (HDACs), les Histones Methyltransferases (HMTs) et certains complexes de remodelage de la chromatine.

Parmi la famille MBDs les membres MBD1, 2 et 3 peuvent lier les HDACs et certains complèxes de remodelage du nucléosome comme MeCP1 et NuRD. MBD1 peut également se lier à l'histone méthyltransférase SetDB1. La capacité de liaison des MBDs à de tels facteurs permet d'étendre l'état de répression de la transcription initié par la méthylation de l'ADN à l'ensemble de la chromatine (figure 30) (Klose & Bird 2006).

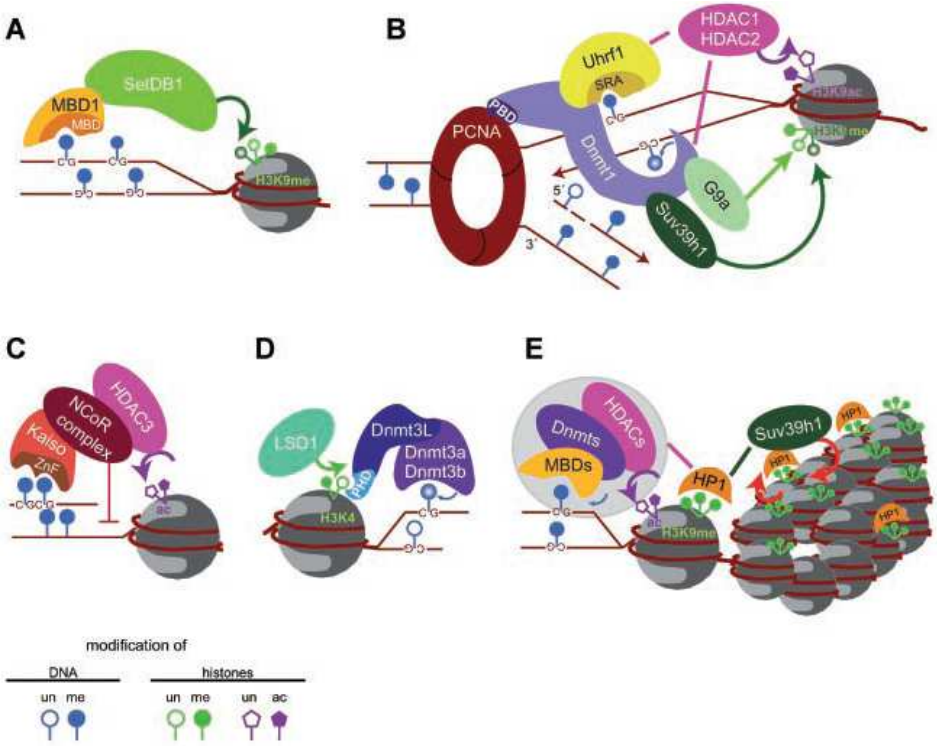


Figure 29. Lien entre la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones et la structure de la chromatine (d'après Rottach et al. 2009).

Cependant, les MBDs ne sont pas les seuls facteurs à intervenir pour faire ce lien entre la méthylation des CpG et l'extinction d'expression des gènes (figure 30). Les protéines UHRF1 et 2 peuvent par exemple reconnaître l'ADN méthylé via leur domaine SRA et recruter d'autres facteurs de remodelage de la chromatine comme l'HMT G9a et HDAC1. D'autre part, UHRF1 permet de cibler DNMT1 au niveau des sites méthylés de façon assymétriques pour permettre la méthylation du brin complémentaire lors de la réplication (Rottach et al. 2009).

De plus, les protéines de la famille Kaiso grâce à leur domaine en doigt de Zinc peuvent reconnaître deux CpG méthylés consécutifs afin de recruter le complexe NCoR contenant des protéines possédant les activités de type HDAC et de remodelage de la chromatine ce qui permet d'amplifier l'inhibition de transcription en modifiant l'ensemble de la chromatine au niveau de la région ciblée par la méthylation des CpG (R. Klose & A. Bird 2006).

Outre leur activité catalytique de méthylation de l'ADN, les DNMTs peuvent intervenir directement dans l'extinction de l'expression des gènes en interagissant et recrutant d'autres facteurs de remodelage de la chromatine comme SNF2H (intervenant

dans le remodelage de la chromatine ATP-dépendant), certaines histones méthyltransférases (Suv39h1, SetDB1 et G9a), le complexe Polycomb PRC2 et l'Heterochromatin Protein 1 (HP1)(Rottach et al. 2009).

3.2 L'empreinte génomique parentale

L'empreinte génomique consiste en l'expression spécifique d'un gène à partir d'un seul allèle en fonction de son origine maternelle ou paternelle.

Cette empreinte génomique parentale est mise en place au cours de la gamétogenèse dans les deux sexes principalement par la méthylation de l'ADN au niveau de régions régulatrices appelées Imprinting Control Region (ICRs) ou Differencially Methylated Domain (DMD)(figure 31)(Bartolomei 2009). La méthylation de l'ADN au niveau des gènes à empreinte paternelle commence chez la souris à 15,5 jours embryonnaires au niveau des cellules germinales primordiales pour n'être complète qu'au stade pachytène de la méiose tandis que, la méthylation des gènes à empreinte maternelle au niveau de l'ovocyte se déroule durant la vie post-natale avant l'ovulation. Ainsi, les gènes soumis à empreinte portent une marque épigénétique (méthylation de l'ADN associée à des modifications des histones) caractéristique de leur origine parentale de telle sorte qu'un des allèles parentaux est exprimé tandis que l'autre est réprimé.

Actuellement, il a été recensé environ 100 gènes à empreinte chez la souris qui sont pour la majorité conservés chez l'homme, et ces gènes sont le plus souvent regroupés en clusters permettant le contrôle de leur expression à partir d'une ICR. La plupart des ICRs sont méthylées sur l'allèle maternel (ex. *Igf2R*, *Snrpn*) tandis que trois locus à empreinte paternelle ont été mis en évidence : *H19-Igf2*, *Dlk1-Gtl2* et *Rasgrf1* (Bartolomei 2009). L'acquisition de l'empreinte paternelle repose sur l'action de DNMT3A tandis que l'empreinte maternelle nécessite l'activité DNMT3A et de son cofacteur DNMT3L (Kato et al. 2007, Bourc'his et al. 2001). Il existe une exception pour le gène *Rasgrf1* qui requiert également l'action de DNMT3B (Kato et al. 2007).

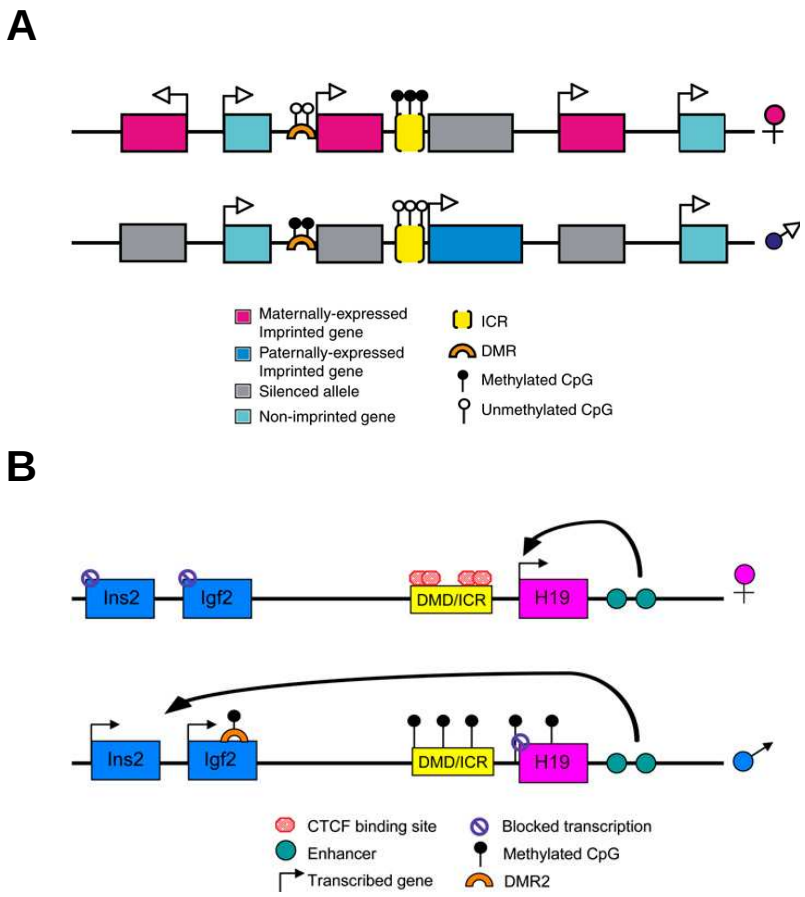


Figure 30. L'empreinte génomique parentale chez la souris
(d'après Bartolomei 2009) (A) *Représentation schématique d'un cluster de gènes à empreinte. Le cluster contient des gènes exprimés à partir de l'allèle maternel (rectangles roses), de l'allèle paternel (rectangles bleus) et des gènes exprimés à partir des 2 allèles non soumis à empreinte (rectangles bleus clairs). Les Imprinting Control Region (ICR, rectangles jaunes) contrôlent l'empreinte d'un certain nombre de gènes de la région. Ces clusters à empreinte peuvent contenir également des Differencially Methylated Region (DMR, rectangles jaunes) qui acquièrent leur méthylation après le stade préimplantatoire,* ***(B)*** *Exemple de régulation au niveau du locus H19/Igf2. Le gène H19 s'exprime à partir de l'allèle maternel tandis que le gène Igf2 s'exprime à partir de l'allèle paternel. Sur le chromosome maternel, la région ICR non méthylée fixe le facteur CTCF ce qui permet de constituer un élément insulateur empêchant l'activation de Igf2 mais autorisant l'activation de H19 par des enhancers. Sur le chromosome paternel, la présence de méthylation au niveau de l'ICR empêche la liaison de CTCF, ce qui permet l'activation de Igf2 par les enhancers en aval de H19.*

De même, il a été mis en évidence l'implication d'autres facteurs comme BORIS/CTCFL (Brother Of the Regulator of Imprinted Sites) dans l'acquisition de l'empreinte paternelle favorisant l'action de DNMT3A et 3B au niveau de sites spécifiques.

Il est également important de noter que les marques épigénétiques situées au niveau des gènes à empreinte ne sont pas soumises à la vague de reprogrammation du génome qui intervient juste après la fécondation. Même si l'ensemble des facteurs impliqués dans la maintenance des empreintes au cours de l'embryogenèse précoce ne sont pas encore bien connus, le rôle de DNMT1 (DNMT1o et DNMT1s) est primordial afin de transmettre

l'empreinte au cours de la réplication de l'ADN. D'autre part, il semblerait qu'un certain nombre de protéines interviennent pour protéger ces séquences de la déméthylation massive tels que MBD3 appartenant au complexe NuRD (maintien de l'empreinte paternelle de *H19*), ou bien encore d'autres facteurs comme ZFP57 (maintien des empreintes au niveau de *Peg1*, *Peg3*, *Peg5* et *Dlk1*), RBBP1/ARID4A et RBBP1L1/ARID4B (maintien de l'empreinte au niveau du locus *Snrpn*) ou encore la protéine STELLA (Bartolomei 2009).

En définitive, le contrôle de l'expression des gènes à empreinte est indispensable puisqu'ils sont notamment impliqués dans le développement, la croissance du fœtus et du placenta mais semblent également impliqués dans certains processus durant la vie post-natale. Le rôle primordial de l'empreinte génomique parentale est démontré notamment par les anomalies de méthylation de ces gènes dans l'étiologie de nombreux syndromes pathologiques comme les syndromes de Beckwith-Weidemann ou de Silver-Russel qui sont fortement associés à une anomalie d'empreinte au niveau de *H19-Igf2* (Ideraabdullah et al. 2008).

3.3 L'inactivation du chromosome X

Chez les mammifères, la différence de nombre de chromosome X entre mâle et femelle implique un phénomène de compensation de dose afin d'ajuster la dose des gènes liés au chromosome X.

Il existe donc chez la femelle (chez les mammifères) un phénomène aléatoire contribuant à rendre silencieux l'un des deux chromosomes X au cours du développement précoce. L'inactivation du X est initiée à partir d'un locus agissant en *cis* appelé X-Inactivation Center (XIC) qui comporte le gène *Xist* (X-inactive specific transcript) codant pour un ARN non codant et un transcrit antisens appelé *Tsix*. Le X-Inactivation Center permet de "compter" le nombre de chromosomes X par un mécanisme qui n'est pas encore bien connu et autorise alors la production de l'ARN non codant Xist à partir du chromosome X à inactiver afin de stimuler l'extinction en *cis* (Kim et al. 2009). Le gène Xist du chromosme X actif est quand à lui inhibé par méthylation de l'ADN (Wutz & Gribnau 2007). D'autre part, l'expression de l'ARN Xist est régulée par la production de l'antisens Tsix. Une fois transcrit, l'ARN Xist vient alors se déposer progressivement le long du chromosome X à inactiver. Par la suite, l'extinction du chromosome X initiée par l'ARN Xist est accompagnée d'une série de

modifications épigénétiques impliquant les complexes Polycomb (PcG complex), les histones déacétylases et méthyltransférases, et les ADN méthyltransférases afin de stabiliser cet état silencieux au cours des divisions cellulaires (Wutz & Gribnau 2007). Ainsi, il a été mis en évidence au cours de cette inactivation du X une hypoacétylation de l'histone H4, une accumulation de triméthylation au niveau des lysines 9 et 27 au niveau de l'histone H3, une accumulation du variant d'histone macroH2A qui s'accompagnent de la mise en place de méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes présents (Kim et al. 2009). En outre, l'étude des embryons déficients pour DNMT1 a permis de montrer que la méthylation de l'ADN était indispensable pour le maintien de l'extinction au niveau du chromosome X inactif (Sado et al. 2000).

3.4 L'inactivation des éléments transposables

Les éléments transposables sont des éléments d'ADN parasites du génome qui peuvent être mobiles. Lorsqu'ils sont actifs, ces éléments transposables peuvent être source de mutations par insertion au niveau du promoteur ou de la séquence codante des gènes, mais également causer des cassures chromosomiques, des recombinaisons aléatoires et des réarrangements du génome (Slotkin & Martienssen 2007). Par ailleurs, ces éléments transposables peuvent influencer le comportement des gènes aux alentours en agissant tels des promoteurs alternatifs ou des enhancers (Kim et al. 2009).

Afin d'empêcher et de minimiser les effets néfastes induits par l'activation des éléments transposables, le génome à mis en place des mécanismes de défense reposant sur des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN et modifications des histones) afin de supprimer leur activité. En conséquence, la méthylation de l'ADN joue un rôle crucial dans l'inactivation des transposons et rétrotransposons au cours du développement préimplantatoire et des cellules germinales.

Dans ce processus DNMT1 semble avoir un rôle très important dans le maintien de la méthylation au niveau des éléments transposables. Ainsi l'inactivation de DNMT1 au sein de cellules ES entraine la déméthylation des éléments *MLV* (Murine Leukemia Virus), *IAP* (Intracisternal A Particle), *MusD* et *LINE-1* (Long Interspersed Elements 1). La forme DNMT1s serait très importante pour maintenir la méthylation des éléments transposables au cours de la phase de développement préimplantatoire. En effet, chez les embryons DNMT1 KO ou

encore l'inactivation par ARN interférent de DNMT1s au sein de l'embryon de souris induit une déméthylation, la réactivation et la production de transcrits à partir des éléments de type IAP (Maksakova, Mager, and Reiss 2008, Kim, Samaranayake, and Pradhan 2009).

DNMT3A et 3B jouent également un rôle dans la méthylation des éléments transposables. Par exemple, les embryons déficients en DNMT3B ne se développent pas à terme et présentent une déméthylation des éléments *IAP* et *MLV*. D'autre part, la double invalidation de DNMT3A et 3B au sein de cellules ES ou dans les embryons entraine une légère déméthylation des éléments *IAP*, *MLV* et *MusD*. La culture prolongée de cellules ES déficientes en DNMT3A et 3B engendre la perte massive de méthylation au niveau des séquences *IAP* et MLV indiquant que DNMT1 ne serait pas suffisante pour la maintenance de méthylation de ces séquences (Maksakova et al. 2008). Enfin, les études sur l'invalidation conditionnelle de *Dnmt3A* et *3B* dans les cellules germinales ont montré le rôle de DNMT3A dans la méthylation des séquences *SINE B1*, et de DNMT3A/3B dans la méthylation de séquences *IAP* et *LINE-1* (39, 40).

DNMT3L joue un rôle majeur, en collaboration avec DNMT3A ou DNMT3A2, dans l'établissement de la méthylation des éléments transposables au sein des cellules germinales mâles préméïotiques. Ainsi, chez les mâles déficients en DNMT3L on observe une déméthylation massive et une réactivation des rétrotransposons comme les *IAP* et *LINE-1* (Bourc'his & Bestor 2004, Kato et al. 2007, Maksakova et al. 2008).

3.5 La méthylation de l'ADN : un processus dynamique

La méthylation de l'ADN suit une dynamique marquée par deux périodes clés : la gamétogenèse et le développement embryonnaire précoce.

3.5.1 Au cours de la gamétogenèse : effacement et réécriture des patrons de méthylation

Chez la souris, au cours de la gamétogenèse précoce on observe un phénomène déméthylation globale (effacement) au niveau du génome des CGPs suivie d'un phénomène de reméthylation (réécriture) au niveau des lignées germinales mâles ou femelle (figure 32).

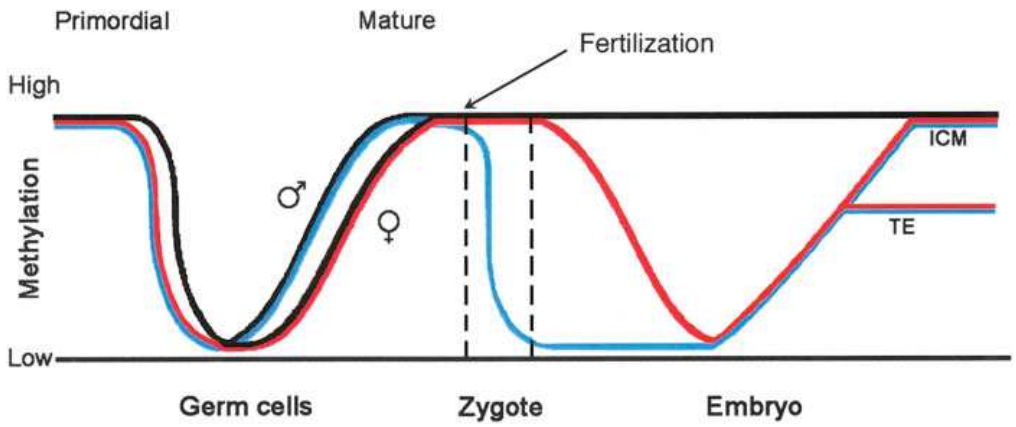


Figure 31. Les cycles de reprogrammation du génome via la méthylation de l'ADN
(d'après Dean et al. 2005) *La figure présente les niveaux de méthylation de l'ADN dans les gamètes en formation et après la fécondation pendant le développement embryonnaire précoce : au niveau des gènes à empreinte dans la lignée germinale (courbe en noir), au niveau des gamètes mâles (courbe en bleu) et femelle (courbe en rouge).*

La déméthylation se fait au cours de la phase de colonisation des crêtes génitales par les CGPs (figures 32 et 33). Elle débute aux alentours de 10,5-11,5 jpc, et à 12,5 jpc l'effacement des patrons de méthylation est maximal se traduisant dans les deux sexes par la déméthylation de la plupart des séquences génomiques dont les séquences soumises à empreintes parentales, les gènes sur le chromosme X inactif et les séquences répétées (ex. éléments transposables *LINE-1* et *IAPs*, séquences satellites mineures) (Dean et al. 2005, Swales & Spears 2005, Lees-Murdock & Walsh 2008).

Par la suite un phénomène de reméthylation de l'ADN au niveau du génome et en particulier des séquences soumises à empreinte se met en place en fonction du sexe de l'individu (figures 32 et 33) :

(1) Dans la lignée germinale mâle, la reméthylation du génome débute durant la vie fœtale au niveau des cellules gonocytes quiescents et se poursuit après la naissance dans les cellules germinales mitotiques et méiotique pour n'être totale qu'au stade pachytène de méiose (Trasler 2009). Nous reviendrons plus loin sur les spécificités de la méthylation de l'ADN au cours de la gamétogenèse mâle.

(2) Dans la lignée germinale femelle acquiert ses profils de méthylation après la naissance au niveau des ovocytes en croissance après le stade pachytène de méiose I (Dean et al. 2005).

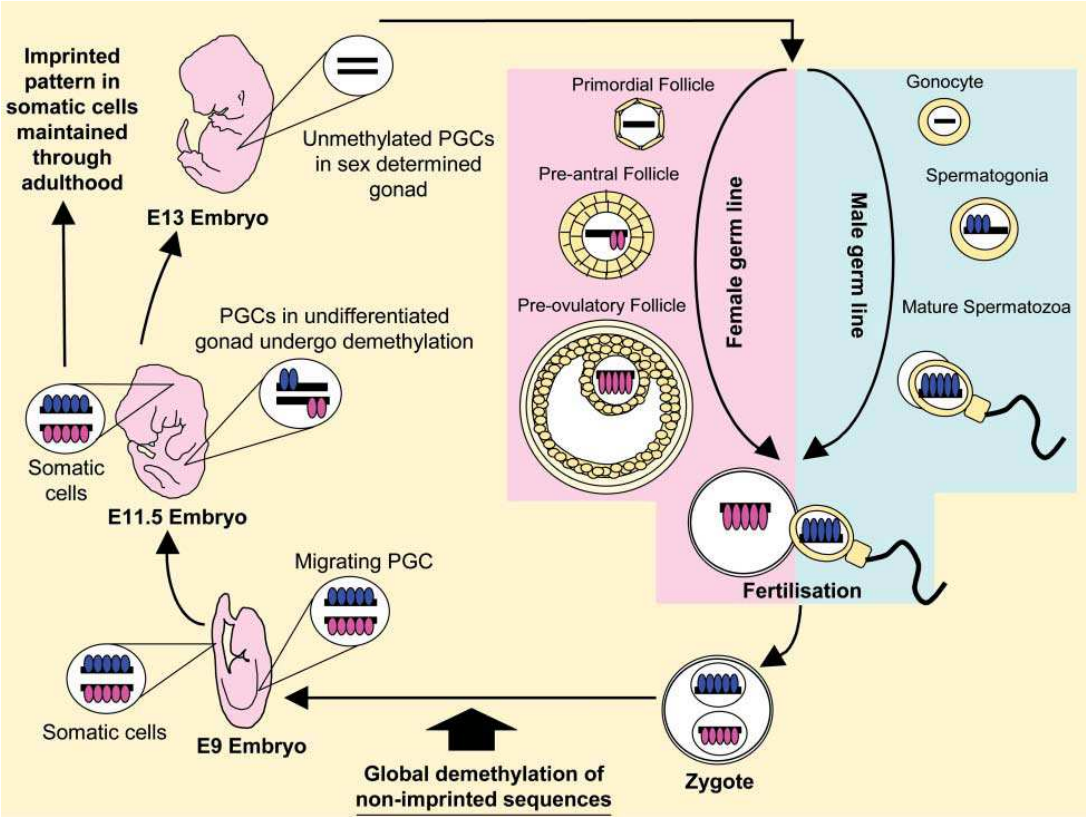


Figure 32. Les deux vagues de méthylation au cours de la gamétogenèse et du développement embryonnaire précoce chez la souris
(d'après Swales & Spears, 2005).

3.5.2 La deuxième vague de méthylation : le développement embryonnaire précoce

Après la fécondation, on assiste de nouveau à une phase de déméthylation du génome avant la fusion des pronucléi (Swales & Spears 2005). Cette phase de déméthylation intervient durant le stade préimplantatoire chez la souris (figure 33).

(1) Au niveau du pronucléus mâle on observe une déméthylation très rapide du génome par des processus actifs. Les enzymes impliquées dans ce processus ne sont pas encore bien identifiées.

(2) Au niveau du pronucléus femelle la déméthylation du génome est lente par un mécanisme passif lors des divisions successives en absence d'activité de méthylation de maintenance au cours de la réplication de l'ADN (exclusion de DNMT1 hors du noyau).

Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, les gènes soumis à empreinte ou encore certains éléments transposables comme les *IAPs* sont protégés de la déméthylation au cours du développement embryonnaire précoce

Puis après l'implantation, on observe progressivement une reméthylation globale du génome lorsque se différencient les deux premiers lignages embryonnaires (masse cellulaire interne et trophectoderme)(Dean et al. 2005).

4 Régulation de l'expression et de l'activité des DNMTs

Etant donné que la méthylation de l'ADN ne se fait pas de façon aléatoire au niveau du génome, ce processus requiert une régulation fine afin de pouvoir initier et maintenir les profils de méthylation au bon endroit et au bon moment. Il existe ainsi deux niveaux de régulation de la méthylation de l'ADN : (1) une régulation directement sur l'expression des DNMTs et, (2) une régulation au niveau de l'activité de méthylation.

4.1 Régulation par des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription SP1 et SP3 ont été identifiés comme des régulateurs de l'expression de *DNMT3A* et *DNMT3B* dans des lignées humaines. Il a par exemple été mis en évidence de nombreux sites de liaison de SP1 au niveau du promoteur de *DNMT3A* et *DNMT3B*, la surexpression de SP1 ou SP3 augmente l'activité des promoteurs respectifs de ces deux gènes et il a également été démontré une interaction physique de SP1 et SP3 au niveau de leurs promoteurs (Jinawath et al. 2005). Cependant, d'après ces mêmes travaux, il semble que SP3 ait un rôle plus important dans la régulation de l'expression de *DNMT3A* et *DNMT3B* étant donné que la surexpression de SP1 dans les lignées cellulaires n'a pas un effet marqué sur le taux de transcrits de ces deux DNMTs. Sur le même principe, des auteurs ont montré la potentielle implication de SP1 et SP3 dans la régulation de l'expression de *Dnmt1* chez la souris (Kishikawa et al. 2002). Le tableau 2 présente quelques exemples de facteurs de transcription ayant été démontrés comme régulateur d'expression des DNMTs.

Facteur de transcription	*Gène de DNMT ciblé*	*Espèce*	*Références bibliographiques*
SP3, (SP1)	*DNMT3A, DNMT3B*	Homme	(Jinawath et al. 2005)
SP1, SP3	*Dnmt1*	Souris	(Kishikawa et al. 2002)
VEZF1	*Dnmt3B*	Souris	(Gowher et al. 2008)
AP-1	*DNMT1*	Homme	(Tsai et al. 2006)
STAT3	*DNMT1*	Homme	(Zhang et al. 2006)
HOXB3	*DNMT3B*	Homme	(Palakurthy et al. 2009)
E2F1	*DNMT1*	Homme	(McCabe et al. 2005)
E2F1	*Dnmt1*	Souris	(McCabe et al. 2005)

Tableau 2. Quelques exemples de facteurs de transcription régulant l'expression des gènes DNMTs

4.2 Régulation par les microRNAs

Une autre voie possible pour la régulation d'expression des DNMTs est la voie des microARNs. Les microARNs vont réguler les DNMTs en dégradant leur transcrits et/ou en inhibant leur traduction.

L'une des familles très bien caractérisée quand à sa capacité de régulation d'expression des DNMTs est la famille miR-29. En effet, il a été montré par l'équipe de Croce qu'au niveau de cellules de cancer du poumon miR-29a, b et c pouvaient stimuler la dégradation de transcrits de DNMT3A et 3B associée à une diminution du taux de ces deux protéines (Fabbri et al. 2007a). De même, les auteurs on démontré au sein de cellules de leucémie myéloïde chronique le rôle direct de miR-29b dans le contrôle d'expression des transcrits et protéines de DNMT3A et 3B, ainsi qu'un rôle indirect sur la transcription de *DNMT1* via le contrôle du facteur de transcription SP1 (Garzon, Liu, et al. 2009), (Griffiths & Gore 2009). Dans une étude récente chez la souris, des travaux portant sur les cellules fœtales de la lignée germinale femelle ont permis de mettre en évidence la conservation du mécanisme d'inhibition d'expression de *Dnmt3A* et *3B* ciblées le microARN miR-29b (Takada et al. 2009). Un certain nombre d'autres travaux ont permis de mettre en évidence le contrôle direct ou indirect de certains microARNs sur les DNMTs et sont présentés dans le tableau 3.

MicroARN(s)	*DNMT(s) ciblée(s)*	*Espèce, type de tissu*	*Régulation directe ou indirecte*	*Références bibliographiques*
miR-29a, miR-29b, miR-29c	DNMT3A DNMT3B	Homme, lignée et tissu cancer du poumon	Effet direct	(Fabbri et al. 2007b)
miR-29b	DNMT3A DNMT3B	Homme, lignées et biopsies leucémies myéloïdes chroniques	Effet direct	(Garzon, Liu, et al. 2009)
miR-29b	DNMT1	Homme, lignées et biopsies leucémies myéloïdes chroniques	Effet indirect via activateur SP1	(Garzon, Liu, et al. 2009)
miR-29b	Dnmt3A Dnmt3B	Souris, cellules germinales primordiales femelle et cellules NIH3T3	Effet direct	(Takada et al. 2009)
miR-143	DNMT3A	Homme, lignée et biopsies cancer colorectal	Effet direct	(Ng et al. 2009)
miR-148	DNMT3B	Homme, diverses lignées cellulaires	Effet direct	(Duursma et al. 2008)
miR-290s	Dnmt3A Dnmt3B Dnmt1	Souris, cellules ES	Effet indirect via répresseur Rbl2	(Sinkkonen et al. 2008)
miR-290s	Dnmt3A Dnmt3B Dnmt1	Souris	Effet indirect via répresseur Rbl2	(Benetti et al. 2008)

Tableau 3. Les microRNAs impliqués dans la régulation d'expression des DNMTs

4.3 Régulation par méthylation de l'ADN au niveau des gènes des DNMTs

L'une de possibilités de régulation de l'expression des DNMTs peut également être une régulation par méthylation propre des gènes de DNMTs. Dans ce contexte Hu et al. ont démontré chez la souris l'existence, au cours du développement embryonnaire, d'une boucle d'autorégulation de l'expression de *Dnmt3L* par méthylation de son promoteur impliquant l'activité de novo de DNMT3A, 3B et de DNMT3L en tant que cofacteur (Hu et al. 2008). Un autre travail a caractérisé la régulation de *DNMT3L* par méthylation dans les cancers cervicaux, ainsi par l'analyse sur des biopsies et des lignées cellulaires il a été mis en évidence une corrélation entre le taux de méthylation du promoteur et le niveau d'expression de DNMT3L (Gokul et al. 2007). Chez l'homme, un travail sur des tumeurs germinales testiculaires à fait ressortir que le gène DNMT3A pouvait être régulé par méthylation au niveau de régions introniques dans sa séquence pouvant contribuer ainsi à la régulation de son expression (Ishii et al. 2007). Enfin, l'analyse des promoteurs des gènes

DNMT3A et 3B chez l'homme, montre qu'ils possèdent des régions riches en CpG suggérant la possibilité d'une extinction d'expression par méthylation de l'ADN (Yanagisawa et al. 2002).

4.4 Les facteurs régulant l'activité des DNMTs

En ce qui concerne la régulation de l'activité de méthylation des DNMTs divers facteurs peuvent intervenir. Chaque jour, un nombre important de publications décrivent de nouveaux mécanismes de régulation de l'activité de méthylation. De manière simplifiée, ces facteurs interviennent :

(1) En liant et ciblant les DNMTs au niveau des sites à méthyler, cette action sera effectuée par des cofacteurs (ex. DNMT3L) et adaptateurs (ex. UHRF1),

(2) En régulant l'accessibilité des DNMTs au niveau des sites à méthyler par des remaniements des histones et du nucléosome, ceci impliquera l'action de facteurs agissant sur la chromatine en méthylant les histones (ex. Suv39H1 et H2), ou modulant la chromatine par des processus ATP dépendants (ex. ATRX).

5 La déméthylation de l'ADN

5.1 Implication de la déméthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un processus réversible qui peut soit impliquer une déméthylation passive au cours de la réplication ou une déméthylation active. Comme cela a déjà été mentionné plus haut, au cours du développement précoce juste après la fécondation il existe une phase de déméthylation rapide du pronucléus mâle. Etant donné que la déméthylation passive se fait normalement au cours des cycles de réplication cellulaires, la déméthylation rapide observée dans ce cas implique nécessairement l'intervention de mécanismes actifs (Abdalla et al. 2009).

La déméthylation de l'ADN semble également intervenir dans d'autres processus comme dans la neurogenèse (déméthylation au niveau de *Bdnf* et *Fgf-1*), au cours de la réponse immunitaire (déméthylation au niveau d'*IL-2* et *IFN-γ*) mais également au cours du

processus de tumorigenèse où l'on observe très fréquemment une déméthylation globale du génome (Zhu 2009).

5.2 Mécanismes potentiels de déméthylation de l'ADN

5.2.1 Les 5-methylcytosine glycosylases

Dans ce mécanisme une activité DNA glycosylase, vraisemblablement par une thymine DNA glycosylase ou la methyl CpG binding protein MBD4, initie une réparation par excision de bases au niveau de l'ADN en clivant le pont entre la base 5-methylcystosine et le desoxyribose ce qui cré un site abasique AP (figure 34). Ensuite une endonucléase AP enlève le désoxyribose et le trou est remplacé par une ADN polymérase et une ADN ligase (Zhu 2009). Ceci permet de remplacer une cystosine méthylée par une cytosine.

5.2.2 Mécanisme d'hydrolyse par MBD2

Un autre mécanisme possible est l'hydrolyse des groupements methyls par la methyl CpG binding protein MBD2 ce qui entraine le remplacement du CH3 par un atome d'hydrogène (figure 34). Pour l'instant ce mécanisme reste controversé étant donné qu'un seul groupe à mis en évidence cette activité (Detich et al. 2002).

5.2.3 Déamination des 5-methylcytosines couplée à la réparation des mésappariements G/T

Ce processus implique la déamination des 5-methylcytosines en thymine, puis des ADN glycosylases réparent le mésappariement entre la thymine et la guanine qui lui fait face (figure 34). Les enzymes impliquées dans ce mécanisme appartiennent probablement à la famille des cytidines déaminases AID/APOBEC-1 (Activation Induced Deaminase/Apolipoprotein B RNA-editing catalytic component-1) (Zhu 2009).

5.2.4 La déméthylation oxidative

La déméthylation de l'ADN pourrait également survenir par un mécanisme de déméthylation oxidative faisant intervenir des oxydases ciblant spécifiquement les 5-methylcytosines (figure 34), mais à ce jour ce type d'enzyme n'a pas encore été identifié chez les mammifères. La conversion des 5-methylcytosines par oxidation en 5-

hydroxylmethylcytosine (réalisée par l'enzyme TET1) pourrait également permettre une déméthylation passive puisqu'elles ne sont pas reconnues par DNMT1 (Zhu 2009).

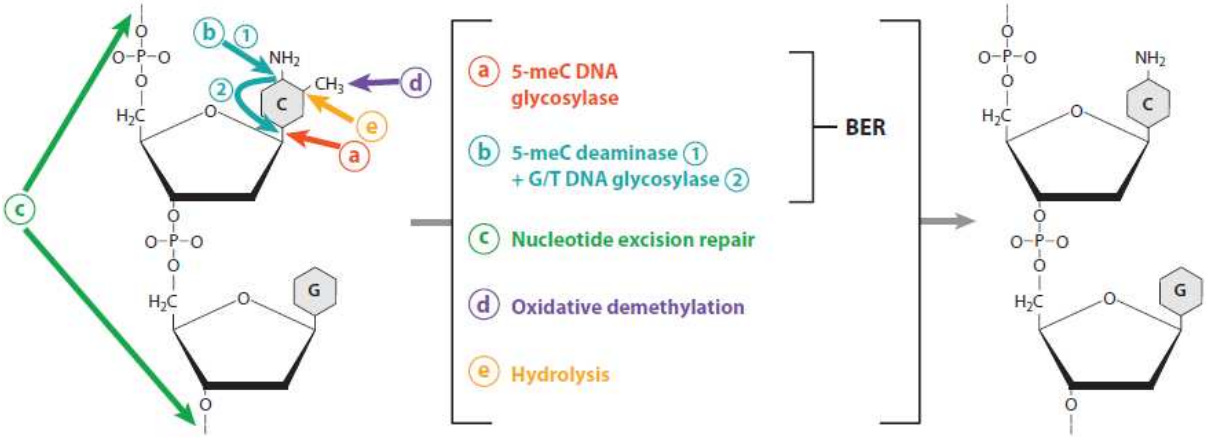


Figure 33. Les mécanismes potentiels pour la déméthylation de l'ADN chez les mammifères (d'après Zhu 2009)

6 *La méthylation de l'ADN et les ADN méthyltransférases dans le testicule et la spermatogenèse*

L'étude d'expression des gènes/protéines correspondant aux DNMTs au niveau testiculaire a permis de mettre en évidence une régulation très fine de ces enzymes au cours de la maturation des cellules testiculaires chez la souris et chez l'homme. Nous allons décrire ici la localisation et l'expression spécifique de chacune des DNMTs au niveau du testicule fœtal puis adulte. Cette localisation et expression des DNMTs au niveau testiculaire aura notamment des répercussions sur la dynamique et les spécificités de la méthylation de l'ADN au cours de la gamétogenèse mâle.

6.1 Expression dynamique des différentes DNMTs dans le testicule et durant la maturation des cellules germinales

6.1.1 DNMT1 dans le testicule fœtal et adulte

- *Chez la souris :*

Dans le testicule fœtal chez la souris l'expression de la protéine DNMT1 est retrouvée dans les CGP à 11,5 jours embryonnaires et dans les cellules somatiques, puis dans les gonocytes en mitose au sein des cordons testiculaires l'expression de DNMT1 est élevée jusqu'à 13,5-14,5 jours embryonnaires. A 18,5 jours, alors que la différenciation sexuelle est

achevée, DNMT1 n'est plus exprimé dans les cellules germinales, au contraire, les cellules de Sertoli expriment fortement DNMT1 à ce stade. A la naissance seules les cellules de Sertoli et les cellules interstitielles expriment DNMT1 et il faut attendre 3-6 jours post-natals que les cellules germinales reprennent leur activité mitotique pour retrouver une expression de DNMT1 au niveau des prospermatogonies (Sakai et al. 2001, La Salle et al. 2004).

Au niveau du testicule de souris adulte l'expression de DNMT1 a été montrée par différentes approches au niveau des spermatogonies de type A (Mertineit et al. 1998, Watanabe et al. 2004), au niveau des spermatocytes pré-leptotènes/leptotènes et une expression moins forte au niveau des spermatogonies de type B (figure 35) (Mertineit et al. 1998). Alors que les cellules germinales atteignent le stade pachytène le taux de transcrit et de protéine DNMT1 chute très fortement. Ainsi l'absence d'expression de DNMT1 au niveau des spermatocytes pachytènes proviendrait du mécanisme d'inhibition de traduction présenté un peu plus haut (voir plus haut) à partir de la production du messager *Dnmt1p*. On retrouve une expression faible de DNMT1 au stade spermatide ronde probablement pour la reméthylation de gènes spécifiques du testicule ou des processus de réparation d'ADN (La Salle & Trasler 2006).

- *Chez l'homme :*

Les travaux de Galetzka et al. chez l'homme sur la gonade fœtale mâle ont également permis de montrer que le transcrit de DNMT1 est exprimé a un taux élevé dans le testicule prénatal avec un pic à 21 semaines de gestation (Galetzka et al. 2007b).

Chez l'homme adulte, au cours d'une spermatogenèse normale, le messager et la protéine DNMT1 ont des profils d'expression assez similaires à ce qui est observé chez la souris avec une présence dans les spermatogonies mais également dans les spermatides rondes (Omisanjo et al. 2007).

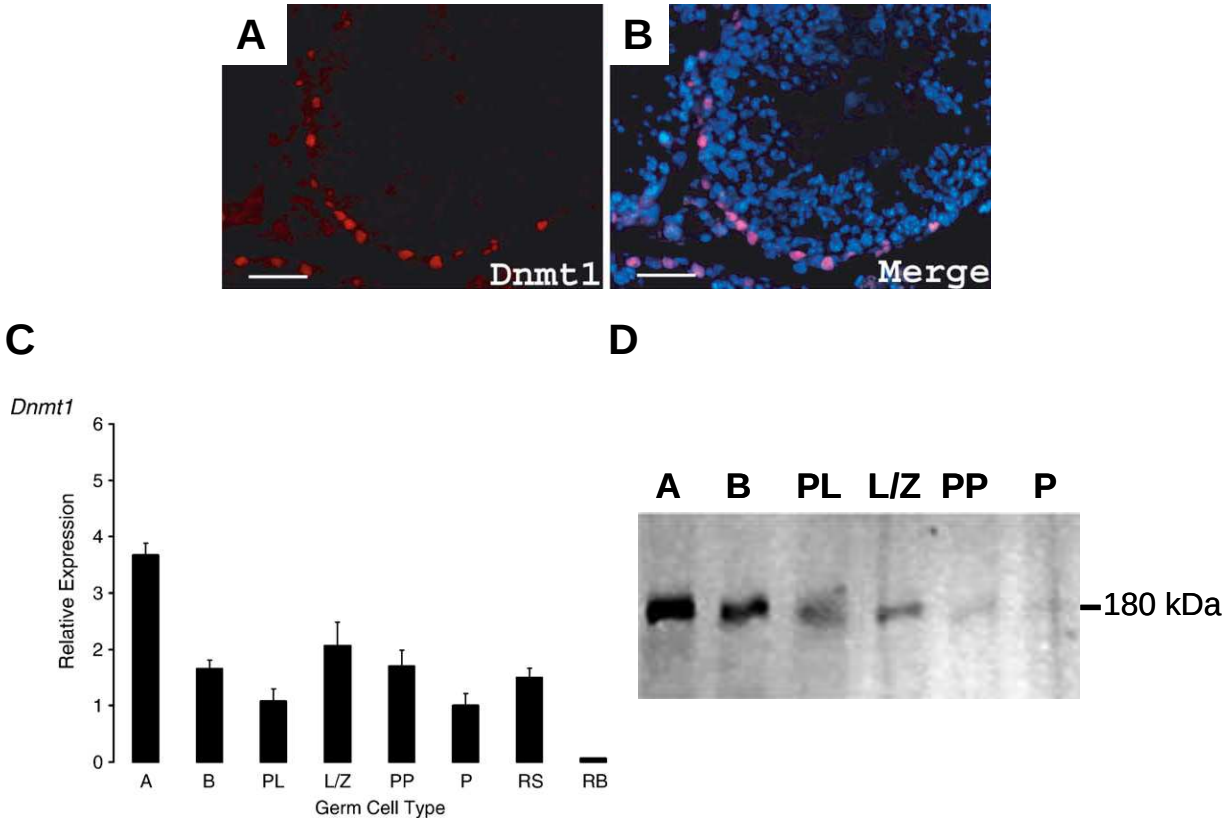


Figure 34. Localisation et expression de Dnmt1/DNMT1 au cours du développement des cellules germinales chez la souris

(d'après Mertineit et al., 1998 ; Watanabe et al., 2004 ; La Salle et al., 2006) (A et B) *Localisation de DNMT1 au niveau des spermatogonies de type A et B par immunofluorescence,* ***(C)*** *Quantification relative du taux de transcrit Dnmt1 et,* ***(D)*** *mise en évidence de la protéine DNMT1 dans les différentes sous-populations cellulaires du testicule (A : spermatogonies de type A, B : spermatogonies de type B, PL : spermatocytes préleptotènes, L/Z : spermatocytes leptotènes/zygotènes, PP : spermatocyte pachytènes prépubertaires, P : spermatocytes pachytènes, RS : spermatides rondes, RB : corps résiduels).*

6.1.2 DNMT3A dans le testicule fœtal et adulte

- *Chez la souris :*

Durant la vie fœtale chez la souris, le testicule embryonnaire exprime majoritairement le transcrit et la protéine correspondant à la forme DNMT3A2. On retrouve donc cette forme exprimée principalement par les gonocytes entre 14 et 18 jours embryonnaires avec un pic à 16 jours, tandis que la protéine DNMT3A2 n'est plus détectée à la naissance. Ceci suggère que DNMT3A2 serait l'enzyme réalisant la méthylation de l'ADN au sein des gonocytes fœtaux. Concernant la forme DNMT3A son expression durant la vie fœtale est constante et localisée au niveau des cellules de Sertoli fœtales et le tissu environnant les gonocytes. La forme DNMT3A continue d'être exprimée dans le testicule postnatal.

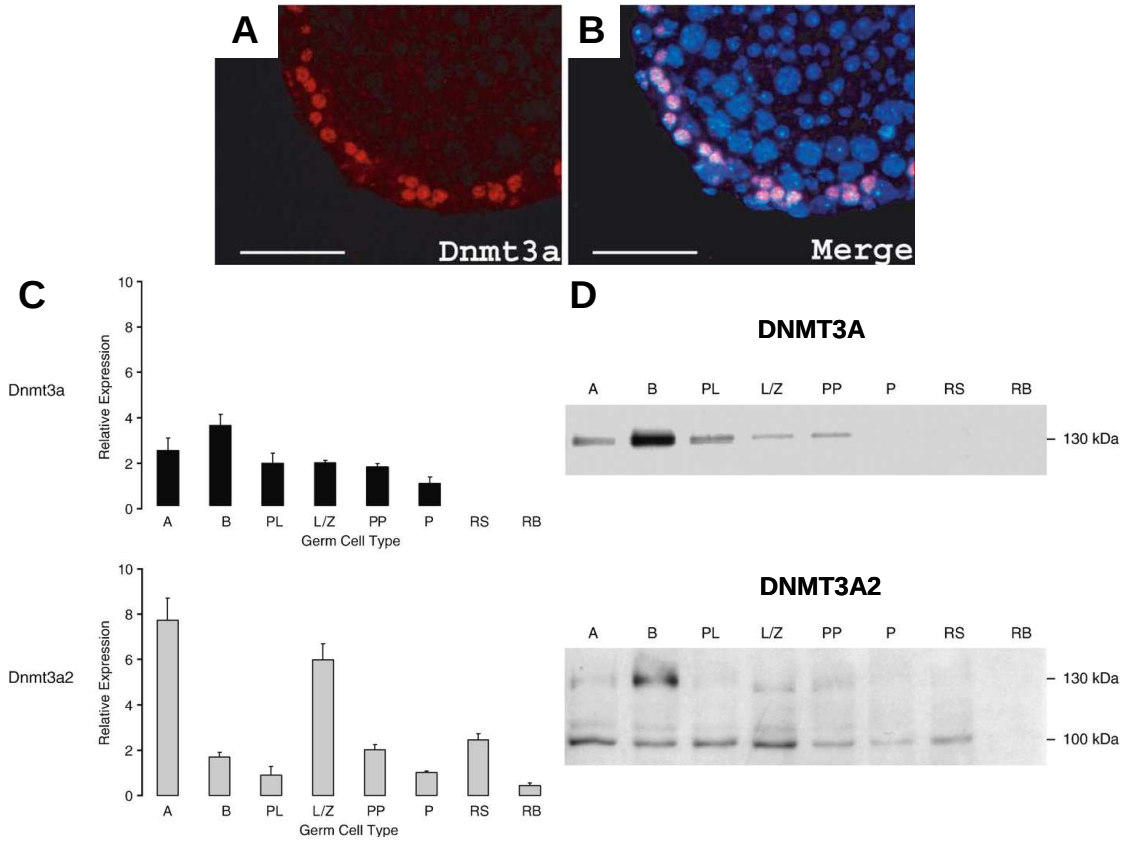


Figure 35. Localisation et expression de Dnmt3A/DNMT3A au cours du développement des cellules germinales chez la souris

(d'après Watanabe et al. 2004, La Salle et al. 2006) ***(A et B)*** *Localisation de DNMT3A au niveau des spermatogonies de type A par immunofluorescence,* ***(C)*** *Quantification relative du taux de transcrit Dnmt3A/3A2 et,* ***(D)*** *mise en évidence des variants DNMT3A et DNMT3A2 dans les différentes sous-populations cellulaires du testicule (A : spermatogonies de type A, B : spermatogonies de type B, PL : spermatocytes préleptotènes, L/Z : spermatocytes leptotènes/zygotènes, PP : spermatocyte pachytènes prépubertaires, P : spermatocytes pachytènes, RS : spermatides rondes, RB : corps résiduels).*

Au niveau du testicule mature les deux isoformes DNMT3A et 3A2 ont été détectées. Différents travaux ont permis de détecter un pic d'expression du transcrit et la protéine de DNMT3A au niveau de la spermatogonie de type B et les spermatocytes préleptotènes (Watanabe et al. 2004, La Salle and Trasler 2006), DNMT3A est également détectée plus faiblement aux autres stades de la spermatogenèse de la spermatogonie de type A jusqu'au stade spermatocyte pachytène où on ne détecte plus la protéine (figure 36). Le profil d'expression de DNMT3A2 est quant à lui assez similaire à celui de DNMT1, l'expression de l'ARNm et de la protéine est forte dans les spermatogonies A, les spermatocytes leptotènes/zygotènes et une expression plus faible au stade spermatide ronde (La Salle et al. 2004, 2006).

- *Chez l'homme :*

Au niveau du testicule fœtal, DNMT3A1, 3A2 et 3A3 suivent une expression assez comparable à ce qui est observé pour DNMT1. En effet, le testicule fœtal exprime plus fortement les différents transcrits de DNMT3A à 21 semaines de gestation au moment où les cellules germinales se retrouvent arrêtées dans leurs mitoses. La forme la plus importante dans la gonade fœtale reste DNMT3A2 et des taux un peu moins importants pour DNMT3A1 et 3A3 (Galetzka et al. 2007). Au cours de la spermatogenèse adulte, les différentes formes de transcrits DNMT3A sont détectées dans le testicule. D'autre part, des approches immunohistochimiques ont ciblé une expression de DNMT3A au niveau du nucléole des spermatogonies de type B, suggérant ainsi un rôle dans l'inactivation du nucléole avant l'enclenchement du processus méiotique (Galetzka et al. 2006).

6.1.3 DNMT3B dans le testicule fœtal et adulte

- *Chez la souris :*

Pendant la vie fœtale et post-natale, la forme de DNMT3B principalement exprimée au niveau des gonocytes puis des spermatogonies correspond au transcrit et à la protéine DNMT3B2 avec une expression faible aux alentours de 16 jours post-coitum. L'expression de DNMT3B qui est faible avant la naissance augmente très significativement à 4, 6 et 16 jours post-partum dans la gonade mâle (La Salle et al. 2004). Il est également mis en évidence une expression plus faible et plus constante des formes DNMT3B3 au niveau des gonocytes puis des spermatogonies (Sakai et al. 2004). Enfin, même si les formes prédominantes de DNMT3B sont DNMT3B2 et 3B3 dans le testicule post-natal, les travaux de la Salle et al. (2006) ont permis de caractériser la présence de trois autres formes (DNMT3B1, 3B4 et 3B7) de la protéine DNMT3B dans le testicule à 6 jours post-natals.

Au niveau des cellules germinales d'un testicule adulte, le transcrit et la protéine DNMT3B sont majoritairement localisés au niveau des spermatogonies de type A (figure 37) (La Salle et al. 2004, Watanabe et al. 2004). Dès lors que les spermatogonies A se différencient, on observe une chute drastique du taux de DNMT3B avec une expression plus faible niveau des spermatogonies B et des spermatocytes préleptotènes. Les formes majoritairement exprimées au niveau du testicule et des cellules germinales adultes sont la forme catalytiquement active DNMT3B2 et la forme inactive DNMT3B3 (La Salle & Trasler 2006). En parallèle de ce qui est observé pour DNMT1, on retrouve au stade

leptotène/zygotène une expression plus importante de DNMT3B et, comme nous l'avons décrit pour DNMT1 et DNMT3A, une diminution d'expression du messager et de la protéine DNMT3B apparait au stade pachytène. Enfin, comme pour DNMT1 et DNMT3A2, on observe une réexpression de DNMT3B au niveau des spermatides rondes (La Salle & Trasler 2006).

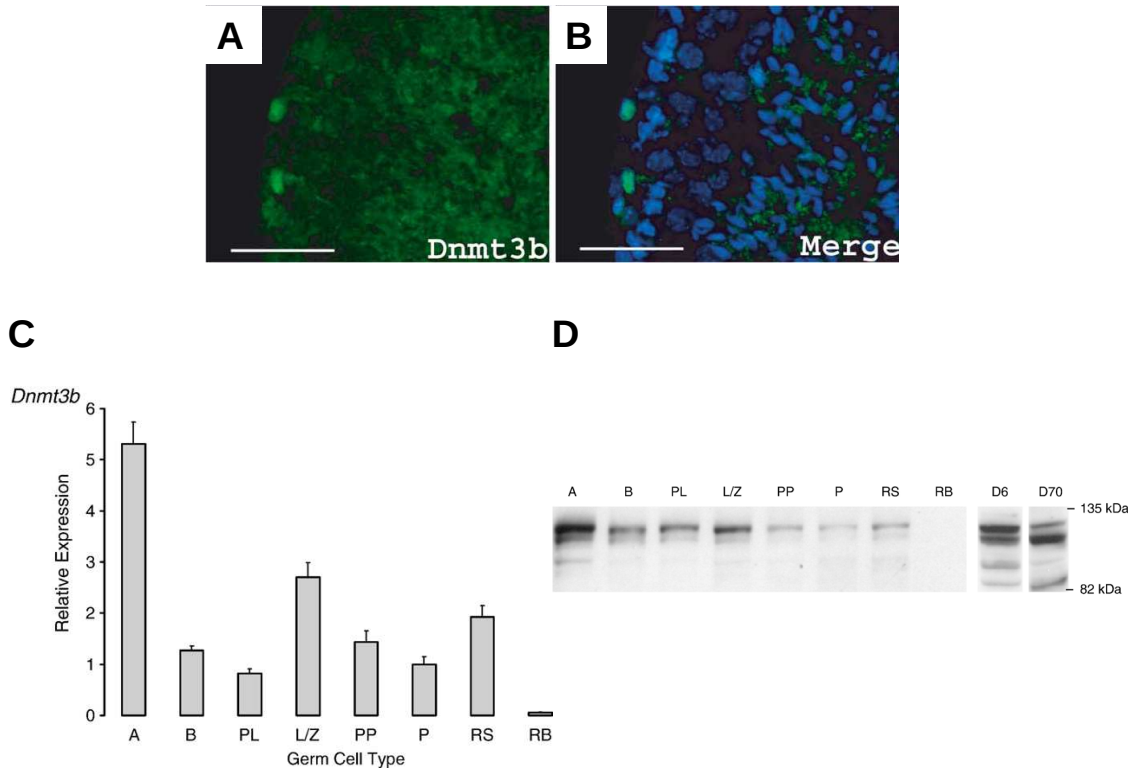


Figure 36. Localisation et expression de Dnmt3B/DNMT3B au cours du développement des cellules germinales chez la souris

(d'après Watanabe et al., 2004 ; La Salle et al., 2006) (A et B) *Localisation de DNMT3B au niveau des spermatogonies de type A par immunofluorescence,* ***(C)*** *Quantification relative du taux de transcrit Dnmt3B et,* ***(D)*** *mise en évidence des variants de la protéine DNMT3B dans le testicule de souris (testicule de D6 : 6 jours et D70 : 70 jours) ainsi que dans les différentes sous-populations cellulaires du testicule (A : spermatogonies de type A, B : spermatogonies de type B, PL : spermatocytes préleptotènes, L/Z : spermatocytes leptotènes/zygotènes, PP : spermatocyte pachytènes prépubertaires, P : spermatocytes pachytènes, RS : spermatides rondes, RB : corps résiduels).*

- *Chez l'homme :*

A partir des travaux de Xie et al. (1999) lors de la mise en évidence de la famille des DNMT3 chez l'homme, il a cependant été montré que le transcrit *Dnmt3B* est exprimé à des taux élevés dans le testicule humain adulte en comparaison des autres tissus (Xie 1999).

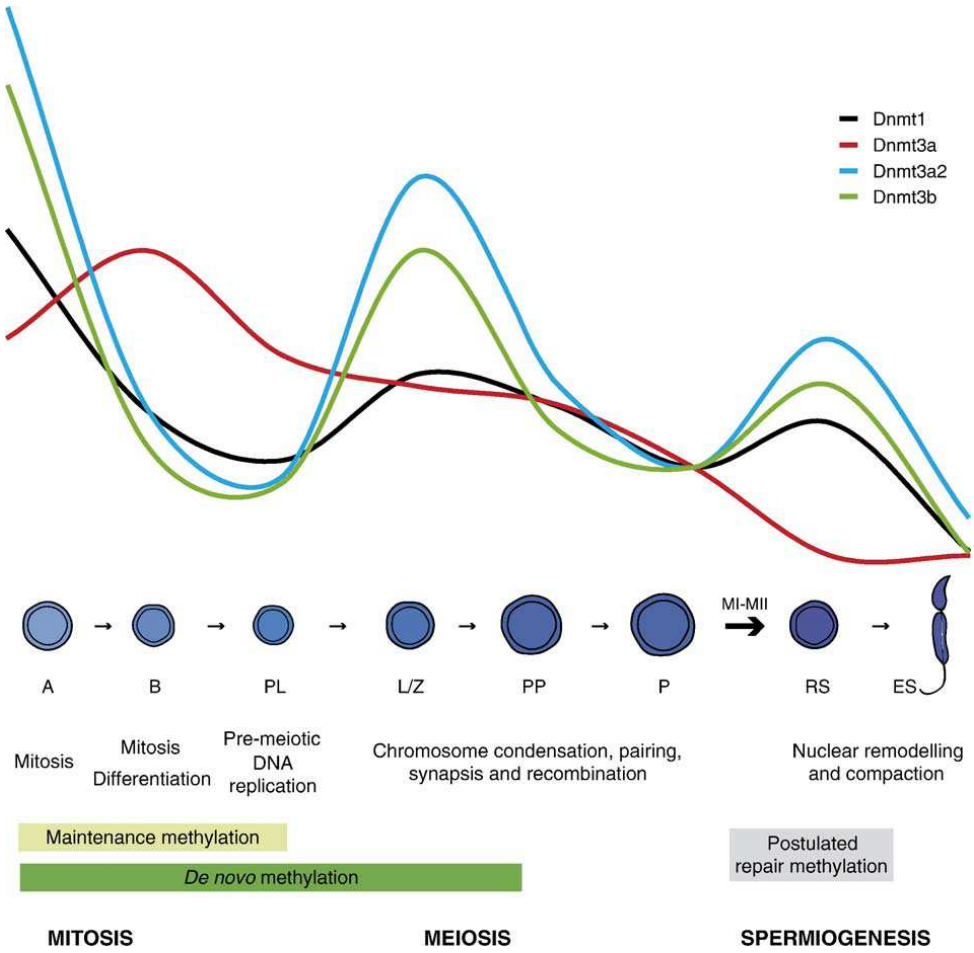


Figure 37. Représentation schématique de la dynamique d'expression des DNMTs au cours de la spermatogenèse

(La Salle et al. 2006) *(A : spermatogonies de type A, B : spermatogonies de type B, PL : spermatocytes préleptotènes, L/Z : spermatocytes leptotènes/zygotènes, PP : spermatocyte pachytènes prépubertaires, P : spermatocytes pachytènes, RS : spermatides rondes, RB : corps résiduels, ES : spermatides allongées).*

6.1.4 DNMT3L dans le testicule

- *Chez la souris :*

Durant la gestation l'expression de *Dnmt3L* au sein du testicule embryonnaire se fait de façon très similaire à ce qui est observé pour *Dnmt3A2*. En effet, durant la période initiale d'acquisition des patrons de méthylation, on observe une expression spécifique dans les gonocytes du transcrit et de la protéine *Dnmt3L* de 14 à 18 jpc avec un pic aux alentours de 16 jpc (La Salle et al. 2004, 2007, Sakai et al. 2004). Durant la vie post-natale et adulte l'expression de la forme longue du transcrit de *Dnmt3L* est retrouvée mais dans des proportions considérablement plus faibles (Hata et al. 2002), on retrouve 6400 fois moins de transcrit *Dnmt3L* dans les spermatocytes pachytènes qu'au niveau de gonocytes à 15,5 jpc (La Salle et al. 2007a). Ainsi au cours de la spermatogenèse chez l'adulte, même si les taux

d'expression sont relativement faibles, on parvient à détecter une régulation fine de l'expression de *Dnmt3L* au sein des différentes cellules germinales comme pour les autres DNMTs avec la même diminution au cours de la transition spermatogonie vers spermatocytes puis au pachytène (figure 39) (La Salle et al. 2007b).

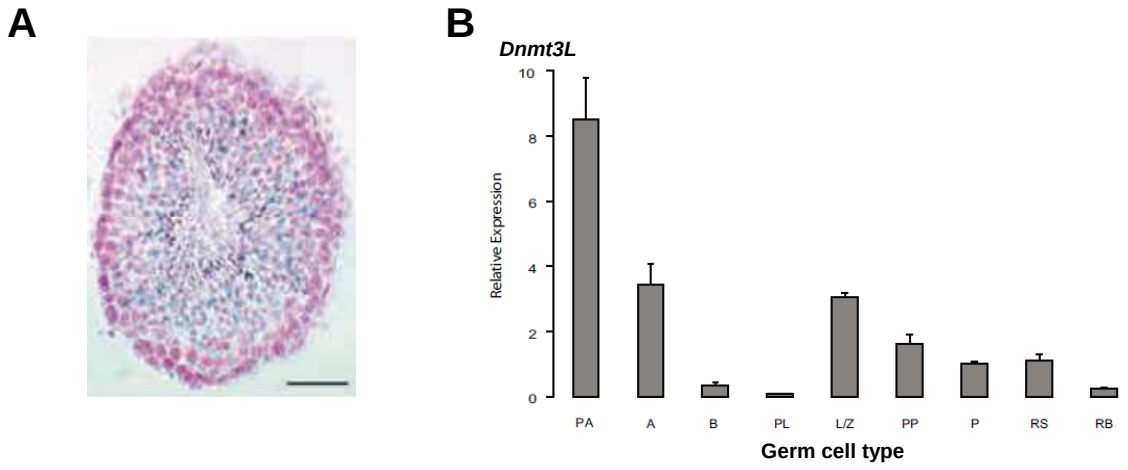


Figure 38. Localisation et expression de Dnmt3L au cours du développement des cellules germinales chez la souris
(d'après Hata et al. 2002, La Salle et al. 2007). (A) *Marquage X-Gal (bleu) au niveau des tubes séminifères chez la souris adulte comportant le marqueur IRES-βgeo sous contrôle du promoteur endogène de Dnmt3L,* ***(B)*** *Quantification relative du taux de transcrit Dnmt3L dans les différentes sous-populations cellulaires du testicule (PA : spermatogonies de type A primitive, A : spermatogonies de type A, B : spermatogonies de type B, PL : spermatocytes préleptotènes, L/Z : spermatocytes leptotènes/zygotènes, PP : spermatocyte pachytènes prépubertaires, P : spermatocytes pachytènes, RS : spermatides rondes, RB : corps résiduels).*

- *Chez l'homme :*

Lors de la caractérisation de *DNMT3L* chez l'homme, il a été montré chez l'adulte une forte expression du transcrit au niveau testiculaire en comparaison des autres tissus analysés (Aapola 2000).

6.3 Dynamique et spécificités de la méthylation de l'ADN les cellules germinales mâles

Le testicule possède un profil de méthylation de l'ADN qui lui est propre et qui est très différent de l'ensemble des autres tissus. En outre, il a été montré que le testicule possède environ 8 fois plus de loci hypométhylés en comparaison des tissus somatiques (Oakes et al. 2007a). Ces régions hypométhylées spécifiques du testicule sont des séquences non répétées le plus souvent en dehors des régions régulatrices des gènes et en dehors des

îlots CpG, donc ces régions hypométhylés ne jouent probablement pas de rôle dans la régulation d'expression des gènes spécifiques du testicule (Trasler 2009).

Comme nous l'avons déjà décrit un peu plus haut, la méthylation de l'ADN joue un rôle primordial au cours des phases précoces de la gamétogenèse chez le mâle. En effet, chez la souris, les patrons de méthylation sont effacés au niveau de la plupart des séquences pendant la vie foetale à la période où les CGPs atteignent la gonade mâle en formation et l'acquisition de méthylation au niveau des gonocytes sur la majorité des séquences commence aux alentours de 15,5 à 18,5 jours de gestation et sera achevée au niveau des spermatocytes avant la fin du stade pachytène (Trasler 2009). Par exemple, au niveau du gène à empreinte *H19*, on observe une différence temporelle entre la méthylation de l'allèle paternel et maternel. L'allèle paternel acquiert la quasi-totalité de sa méthylation durant la vie fœtale tandis que la méthylation de l'allèle maternel commence à 18,5 jours embryonnaires pour s'achever au stade pachytène dans les spermatocytes (Davis et al. 1999, Davis et al. 2000).

Peu de travaux ont étudié de manière globale les profils de méthylation au cours de la spermatogenèse chez l'adulte. Cependant dans une étude récente par une approche d'analyse de méthylation globale (Restriction Landmark Genomic Scanning), Oakes et al. ont montré que bien qu'une grande partie du génome acquiert ses patrons de méthylation avant la naissance au sein des gonocytes, un petit nombre de séquences voient tout de même leur profil de méthylation évoluer au cours de la spermatogenèse adulte (gain de méthylation ou déméthylation). Ainsi, les gènes *Abt1* (Activator of Basal Transcription 1), *Tcf3* (Transcription Factor 3), *Polg* (DNA Polymerase Gamma) et *Ibtk* (Inhibitor of Bruton Agammaglobulinemia Tyrosine Kinase) continuent d'acquérir leur profil de méthylation par un processus de méthylation de novo au cours de la différenciation des cellules germinales entre le stade de spermatogonie de type A et le stade spermatocyte pachytène. A l'inverse un certain nombre de séquences répétées de type Long Terminal Repeats (ex. *MaLR*, *ERVK*) se retrouvent progressivement déméthylées au cours de la progression vers le stade spermatocyte pachytène (Oakes et al. 2007b). Aussi, l'analyse des locus à empreinte paternelle (*H19-Igf2*, *Rasgrf1* et *Dlk1-Gtl2*) dans le même contexte à permis de mettre en évidence que ces gènes finissent d'acquérir la totalité de leur méthylation entre la spermatogonie A et le stade pachytène. Dans ce même travail les auteurs ont finalement montré que la plupart des séquences dont la méthylation était modifiée au cours de la spermatogenèse était située en

dehors des régions 5' régulatrices des gènes suggérant un rôle additionnel de la méthylation de l'ADN dans l'extinction des éléments répétés et dans la stabilité ou l'organisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse (Oakes et al. 2007b).

Par ailleurs, des travaux récents impliqueraient la méthylation de novo (notamment par DNMT3A) dans la reméthylation et l'extinction des éléments transposables au cours des méioses successives au niveau des spermatocytes pachytènes, montrant le rôle primordial de la méthylation de novo au cours des cycles de spermatogenèse (van der Heijden & Bortvin 2009).

Enfin, l'étude de méthylation de l'ADN au niveau des gènes *Pgk-2* (Phosphoglycerate Kinase 2), *Apo A1* (Apolipoprotein A1) et *Pou5f1* (POU Class 5 Homeobox 1) a montré que ces gènes sont déméthylés au cours de la spermatogenèse tandis qu'ils se retrouvent méthylés au cours du transit des spermatozoïdes dans l'épididyme (Ariel et al. 1994, McCarrey et al. 2005).

6.4 Méthylation au cours de la différenciation testiculaire

Des travaux ont cherché à mettre en évidence les modifications de méthylation au niveau des gènes clés de la différenciation gonadique. Des auteurs ont notamment démontré que le gène *Sry*, codant la protéine permettant d'induire la différenciation testiculaire et la différenciation des cellules de Sertoli, pouvait être régulé par méthylation au niveau de son promoteur. La perte de méthylation du promoteur de *Sry* intervient en parallèle de la déméthylation massive du génome et notamment des gènes à empreinte (11,5-12,5 jours post-coïtum), et cette déméthylation est corrélée à son niveau d'expression dans la gonade en différenciation (Nishino et al. 2004).

Le gène Sf1 est également impliqué au niveau des cellules de Leydig et de Sertoli au cours de la différenciation gonadique. *Sf1* est également méthylé au niveau de son promoteur proximal ce qui participe à la régulation de son expression spécifique de certains types cellulaires au cours du développement gonadique (Hoivik et al. 2008).

Enfin, il a été montré par des approches in vitro que le traitement de gonades fœtales de souris (11,5 jpc) par l'inhibiteur des ADN méthyltransférases 5-Azacytidine, conduisait à des altérations de la formation des cordons testiculaires et de la différenciation des cellules de Sertoli.

Ces données soulignent l'implication de la méthylation dans les étapes initiales de la différenciation gonadique en plus de son rôle spécifique dans le développement des cellules germinales.

6.5 Les ADN méthyltransférases ont un rôle crucial dans la spermatogenèse

6.5.1 *Informations obtenues à partir des modèles d'invalidation ou Knock Out (KO) chez la souris*

- Invalidation de DNMT3A ou DNMT3B au niveau des cellules germinales :

En 2004, les travaux de Kaneda et al. grâce à l'utilisation de KO conditionnels spécifiques des cellules germinales ont permis de montrer le rôle primordial de DNMT3A dans la spermatogenèse. En effet, les animaux invalidés pour *Dnmt3A* présentaient à 11 jours post-partum une diminution du nombre de spermatogonies et à l'âge adulte (11 semaines) une azoospermie caractérisée par une forte altération de la proportion de spermatogonies, de spermatocytes et de spermatides. Ces altérations étaient également associées à une diminution au niveau des locus de *H19*, *Dlk1-Gltl2*. A l'inverse les animaux KO *Dnmt3B* au niveau des cellules germinales ne présentaient pas de phénotype particulier ni d'altération de la méthylation sur les locus étudiés (Kaneda et al. 2004).

Sur le même principe, il a également été démontré que l'invalidation de *Dnmt3A* au niveau des cellules germinales entrainait une altération dans l'initiation de la 1ère vague de méiose se traduisant à l'âge adulte par un perte de cellules germinales au stades leptotène, zygotène et pachytène (Yaman & Grandjean 2006).

Récemment, des travaux reposant sur la transplantation de cellules germinales souches invalidées pour *Dnmt3A* et *3B*, ont mis en évidence que ces cellules *Dnmt3*-KO avaient plus de difficultés à achever une spermatogenèse normale au niveau des testicules receveurs avec une absence de production de spermatides allongées et de spermatozoïdes matures (Takashima et al. 2009).

- Invalidation de Dnmt3L :

Plusieurs études ont identifié le rôle primoradial de DNMT3L dans la spermatogenèse via l'utilisation de modèles knock-out (Bourc'his et al. 2001, Hata et al. 2002, Webster et al. 2005). L'ensemble de ces travaux montre que les animaux invalidés pour DNMT3L

présentent un hypogonadisme sévère caractérisé par une perte progressive des cellules germinales par apoptose avec à l'âge adulte un phénotype Sertoli Cell Only (SCO). Ainsi, on observe chez les individus *Dnmt3L* KO dès la 1ère semaine un défaut de mitose des spermatogonies (environ 50% de cellules en moins à 6 jours post-partum), qui s'accompagne plus tardivement un délai d'entrée en méiose. Ces altérations proviennent notamment de problèmes au niveau des complexes synaptonémaux, de mésappariements des chromosomes homologues et d'altérations globales de la structure chromatinienne (défaut de mise en place de l'hétérochromatine) qui conduisent à l'apoptose des cellules germinales (Webster et al. 2005). L'invalidation de *Dnmt3L* entraîne une diminution de la méthylation au niveau des gènes à empreinte paternelle (*H19, Rasgrf1, Dlk1-Gtl2*) ainsi qu'au niveau de certains éléments transposables (*IAP, LINE-L1, SINE-MIR et LTR-ERV1*) pouvant même conduire à la leur réactivation (Webster et al. 2005, La Salle et al. 2007).

- Knock-down de DNMT1 :

En raison de la létalité induite après l'invalidation de DNMT1, la plupart des travaux reposent sur des approches in vitro pour manipuler les taux de DNMT1. Ainsi la diminution d'expression de DNMT1 par knock down au niveau de cellules germinales souches engendre rapidement une apoptose massive sans pour autant diminuer drastiquement les taux de méthylation. Ceci suggère donc que les cellules germinales souches sont très dépendantes de DNMT1 et/ou sensibles à une faible hypométhylation (Takashima et al. 2009).

6.5.2 *Informations obtenues à partir de l'utilisation d'inhibiteurs des DNMTs*

L'administration in vivo d'inhibiteurs de la méthylation (5-azacytidine, 5-Aza-2'-Deoxycytidine) chez le rongeur (rat et souris), suggère également de fortes implications des DNMTs et de la méthylation de l'ADN au cours de la spermatogenèse et la maturation des cellules germinales. En effet, les rongeurs traités par les inhibiteurs de méthylation à des doses non toxiques pour l'ensemble de l'organisme présentent une diminution de la fertilité. Les altérations observées spécifiques du testicule sont caractérisées par une diminution du taux de méthylation retrouvée au niveau du sperme, une diminution du poids du testicule associée à une augmentation de l'apoptose des cellules germinales (tubes séminifères aux stades I-IV et XI-XIV), une diminution de la numération spermatique et une diminution

marquée de la capacité des spermatozoïdes à féconder (Doerksen et al. 2000, Kelly et al. 2003, Trasler 2009) .

7 Pathologies associées à des anomalies de méthylation de l'ADN

7.1 Méthylation de l'ADN et cancer

La première altération épigénétique à avoir été mise en évidence dans le cancer est une hypométhylation globale de l'ADN (Feinberg & Vogelstein 1983), (Gama-Sosa et al. 1983). Cependant, en parallèle de cette hypométhylation globale, il est également mis en évidence une hyperméthylation au niveau du promoteur de certains connus pour jouer un rôle dans la tumorigénèse lorsqu'ils sont inactivés (Lopez et al. 2009). Ainsi, dans le cancer la méthylation de l'ADN est altérée de deux manières :

(1) une hypométhylation globale du génome pouvant conduire à la réactivation d'oncogènes (ex. *C-MYC*, *MAGE, CDH3, c-Ha-Ras*) (Cheung et al. 2009) ou ou encore la réactivation de séquences d'ADN parasites (ex. éléments transposables LINE-1)(Ballestar & Esteller 2008),

(2) une hyperméthylation locale qui peut engendrer l'extinction de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (ex. *CDKN2A/P16-INK4A*), la réparation de l'ADN (ex. *BRCA1*), l'apoptose (ex. *DAPK*), la détoxification (ex. *GSTP1*), la réponse hormonale (ex. *ESR1*, *ESR2*) ou encore la métastase (ex. *CDH1*). L'hyperméthylation de certains gènes comme *CDKN2A/P16-INK4A*, *RASSF1* ou *MGMT* est une constante dans un grand nombre de cancers tandis que pour les autres gènes cette hyperméthylation serait plus spécifique d'un type particulier de cancer (Ballestar & Esteller 2008).

7.2 Anomalies de méthylation de l'ADN dans l'infertilité masculine

7.2.1 Mise en évidence d'anomalie des méthylation chez les patients infertiles

Les travaux concernant les altérations de la méthylation de l'ADN dans les problèmes d'infertilité masculine abordent par différentes techniques la méthylation au niveau du

spermatozoïde sur les séquences régulatrices des gènes à empreinte (Filipponi & Feil 2009). Par ces approches il a notamment été démontré une association entre les oligozoospermies modérées à sévères et l'hypométhylation des gènes à empreinte paternelle (*H19* et *GTL2*) ainsi que dans certains cas une hyperméthylation au niveau de gènes à empreinte maternelle (*PEG1*, *LIT1*, *ZAC*, *PEG3* et *SNRPN*) (Kobayashi et al. 2007, Marques et al. 2009). D'autres études ont confirmé ces observations au niveau des loci à empreinte paternelle mais également en étendant l'analyse à d'autres gènes à empreinte maternelle. Ainsi, dans l'étude réalisée par Boissonnas et al. il a été mis en évidence dans un groupe de patients présentant une teratozoospermie ou bien un groupe présentant une oligo-astehno-teratozoospermie, une diminution de méthylation au niveau de CpG de certains sites de liaison du facteur CTCF dans la région régulatrice au niveau du gène *H19*. De la même façon, dans le groupe oligo-asteno-teratozoospermie il a été constaté une diminution de méthylation au niveau d'une région de régulation d'*IGF2* associée à une hyperméthylation au niveau du locus à empreinte maternelle *IGF2R* (Boissonnas et al. 2009). En examinant d'autres loci à empreinte maternelle (*PLAG1*, *DIRAS3*, *HRAS*, *NTF3*, *MT1A*, *PAX8*, *SFN*, *LIT1*), il a chaque fois été mis en évidence une hyperméthylation de ces gènes associée à une mauvaise qualité spermatique (Houshdaran et al., 2007, Hammoud, Purwar, Pflueger, Cairns, & Carrell, 2009). D'autre part l'analyse, sur un faible nombre d'autres séquences génomiques n'a pas montré d'altération significative dans la méthylation des séquences répétées *LINE-1* et *Alu* (Kobayashi et al. 2007, Boissonnas et al. 2009).

En somme, chez les hommes infertiles il est souvent mis en évidence une hypométhylation au niveau des gènes à empreinte paternelle qui peut être associée à une hyperméthylation des gènes à empreinte maternelle.

7.2.2 Hypothèses sur les anomalies de méthylation dans l'infertilité masculine

Différentes hypothèses sont proposées pour expliquer les anomalies de la méthylation au niveau des gènes à empreintes chez les patients présentant des altérations de la spermatogenèse. Certaines études proposent que les anomalies de méthylation proviendraient d'un mauvais effacement des séquences méthylées au cours du développement précoce des cellules germinales (Boissonnas et al. 2009, Filipponi and Feil 2009), d'autres proposent une qu'une activité anormale des DNMTs pourrait engendrer des erreurs de la mise en place ou de la maintenance des profils de méthylation (Boissonnas et

al. 2009, Marques et al. 2009), enfin il est également suggéré qu'une anomalie dans le remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogenèse pourrait engendrer ces erreurs dans l'empreinte parentale (Boissonnas et al. 2009, Filipponi and Feil 2009).

7.4 Les DNMTs et la méthylation de l'ADN dans les cancers testiculaires

7.4.1 Données sur l'expression des DNMTs dans les tumeurs germinales testiculaires

Un certain nombre de travaux ont permis de mettre en évidence des différences d'expression des ADN méthyltransférases dans les différents types de cancers testiculaires. Par exemple, pour la forme DNMT3A2 il a été mis en évidence une surexpression (du messager et de la protéine) au niveau des séminomes, des non-séminomes et carcinomes in situ. Les auteurs ont notamment montré que cette surexpression de DNMT3A2 proviendrait d'une perte de méthylation au niveau de l'intron 25 du gène DNMT3A au sein des séminomes (Yamada et al. 2004, Ishii et al. 2007). D'autres études ont permis de mettre en évidence une expression élevée des transcrits DNMT3A, 3B et 3L au niveau des tumeurs germinales de type carcinome embryonnaires en comparaison des séminomes (Biermann et al. 2007, Godmann et al. 2009). Le statut de DNMT1 au sein des séminomes n'est pas clairement identifié. Ainsi, deux travaux utilisant des approches d'immunohistochimie ont mis en évidence des résultats opposés : absence d'expression de DNMT1 pour Omisanjo et al. (2007), non modification d'expression de DNMT1 pour Netto et al. (2008). Enfin, par des approches de microarray il a été détecté une sous-expression de DNMT2 au sein des séminomes et carcinomes embryonnaires (Skotheim et al. 2002).

7.4.2 Les altérations de la méthylation de l'ADN dans les cancers testiculaires

Il a généralement été mis en évidence une hypométhylation globale du génome au sein des séminomes et des néoplasies germinales intratubulaires en comparaison des non-séminomes (teratomes et carcinomes embryonnaires) dont le génome est globalement hyperméthylé (Lind et al. 2007, Netto et al. 2008).

Même si peu de gènes ont été étudiés spécifiquement au niveau de la méthylation de leur promoteur dans les tumeurs germinales testiculaires, on peut tout de même citer les

gènes *MGMT*, *RASSF1A*, *BRCA1*, *HIC1* et *PRSS21* qui sont hyperméthylés au niveau des non-séminomes (Lind et al. 2007). Dans le cas du gène suppresseur de tumeur *RASSF1A*, il est tout de même retrouvé hyperméthylé dans 40% des cas de séminomes et 80% des cas de non-séminomes (Godmann et al. 2009).

II.B - Les microRNAs

1 *Définition et généralités*

En 1993, le premier petit ARN, *lin-4*, est caractérisé au niveau de nématodes (Lee et al. 1993). Depuis le nombre de petits ARNs découverts n'a cessé d'augmenter et le nombre de publications qui paraissent chaque jour dans ce domaine est considérable. Les implications des petits ARNs sont multiples allant de l'initiation de l'hétérochromatine jusqu'à l'inhibition de traduction. De cette manière, l'ensemble de ces petits ARNs est impliqué dans divers mécanismes de contrôle de l'expression de gènes (Kim, Han, et al. 2009).

Les petits ARNs eucaryotes se définissent par leur petite taille d'environ 20 à 30 nucléotides (nt), le mécanisme conduisant à leur biogenèse et leur capacité de se lier aux protéines de la famille Argonaute (AGO). On décrit ainsi au moins 3 familles de petits ARNs : (1) les microARNs (miRNAs), (2) les petits ARNs interférents endogènes (endo-siRNAs) et, (3) les ARNs interagissant avec les protéines PIWI (Piwi-interacting RNAs, piRNAs).

En outre, les miRNAs matures ont une taille de 21-23 nt, se lient aux protéines AGO. Ils ciblent les ARNm et agissent en tant que régulateurs post-transcriptionnels. Les piRNAs, plus longs, ont une taille de 24-31 nt, leur biosynthèse ne dépend pas de DICER. Le rôle des piRNAs a été identifié dans les cellules germinales, où ils ont un rôle dans l'extinction des éléments transposables via la formation d'hétérochromatine ou la déstabilisation des ARNs. Enfin, les endo-siRNAs sont plus courts (21-22 nt) et diffèrent des miRNAs par le fait qu'ils ont pour origine de l'ARN double brin et que leur synthèse est uniquement dépendante de DICER (Kim, Han, et al. 2009). Leur rôle serait également une fonction de régulation post-transcriptionnelle. Le tableau 4 résume les propriétés des différentes classes de petits ARNs chez les mammifères.

Dans cette revue bibliographique nous avons focalisé sur les microRNAs qui régulent l'expression d'un grand nombre de gènes cibles. Ainsi chez l'homme il est estimé que près du tiers des gènes seraient régulés par les miRNAs. Plus de 700 miRNAs ont été identifiés et clonés chez l'homme (Migliore & Giordano 2009). Il y a fort à parier qu'un grand nombre

d'autres seront mis en évidence dans les années à venir étant donné qu'ils semblent contrôler un très grand nombre de processus biologiques. Les microARNs sont très conservés puisqu'il en existe depuis les organismes unicellulaires jusqu'à l'homme, de plus, près de 55% des miRNAs identifiés chez *C. Elegans* ont des homologues humains. D'une manière générale les miRNAs vont jouer un rôle de "guide" dans la régulation post-transcriptionnelle en s'appariant avec les séquences ARNm cibles, ce qui entraine une inhibition de la traduction et/ou une dégradation du transcrit ciblé (Kim, Han, et al. 2009).

Classe de protéines qui interagissent	***Protéine de la famille AGO***	***Classe de petits ARNs***	***Longeur (nt)***	***Origine des petits ARNs***	***Mécanisme d'action***
AGO	AGO1-4	miRNA	21-23 nt	Gènes codant les miRNAs	Inhibition de traduction, dégradation de l'ARNm, clivage de l'ARNm, induction de l'hétérochromatine
		Endo-siRNA	21-22 nt	Séquences intergéniques répétées, pseudogènes et clusters d'endo-siRNAs	Clivage de l'ARNm
PIWI	MILI (PIWIL2 chez l'homme)	piRNA Pre-pachytenes & pachytènes	24-28 nt	Eléments transposables & clusters de piRNA	Formation d'hétérochromatine via la méthylation d'ADN
	MIWI (PIWIL1 chez l'homme)	piRNA pachytène	29-31 nt	Clusters de piRNA	?
	MIWI2 (PIWIL4 che l'homme)	piRNA pre-pachytène	27-29 nt	Eléments transposables & clusters de piRNA	Formation d'hétérochromatine via la méthylation d'ADN

Tableau 4. Les différents types de petits ARNs associés aux protéines AGO, leur origine et mécanisme d'action (d'après Kim et al. 2009).

2 Biogenèse des microRNAs

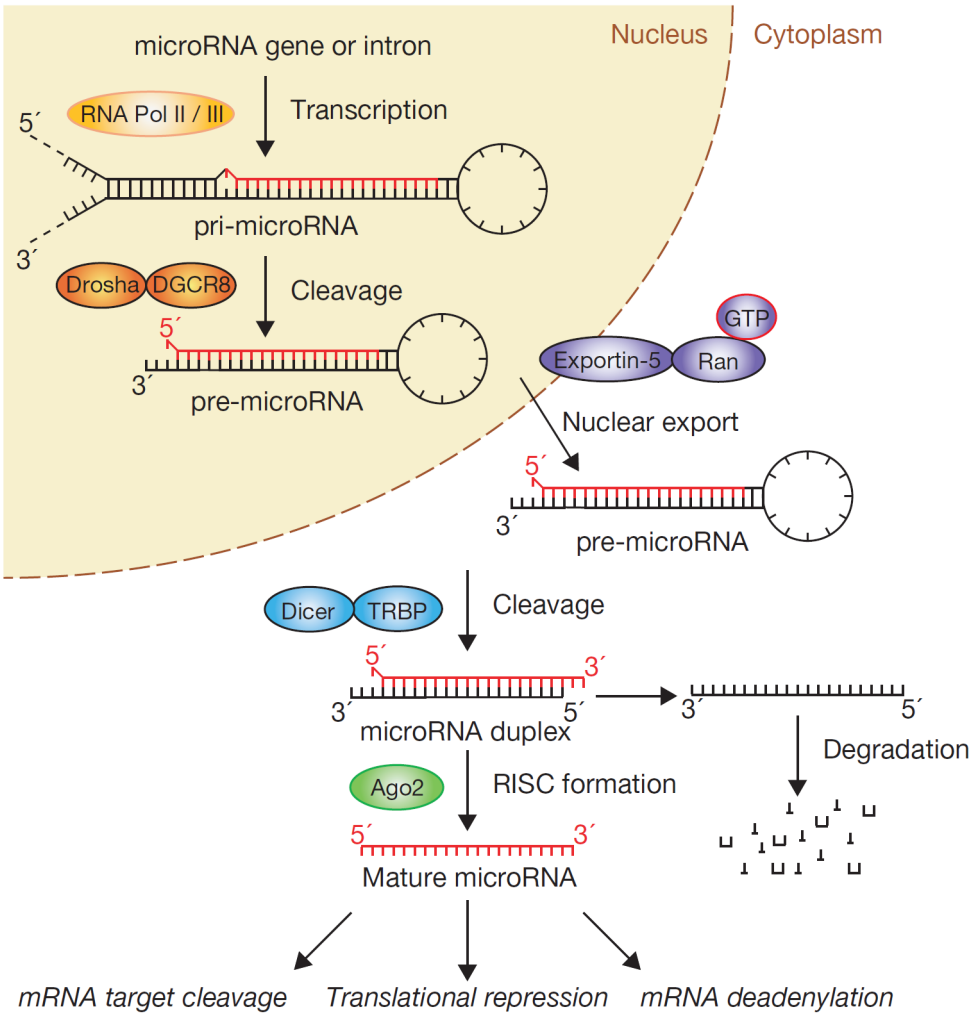


Figure 39. La voie classique de biogenèse des microRNAs et leur action sur les transcrits ciblés (d'après Winter et al. 2009)

2.1 Gènes des miRNAs et leur transcription

2.1.1 Les gènes des miRNAs

La plupart des gènes codant pour des miRNAs chez les mammifères sont présents en plusieurs copies (paralogues) résultant vraisemblablement de duplications. Très souvent ce sont les nucléotides 2 à 7 (nucléotides "seed") situés en 5' qui sont identiques entre les paralogues. En effet, ces nucléotides ont un rôle fondamental dans l'appariement avec le transcrit ciblé. Au sein du génome, près de 50% des loci de miRNAs sont situés les uns à côté des autres permettant ainsi de générer des regroupements de gènes codants les miRNAs (clusters) (figure 41).

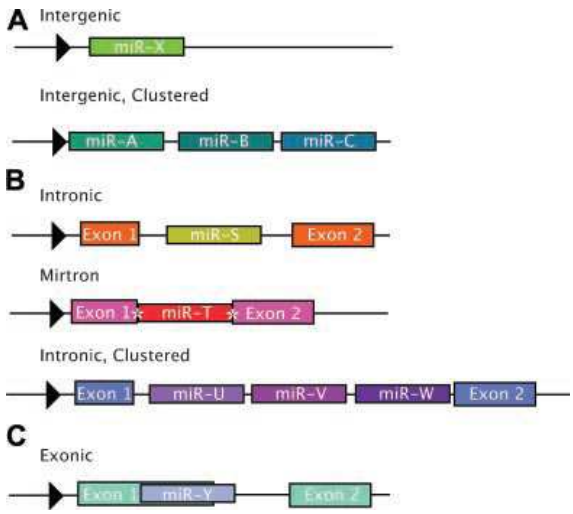


Figure 40. Localisation des miRNAs au niveau du génome (d'après Olena & Patton 2010)

En ce qui concerne la position des gènes ces microARNs au niveau du génome (figure 41), on les retrouve dans les introns (40% des cas) et exons (10% des cas) d'unités de transcription non codantes, mais également au sein d'introns (40% des cas) ou exons (10% des cas) situés au niveau de transcrits codants (Kim, Han, et al. 2009).

2.1.2 Transcription des miRNAs

La transcription de la majorité des miRNAs est réalisée par l'ARN polymérase de type II (Pol II), bien qu'un petit nombre de miRNAs soient transcrits par la Pol III. La polymérase génère de longs transcrits contenant miRNAs primaires ou pri-miRNA (Kim et al. 2009, Lau & MacRae 2009, Winter et al. 2009). La transcription des microRNAs requiert la même complexité de facteurs que pour la transcription de gènes codant des protéines. Comme nous l'avons déjà indiqué, les miRNAs sont le plus souvent regroupés en clusters ce qui fait que la transcription des miRNAs se fait sous forme de pri-miRNA longs de quelques kilobases contenant des séquences de miRNAs en tandem. Après leur transcription, l'ensemble des pri-miRNAs à la capacité de former une structure consensus en épingle à cheveux stable d'au moins 30 paires de bases (figure 40). Etant donné l'origine et la longueur variable des pri-miRNAs, cette longue structure en épingle à cheveux est primordiale, car elle permet la reconnaissance par les systèmes de maturation (Lau & MacRae 2009).

2.2 Les étapes de maturation des miRNAs

2.2.1 L'étape de maturation nucléaire : le complexe Microprocesseur

Dans le noyau, les pri-miRNAs sont pris en charge soit au cours de leur synthèse soit après leur synthèse par un complexe associant la RNase III Drosha et son cofacteur DGCR8 (Di George syndrome Critical Region gene 8) (figure 40). DROSHA et DGCR8 sont conservées chez les animaux mais pas chez les plantes. Ce complexe de 650 kDa appelé Microprocesseur permet la coupure au niveau de la queue de la structure en épingle à cheveux afin de générer les pre-miRNAs (figure 42). Les deux unités du complexe Microprocesseur ont la capacité de s'auto-réguler. Ainsi, DROSHA a également la capacité de cliver les mRNAs ce qui lui permet de réguler négativement les transcrits de son cofacteur DGCR8 (Lau & MacRae 2009). DGCR8 en interagissant avec DROSHA permet une stabilisation de la protéine (Winter et al. 2009).

Il existe d'autres voies non classiques pour générer les pre-miRNAs, notamment lorsqu'ils se trouvent au sein d'introns courts. Dans ce cas l'action unique des systèmes d'épissages (spliceosome) permet la formation des pre-miRNAs appelés "mirtrons" (Winter et al. 2009, Davis & Hata 2009a).

D'autres facteurs, comme les ARN hélicases P68 (DDX5) et P72 (DDX17), peuvent être associés au Microprocesseur afin de permettre la reconnaissance de certains types de pri-miRNAs (Winter et al. 2009).

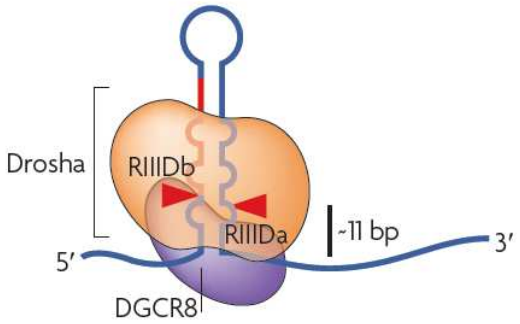


Figure 41. Le complexe Microprocesseur (DROSHA, DGCR8) interagit avec les pri-miRNAs (d'après Kim et al. 2009) *DGCR8 reconnait la zone de transition entre ARN simple et double brin. Ceci permet le positionnement de DROSHA afin de couper à 11 pb de la base de la structure en épingle à cheveux.*

2.2.2 La sortie du noyau via l'EXPORTIN 5

Après avoir été transformés dans le noyau, les pre-miRNAs sont exportés vers le cytoplasme par un complexe protéique de 230 kDa contenant l'EXPORTIN 5 (EXP5) (figure

40). Cette protéine appartient à la famille des récepteurs de transport nucléaire et interagit avec la petite GTPase Ran sous sa forme Ran-GTP. Le complexe lié au pre-miRNA passe ensuite vers le cytoplasme via le complexe du pore nucléaire. Enfin, dans le cytoplasme, l'interaction du complexe EXP5 avec la Ran GTPase activating protein (RanGAP) induit l'hydrolyse du GTP et stimule la libération du pre-miRNA (Lau & MacRae 2009).

2.2.3 Les étapes finales de maturation : le complexe RISC

Au niveau cytoplasmique les pre-miRNAs sont pris en charge par le RISC loading complex (RLC), un complexe d'environ 500 kDa contenant les protéines DICER, TRBP ou PACT et l'une des AGO (1 à 4) (figure 40). DICER est une RNase de type III conservée retrouvée chez l'ensemble des organismes eucaryotes (levure, plantes et animaux). DICER s'associe à des protéines reconnaissant l'ARN double brin comme TRBP (ou TARBP2, TAR RNA-binding protein) et PACT (ou PRKRA). Au sein du RLC les pre-miRNAs sont clivés par DICER au niveau de leur boucle terminale ce qui libère un duplex de miRNA d'environ 22 nt. Après clivage par DICER, le duplex de miRNA (~ 22 nt) est pris en charge au niveau du complexe par la protéine AGO1-4 dans le but de générer les complexes effecteurs RISC (RNA-induced silencing complex). De la sorte, un brin du miRNA reste associé à AGO ce qui constitue le miRNA mature ("guide strand") tandis que l'autre brin appelé miRNA* ("passenger strand") est dégradé (Kim, Han, et al. 2009). Le relargage du miRNA* est réalisée par AGO (forme AGO2) qui possède une activité endonucléase (activité slicer). La libération du miRNA* nécessiterait probablement l'intervention d'une activité hélicase puisque très souvent, l'existence de mésappariements au niveau du duplex miRNA:miRNA* empêche l'activité slicer de AGO2, et par ailleurs, les autres AGO 1, 3 et 4 ne possèdent pas d'activité endonucléase.

D'une manière générale, le brin qui reste fixé à AGO est "choisi" en fonction propriétés thermodynamiques (le brin possédant l'extrémité 5' la moins stable est conservé) mais il existe des cas où les deux brins miRNA:miRNA* seront utilisés avec la même fréquence pour créer le miRNA mature. Finalement, la libération de DICER et de TRBP (ou PACT) donne naissance au complexe RISC actif constitué du miRNA mature et de la protéine AGO (Winter et al. 2009).

2.3 Régulation de la biogenèse des microRNAs

2.3.1 Régulation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle est un point clé dans la régulation de la biogenèse des microRNAs. Les promoteurs des gènes de miRNAs sont sous le contrôle positif ou négatif d'une batterie de facteurs de transcription associés à la Pol II (ou Pol III), et d'éléments de régulations quasi-identiques (îlots CpG, TATA box, modifications d'histones etc…) à ceux intervenant dans la régulant la transcription des gènes codants les protéines.

- Régulation par des facteurs de transcription (figure 43) :

L'oncogène C-MYC est un des exemples clé de facteur de transcription contrôlant l'expression des miRNAs. C-MYC stimule notamment l'expression du cluster miR-17-92 favorisant la tumorigénèse, en se liant en amont au niveau de séquences consensus du promoteur (E-box : CATGTG). A l'inverse, C-MYC a la capacité de réprimer la transcription de familles de miRNAs "suppresseurs de tumeurs" miR-15a, -29, -34 et let-7 (Davis & Hata 2009). Ceci montre la complexité des régulations (stimulation/répression) des miRNAs par un même facteur de transcription.

Le facteur suppresseur de tumeurs P53 est un autre exemple de facteur de transcription régulant l'expression des miRNAs. Il a notamment été démontré que P53 peut se lier au niveau de séquences consensus dans le promoteur et activer la transcription de la famille miR-34 ce qui a pour conséquence d'activer un arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose (He et al. 2007).

- Régulation par mécanismes épigénétiques (figure 43):

Une partie des gènes codant pour des miRNAs se trouve au sein d'îlots CpG, ce qui indique que la transcription des microRNAs peut être contrôlée par des mécanismes épigénétiques. A titre d'exemple, la transcription de miR-148a, -34b/c, -9, let7a-3 est dépendante du statut de méthylation de leur promoteurs mais également du taux des ADN méthyltranférases (DNMT3B et 1) (He et al. 2007).

Par ailleurs, les modifications d'histones comme l'acétylation/déacétylation pourraient également jouer un rôle dans la régulation de transcription des microRNAs. En effet, le traitement de cellules cancéreuses par des inhibiteurs d'HDACs induit une

augmentation d'expression d'un certain nombre de miRNAs dont miR-1 (Davis & Hata 2009a).

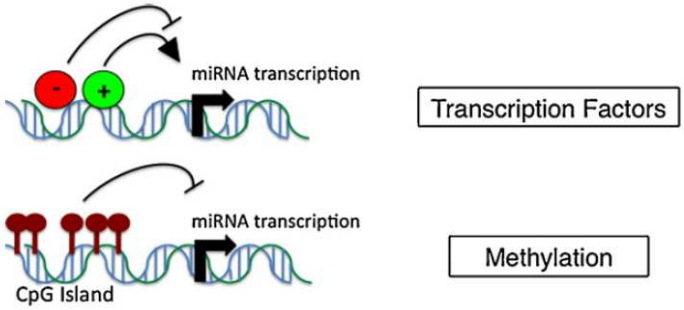


Figure 42. Exemples de mécanismes contrôlant la transcription des miRNAs (d'après Breving & Esquela-Kerscher 2009)

2.3.2 Régulation post-transcriptionnelle

En plus de la régulation transcriptionnelle, il existe un contrôle des processus de maturation nucléaires et cytoplasmiques des microRNAs. Ainsi un ensemble de facteurs peut, soit lier les pri-miRNAs afin de stimuler/empêcher leur transformation par le complexe Microprocesseur, soit réguler positivement ou négativement l'activité nucléaire de DROSHA, soit contrôler le transport des microRNAs en dehors du noyau ou encore les fonctions cytoplasmiques de DICER. Nous présentons ici quelques exemples des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.

- Régulation par les protéines d'interaction de l'ARN (RNA-binding proteins) liant les pri-miRNAs :

Un certain nombre RNA-binding proteins pouvant interagir directement avec les pri-miRNAs ont été récemment identifiées. La liaison de ces protéines au niveau des pri-miRNAs via la reconnaissance de séquences particulières dans les pri-miRNAs (structure en épingle à cheveux, queue), va permettre de contrôler (stimulation/inhibition) la maturation nucléaire par DROSHA et ses partenaires.

La protéine hnRNPA1 (Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein A1) reconnait et se lie spécifiquement au niveau de la structure en épingle à cheveux et au niveau de la queue du pri-miR-18a, ceci a pour effet de modifier la conformation du pri-miRNA facilitant ainsi la liaison de DROSHA/DGCR8 et donc de stimuler de manière ciblée la maturation nucléaire du pri-miRNA-18a (Michlewski et al. 2008).

Un autre exemple de protéine liant les pri-miRNA est LIN-28. Cette protéine présente des homologies de structure au niveau de son site de liaison avec le site de liaison du complexe Microprocesseur. Dans ce cas, la liaison de LIN-28 au niveau de la boucle terminale de la structure en épingle à cheveux du pri-miRNA let-7 inhibe l'étape de clivage par le complexe Microprocesseur par un mécanisme de compétition (Breving & Esquela-Kerscher 2009).

- *Régulation positive/négative via l'interaction de facteurs avec le complexe Microprocesseur:*

Au niveau nucléaire l'action de DROSHA peut être régulée par différents facteurs. Entre autres, il a été mis en évidence un contrôle de DROSHA par la voie BMP/ TGFβ via les protéines SMADs et qui serait spécifique de certains pri-miRNAs. Ainsi, lors de la maturation du pri-miR-21, les SMADs peuvent interagir avec DROSHA en présence de son cofacteur P68 (DDX5) ce qui stimulerait l'activité de DROSHA (Kim et al. 2009, Lau & MacRae 2009).

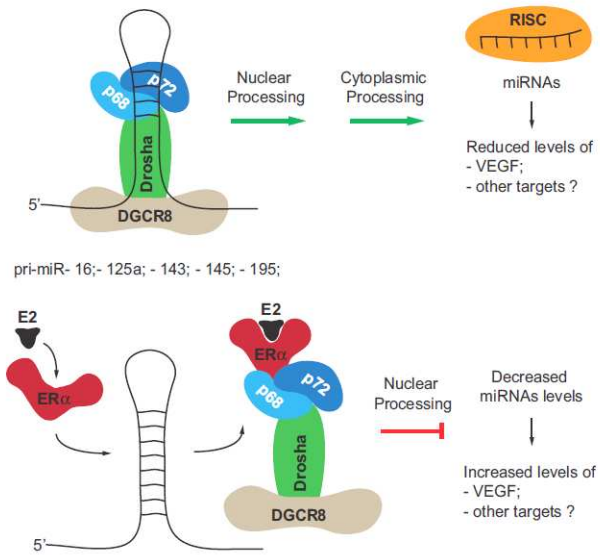


Figure 43. Inhibition de l'activité de DROSHA par le complexe E2-ERα
(d'après Macias et al. 2009) *En absence de E2, le complexe Microprocesseur (DROSHA, DGCR8, P68 et P72) reconnait les pri-miRNAs et réalise la première étape de maturation au niveau du noyau. En présence de E2, le complexe E2- ERα à la capacité de dissocier le complexe Microprocesseur empêchant ainsi la maturation des miRNAs.*

Un des exemples de régulation négative via l'interaction de facteurs au niveau du complexe Microprocesseur, est la liaison du récepteur des estrogènes ERα en présence de son ligand estradiol (E2) (Macias et al. 2009, Yamagata et al. 2009). En effet, dans l'étude de Yamagata et al. , il a été démontré que la liaison de E2 au niveau de ERα pouvait inhiber la

transformation des pri-miR-16, -125a, -143, -145 et -195 en stimulant la dissociation de DROSHA et ses partenaires P68/P72 du ou des pri-miRNA(s) ciblé(s) (figure 44).

- Régulation de l'activité de DICER :

Il existe différents mécanismes qui permettent de stimuler ou d'inhiber l'activité de DICER. Ces mécanismes impliquent soit des facteurs qui vont se lier aux pre-miRNAs soit des facteurs qui vont interagir directement avec DICER.

Parmi les facteurs interagissant avec les pre-miRNAs, la protéine KSRP (KH-type Splicing Regulatory Protein) à la capacité de reconnaître la boucle terminale de pre-miR-16, -let-7, -20, -26b, -106a et -21 afin de stimuler la conversion cytoplasmique orchestrée par DICER (Breving & Esquela-Kerscher 2009).

Au niveau cytoplasmique, on retrouve également la protéine LIN-28 qui va réguler l'accessibilité aux pre-miRNAs -let-7 et -128 toujours par un mécanisme de compétition avec DICER ce qui empêche le clivage au niveau de la zone de transition entre la boucle et la queue. D'autre part, une fois associée au pre-let-7, LIN-28 a la capacité de recruter l'enzyme TUT4 (3' terminal uridylyltransferase 4) qui ajoute une série d'uridines au niveau du pre-miRNA. Cette modification a pour effet de dérouter le pre-let-7 vers une voie de dégradation par les nucléases, empêchant ainsi de manière irréversible l'étape de maturation par DICER (Davis & Hata 2009).

Les facteurs TRBP et PACT impliqués dans le RISC loading complex sont également important pour réguler DICER. En effet, lorsque l'on inhibe l'expression de ces cofacteurs, le taux de protéine DICER est également diminué, suggérant un rôle de ces protéines dans la stabilisation de DICER (Davis & Hata 2009).

- Régulation par modification ou "editing" des microRNAs lors des phases de maturation :

La modification des miRNAs au niveau de la structure en épingle à cheveux par conversion des adénosines (A) en inosines (I) (editing) est un mécanisme qui contribue à inhiber les phases biogenèse des miRNAs au niveau de DROSHA et DICER. Cette conversion spécifique de certains miRNA est réalisée par des adénosines déaminases ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) et est observée dans 6% de la totalité des miRNAs humains. Par exemple, la conversion (A -> I) au niveau du pri-miR-142 au niveau de sa partie double brin

inhibe le clivage par DROSHA (Davis & Hata 2009b). Par ailleurs, ce même type de conversion peut inhiber la transformation de certains pre-miRNAs par DICER. Dans le cas de miR-151, il a été démontré que le mécanisme d'editing au niveau de la structure tige-boucle empêchait complètement la maturation par DICER (Breving & Esquela-Kerscher 2009).

2.4 Stabilisation et dégradation des microRNAs

En plus de la régulation de la biogenèse des microRNAs il existe un niveau de régulation au niveau de leur demi-vie. La plupart des travaux ayant à ce jour été réalisés chez les plantes, il existe actuellement peu de données concernant la stabilisation et la dégradation des microRNAs disponibles chez l'animal. Cependant il semble que les miRNAs matures possèdent une longue demi-vie, en effet ils persistent en grand nombre après inhibition de la machinerie de biosynthèse des miRNAs par interférence ARN (Davis & Hata 2009b).

Un des mécanismes de stabilisation des microRNAs est l'association aux protéines AGO qui agit comme un facteur trans de stabilisation. En effet, lorsque l'on diminue ou l'on surexprime les protéines AGO on observe une diminution/élévation des taux de miRNAs matures. D'autre part, l'expression ectopique des AGO induit une augmentation du taux de miRNAs matures tandis que cela n'est pas le cas pour les autres protéines impliquées dans la voie de biogenèse des miRNAs (DROSHA, DGCR8 et DICER) (Kai & Pasquinelli 2010).

Il a tout de même été mis en évidence chez les animaux des facteurs de modification post-transcriptionnelle des miRNAs agissant en cis contribuant à réguler leur stabilité (Kai & Pasquinelli 2010) :

- la poly(A) polymérase GDL-2 modifie le miR-122 mature en lui ajoutant un résidu adénosine au niveau de l'extrémité 3' contribuant à stabiliser ce miRNA,
- la terminale uridyltransférase TUT4/Zcchc11/PUP-2 a la capacité d'ajouter des résidus uraciles au niveau de l'extrémité 3' ce qui a pour effet soit de stimuler la dégradation (ex. let-7e) soit d'inhiber l'action des miRNAs (ex. miR-26a),
- l'exonucléase 5'-3' XRN-2 agit en dégradant les miRNAs simple brin qui ne sont pas associés aux AGO ou libérés par le complexe RISC.

Il apparait donc que les taux de miRNAs matures peuvent être contrôlés par un ensemble de facteurs régulant leur stabilité ou induisant leur dégradation, mais beaucoup de ces facteurs restent encore à être identifiés chez l'animal.

3 Les différents modes d'action des microRNAs et du complexe RISC

Les microRNAs vont agir sur la synthèse protéique soit en réprimant la traduction soit en stimulant la déadénylation et la dégradation des transcrits ciblés (figure 45). Très récemment, certains travaux ont montré que les miRNAs pouvaient activer la traduction. Chez les mammifères, la plupart des inhibitions induites par les microRNAs passent par un mécanisme d'inhibition de la traduction.

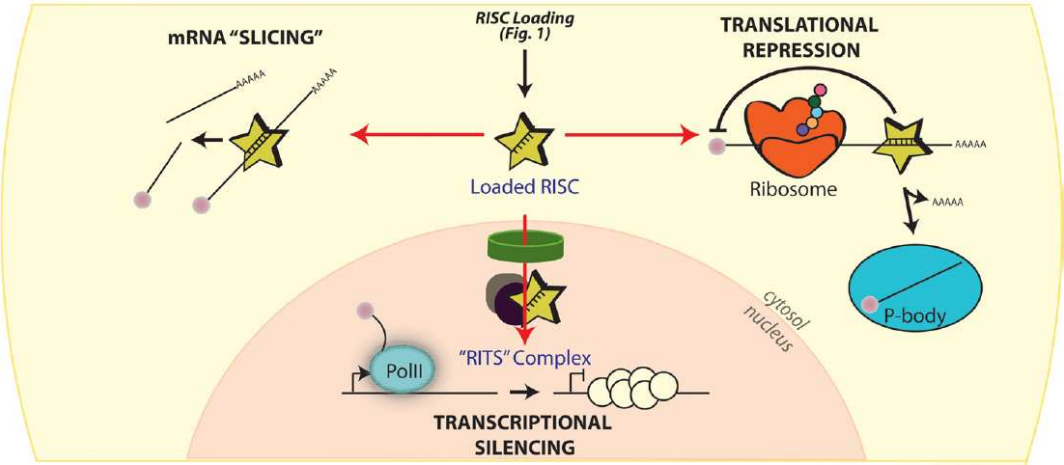


Figure 44. Représentation schématique du mécanisme d'action du complexe RISC (d'après Pratt & MacRae 2009)

3.1 Le complexe effecteur RISC

3.1.1 Le complexe effecteur "minimal"

Le complexe RISC fonctionnel est au moins constitué d'un miRNA mature ou miRNA guide et d'une des ribonucléoprotéines de la famille Argonaute (AGO). Chez les mammifères, c'est une des protéines AGO sur les quatre existantes (AGO 1 à 4) qui est recrutée au sein du complexe actif. Au sein du complexe RISC, le miRNA mature sert de guide pour stimuler le clivage du mRNA cible lorsque la complémentarité miRNA/mRNA est totale, soit réprimer la traduction les transcrits possédant une complémentarité partielle avec celle du miRNA.

3.1.2 Les protéines additionnelles du complexe RISC

En plus des protéines AGO, le complexe RISC peut recruter d'autres protéines. En outre, il a été identifié plus de 50 protéines pouvant interagir avec AGO1 ou AGO2 générant ainsi des complexes RISC allant de 100 kDa à 2.5 MDa (Lau & MacRae 2009). Ces protéines sont généralement des facteurs de liaison de l'ARN comme GW182, FMRP (fragile-X-mental-retardation protein) ou encore la protéine de decapping RCK/P54. En fonction de la combinaison de ces protéines au niveau du complexe RISC, il y aura soit régulation en agissant sur le mRNA directement (dégradation, déadénylation) soit en agissant sur sa traduction (Chekulaeva & Filipowicz 2009).

3.2 Le mécanisme de clivage des mRNA ou activité "slicer" par AGO2

L'effet le mieux caractérisé de la reconnaissance par le miRNA de son mRNA cible, est le mécanisme d'hydrolyse ou "slicing" du mRNA (figure 45). Ce mécanisme de slicing permet de casser le cadre de lecture de la partie codante et stimule la dégradation du transcrit par des exonucléases (Pratt & MacRae 2009). Dans un contexte in vitro, cette activité ne nécessite l'intervention d'aucun autre facteur cellulaire en dehors de la protéine Argonaute 2 (Rivas et al. 2005).

Deux composantes sont indispensables à l'activité de type "slicer" : (1) le recrutement d'une protéine Argonaute catalytiquement active et, (2) la parfaite complémentarité entre le mRNA cible et le miRNA mature servant de guide. Parmi les protéines Argonautes, AGO2 est la seule possédant une activité catalytique "slicer", c'est elle qui est responsable du clivage du transcrit ciblé par le miRNA.

Le domaine protéique d'AGO2 responsable du mécanisme de slicing est le domaine PIWI qui possède une activité de type RNase. La coupure du transcrit se fait à la moitié de la région complémentaire entre le miRNA et le mRNA, entre les nucléotides du transcrit s'appariant avec les bases 10 et 11 du miRNA guide.

3.3 Les mécanismes d'inhibition par les protéines AGO

Chez les mammifères, le mécanisme d'action prédominant de l'inhibition induite par RISC est l'inhibition de la traduction qui est guidée par le miRNA (figure 45). Toutes les

protéines AGO ont la capacité d'entrainer l'inhibition de traduction dépendante des miRNAs ou d'altérer la stabilité des ARNm via des mécanismes distincts de l'activité "slicer" d'AGO2. Contrairement à la réaction de slicing, l'inhibition de traduction ne nécessite pas de complémentarité totale entre le miRNA et le transcrit ciblé (Pratt & MacRae 2009). En fonction des études et du design expérimental mis en œuvre les différents auteurs ont pu démontrer l'implication des mécanismes d'inhibition au niveau de l'initiation ou au contraire après l'initiation de traduction. A ce jour, le mécanisme précis de l'inhibition de traduction induite par les miRNAs reste encore à être déterminé. La prévalence de l'un ou l'autre des mécanismes dépendrait de la structure du mRNA ciblé, des protéines de liaison de l'ARN impliquées, en fonction du type cellulaire ou encore en fonction de la voie de signalisation contrôlant cette inhibition.

3.3.1 Inhibition au niveau des étapes d'initiation de la traduction

Ainsi, les expériences d'inhibition de traduction induite par les miRNAs ont montré que les mRNAs ciblés ne sont généralement pas retrouvés associés aux ribosomes. D'autre part, il a été mis en évidence que les transcrits ne possédant pas de signal d'initiation de la traduction (IRES, Internal Ribosome Entry Site) ou pas de coiffe 5' fonctionnelle, ne sont pas inhibés efficacement par les miRNAs. Ces données suggèrent que les miRNAs ont la capacité d'inhiber la traduction des ARNm au niveau des étapes d'initiation probablement via un mécanisme mettant en jeu une inhibition de reconnaissance la coiffe 5' ou encore l'absence d'association de la sous-unité 60S des ribosomes (figure 46) (Liu 2008), (Chekulaeva & Filipowicz 2009).

3.3.2 Inhibition au niveau des étapes après l'initiation de la traduction

Plusieurs observations illustrent un mécanisme d'inhibition de la traduction par les miRNA après l'étape d'initiation. En effet, il a été mis en évidence que les miRNAs et leurs cibles sont associés aux polyribosomes, par ailleurs, il a été démontré que l'inhibition intervient toujours même si la traduction est initiée. Certains auteurs proposent que les miRNAs stimulent une terminaison de traduction anticipée et la dissociation des ribsosomes, les miRNAs pourraient également recruter des protéases au niveau des protéines en cours de synthèse afin de les dégrader (figure 46) (Liu 2008), Chekulaeva & Filipowicz 2009).

3.3.3 Inhibition via la déadénylation, la dégradation ou encore la séquestration au niveau des P-bodies

Il est maintenant clairement établi que les miRNAs peuvent induire une déadénylation et induire la dégradation des transcrits ciblés (figures 45 et 46). Ce mécanisme semble se faire indépendamment du mécanisme d'inhibition de la traduction. Les protéines du complexe RISC, le miRNA guide et le mRNA ciblé sont regroupés au niveau des P-bodies qui sont des foyers cytoplasmiques contenant des enzymes de dégradation des ARNs, de la sorte, les P-bodies sont impliqués dans le catabolisme et le stockage des transcrits non tarduits (Chekulaeva & Filipowicz 2009).

La famille de protéines GW182 jouent un rôle important au niveau des P-bodies et interagissent avec les protéines AGO pour permettre l'inhibition dépendante des miRNAs. Au niveau des P-bodies protéines GW182 agissent en stimulant la déadénylation et la dégradation des miRNAs. Alors que chez les mammifères, le mécanisme précis est encore mal connu, il a été mis en évidence chez la drosophile que la protéine GW182 recrute un complexe déadénylase (CAF1-CCR4-NOT) puis un complexe pour enlever la coiffe 5' (DCP1-DCP2) et l'exonucléase 5' vers 3' XRN1 pour dégrader les ARNs messagers (figure 46) (Chekulaeva & Filipowicz 2009, Pratt & MacRae 2009). Même si la dégradation des ARNm peut se faire au sein des P-bodies, la formation de ces foyers n'est pas indispensable pour la dégradation des transcrits.

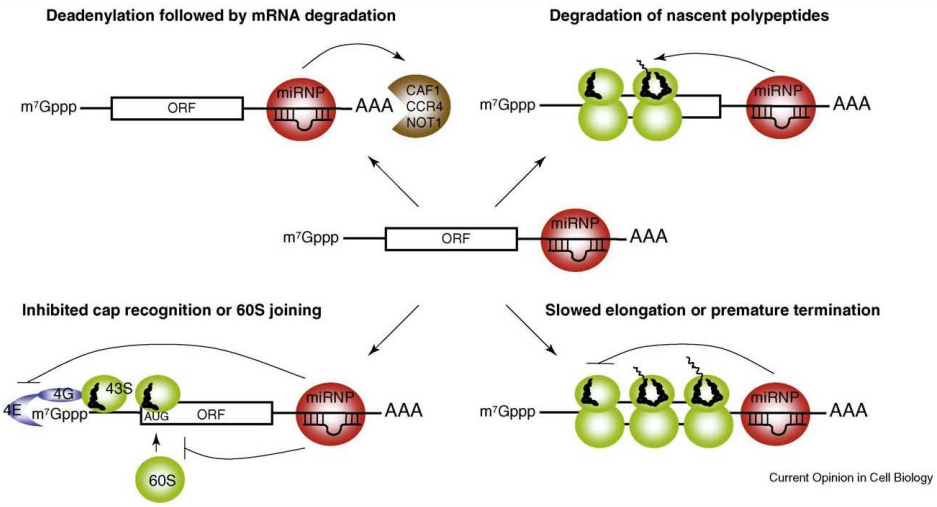


Figure 45. Les différents mécanismes possibles pour le mécanisme d'inhibition par les miRNAs (d'après Chekulaeva & Filipowicz, 2009) *miRNP est le complexe RISC contenant notamment les protéines AGO et GW182, ainsi que le miRNA mature servant de guide, m7Gppp : coiffe 5', -AAA : queue poly(A), 4E et 4G : facteurs d'initiation de la traduction, 43S et 60S : sous-unités ribosomales, CAF4-CCR4-NOT1 : facteurs du complexe de déadénylation.*

Les structures cytoplasmiques P-bodies sont des structures dynamiques qui peuvent également jouer un rôle de stockage des ARNm (figure 45) (Parker & Sheth 2007). Ainsi, les transcrits réprimés au niveau de la traduction sont stockés au sein des P-bodies, mais peuvent également être réactivés afin de retourner en direction de la machinerie de traduction par des mécanismes de désassemblage des P-bodies. L'agrégation des complexes RISC et ARNm au niveau de ces structures P-bodies empêcherai l'accès des ribosomes et de l'appareil de traduction au niveau des transcrits ciblés, ceci permet donc un contrôle spatial et temporel de la traduction des messagers (Liu 2008). Le nombre et la taille des P-bodies sont contrôlés par le stress cellulaire environnant.

3.3 Les mécanismes d'activation induits par les miRNAs

Des données récentes suggèrent que les miRNAs pourraient en fonction de l'arrêt ou activation du cycle cellulaire induire ou réprimer alternativement l'expression d'un gène cible (figure 47). L'activation d'expression de gènes cibles via les miRNAs pourrait notamment impliquer des éléments AREs (AU-rich elements) situés au niveau des extrémités 3' non traduites de transcrits codant pour des cytokines, facteurs de croissance ou encore oncogènes (Breving & Esquela-Kerscher 2009). Ces AU-rich elements permettent ainsi d'entrainer une réponse rapide via une dégradation des transcrits ou une activation de la traduction en fonction des signaux extracellulaires.

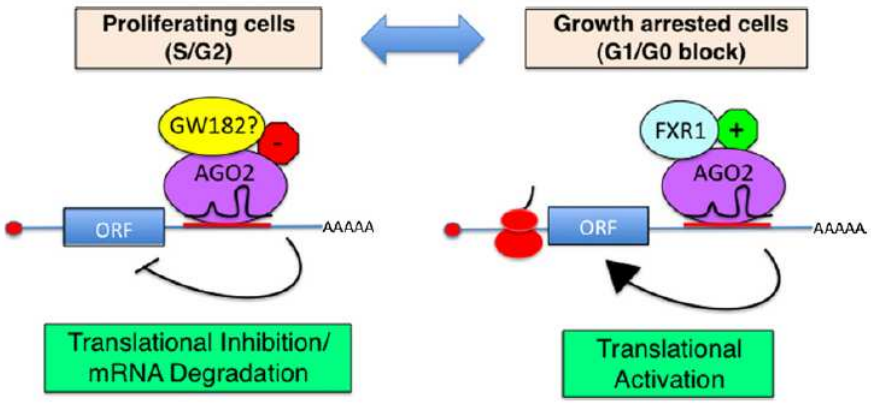


Figure 46. Modèle de répression ou d'activation de traduction de certains miRNAs spécifique du cycle cellulaire

(d'après Breving & Esquela-Kerscher 2009) *Schéma de gauche, dans une situation de prolifération cellulaire le complexe miRNA-AGO2 lie des cofacteurs additionnels répressifs comme GW182 (en rouge) au niveau de la partie 3'UTR afin d'aboutir à la situation classique d'inhibition de traduction et/ou de dégradation du mRNA. Schéma de droite, dans une situation d'arrêt du cycle cellulaire en G1/G0 (ex. cellules sans sérum), le complexe*

miRNA-AGO2 recrute FXR1 et d'autres facteurs activateurs (en vert) afin de stimuler la traduction à partir du mRNA.

A titre d'exemple, il a été mis en évidence que AGO2 et FXR1 (homologue de FMRP) pouvaient s'associer via l'interaction de miR-369-3 au niveau de l'extrémité 3' non traduite au niveau des éléments AREs du transcrit du TNFα permettant ainsi d'activer sa traduction au cours de phases de quiescence cellulaire induite par une déprivation en sérum (figure 47) (Vasudevan et al. 2007). Au contraire, lors des phases de proliferation cellulaire, AGO2 et FXR1 répriment l'expression du TNFα (figure 47). Ce même type de mécanisme a été observé pour l'effet du miRNA let-7 sur l'oncogène HMGA2 (Vasudevan et al. 2008). D'autres miRNA comme miR-10a ou encore miR-122 ont récemment été impliqués dans des mécanismes d'activation de traduction (Chekulaeva & Filipowicz 2009).

Cependant, il reste à déterminer quels types de miRNAs et cofacteurs sont recrutés au niveau du complexe RISC, et quel type d'appariement (appariement par la région seed ou autres) entre miRNA et ARN messagers ciblés pour conduire à cette activation de traduction.

4 Régulation de l'activité des microRNAs

En plus d'une régulation du niveau d'expression des microRNAs par le contrôle de leur biogenèse, il existe une régulation de l'activité des miRNAs qui peut se faire : (1) soit en atténuant leur activité, (2) soit en augmentant leur activité au sein du complexe RISC.

4.1 Diminution de l'activité des miRNAs

Des travaux récents ont démontré que certaines protéines de liaison de l'ARN pouvaient moduler l'action des miRNAs en se liant au niveau de l'extrémité 3'UTR des transcrits. Il a par exemple été mis en évidence que la protéine HuR peut empêcher l'action de miR-122 au niveau du mRNA CAT-1 en se liant aux AU-rich elements de la région 3'UTR, ce qui conduit par la suite à la libération de l'ARNm en dehors des P-bodies pour faciliter sa transcription. Le même type de mécanisme a été observé pour une autre RNA-binding protein DND1 qui réduit l'action de miR-221 au niveau du transcrit de P27 et de miR-327 au niveau du transcrit de LATS2 (Chekulaeva & Filipowicz 2009, Davis & Hata 2009). Enfin, la

RNA-binding protein PUMILIO peut également moduler l'interaction des miRNA grâce à la proximité entre ses motifs de liaison et les sites de liaison des miRNA au niveau des transcrits (Chekulaeva & Filipowicz 2009).

4.2 Augmentation de l'activité des miRNAs

Parmi les facteurs pouvant interagir avec les protéines AGO, un certain nombre à la capacité de stimuler l'activité du complexe RISC. Par exemple, la protéine TRIM32 peut s'associer aux AGO et augmenter l'activité de certains miRNA dont let-7a. L'IMPORTIN 8 jouerait également un rôle d'activateur étant donné que son invalidation réduit l'association des miRNA à AGO2 et empêche la répression via les miRNA au niveau de leurs cibles (Chekulaeva & Filipowicz 2009, Davis & Hata 2009).

5 Les microRNAs dans le testicule et la spermatogenèse

5.1 Mise en évidence des microRNAs dans le testicule

La mise en évidence des microRNAs dans le testicule a été réalisée il y a quelques années par des approches de clonage et microarray sur un ensemble de tissu humains (Barad et al. 2004, Liu et al. 2004). Plus tard des travaux ont étudié suivant le même type d'approches le miRNAome au niveau du testicule de souris (Ro et al. 2007, Yan et al. 2007).

Une expression préférentielle de certains miRNA a été mise en évidence au niveau testiculaire chez l'homme. L'expression la plus forte a été constaté pour miR-10b, -let7e, -212, -187 et -134 (Barad et al. 2004).

Les travaux de Ro et al. ont permis chez la souris de cloner et d'identifier par microarray 122 miRNA exprimés par le testicule dont 60% sont exprimés de façon ubiquitaire, 35% sont exprimés préférentiellement dans certains organes dont le testicule et 5% sont spécifiques du testicule (Ro et al. 2007). Parmi ces miRNA clonés dans le testicule, un certain nombre ont de fortes homologies avec les petits ARNs de la famille piRNA ou avec des miRNA déjà identifiés chez l'homme. Les auteurs ont pu identifier des miRNAs exprimés dans quasiment tous les types cellulaires testiculaires (ex. miR-202, miR-470, miR-470-3p, miR-471, miR-741, miR-742), des miRNAs plus exprimés dans les cellules méiotiques (ex.

miR-464, miR-469) ou encore des miRNAs exprimés dans les cellules méiotiques et haploïdes.

Dans un autre travail d'analyse globale du profil des miRNA entre le testicule immature et mature chez la souris, il a été mis en évidence que 14 miRNAs étaient surexeprimés (facteur > 2), tandis que 5 miRNAs (miR-34a, -34b, -34c, -29b, -449) étaient sous-exprimés dans les testicules immatures en comparaison des testicules matures (voir tableau 5) (Yan et al. 2007).

Nom du miRNA	***Expression relative (immature/mature)***	***Nom du miRNA***	***Expression relative (immature/mature)***
miR-41	6.3	miR-361	2.1
miR-495	6.1	let-7e	2.0
miR-335	3.6	miR-181b	1.9
miR-434-5p	3.5	miR-34a	-1.2
miR-337	3.1	miR-29b	-2.4
miR-379	3	miR-449	-3.9
miR-127	2.9	miR-34b	-5.9
miR-376a	2.8	miR-34c	-6.3
miR-181d	2.6		
miR-214	2.4		
miR-181c	2.3		

Tableau 5. Liste des miRNAs différentiellement exprimés entre le testicule immature et mature chez la souris (d'après Yan et al. 2007)

5.2 Mise en évidence et rôle de la machinerie de biogenèse des microRNAs dans le testicule et dans la spermatogenèse

En complément des études de profil d'expression des miRNAs au sein du testicule, certains groupes ont cherché à mettre en évidence les effecteurs de la machinerie de biogenèse des microRNAs au sein du testicule ou de ses différentes composantes cellulaires. Même si les cellules germinales et les cellules de Sertoli expriment toutes la machinerie de biogenèse, il existe néanmoins des profils d'expression différents entre ces deux types de sous-populations. En parallèle les approches reposant sur l'utilisation de modèles

d'invalidation de *Dicer* ou encore *Ago* chez las souris ont permis de mieux caractériser la fonction de certaines de ces effecteurs dans le déroulement de la spermatogenèse.

5.2.1 Effecteurs de la biogenèse des miRNAs dans les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli expriment les transcrits de l'ensemble des acteurs de la biogenèse des miRNAs (*Drosha*, *Dicer*, *Ago1-4*). Cependant, les cellules de Sertoli expriment à un taux élevé le transcrit *Ago2* en comparaison des cellules germinales (figure 48) (González-González et al. 2008).

5.2.2 Effecteurs de la biogenèse des miRNAs dans les cellules germinales

Les travaux de Kotaja et al. ont permis de mettre en évidence l'expression des protéines DICER et AGO2 au sein de structures appelées chromatoid bodies (C-bodies) au cours des phases de maturation des cellules germinales (Kotaja et al. 2006). Les C-bodies sont des structures comparables aux P-bodies mais spécifiques des cellules germinales, ils contiennent en plus des protéines de biogenèse des miRNAs, des protéines classiquement rencontrées dans les P-bodies comme GW182 et XRN1 (Kotaja & Sassone-Corsi 2007). Les auteurs ont également mis en évidence une expression constante de DICER au cours du cycle de l'épithélium séminifère.

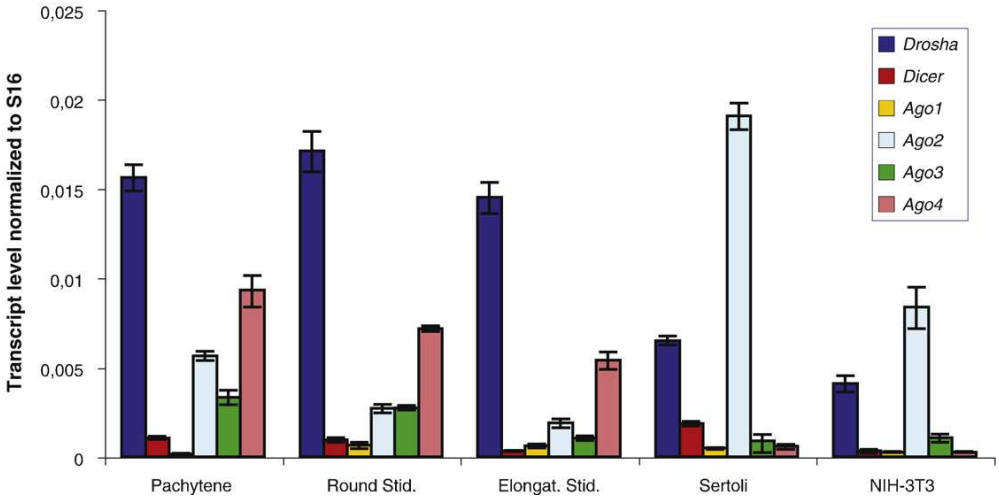


Figure 47. Profil d'expression des transcrits codant la machinerie de biogenèse de miRNAs au sein des sous-populations cellulaires du testicule
(d'après González-González et al. 2008) *Comparaison entre les cellules germinales testiculaires (spermatocytes pachytènes, spermatides rondes et spermatides allongées) et cellules somatiques (cellules de Sertoli et contrôle positif NIH-3T3).*

Les cellules germinales du testicule (spermatocytes et spermatides) présentent toutes un profil d'expression comparable des transcrits codant pour la machinerie de biogenèse des miRNAs. Ainsi ces cellules expriment fortement les transcrits de Drosha et Ago4, avec une expression marquée de Ago3 et Ago4 dans les spermatocytes pachytènes (figure 48) (González-González et al. 2008). L'ontogénie des ces transcrits ne montre pas de variation d'expression due à une régulation en fonction de la maturation des cellules germinales.

5.2.3 Informations obtenues à partir des modèles de knock-out

Afin d'élucider le rôle de *Dicer* dans différents processus biologiques chez les mammifères, Bernstein et collaborateurs ont généré un modèle de souris transgéniques invalidées pour *Dicer* (Bernstein et al. 2003). La perte de *Dicer* entraine une létalité embryonnaire précoce à 7,5 jours embryonnaires conduisant à la perte des cellules souches embryonnaires, ce qui suggère le rôle primordial de DICER dans le développement. Par la suite, différents auteurs ont cherché à identifier par des approches d'invalidations conditionnelles le rôle de DICER dans la régulation des processus biologiques notamment la reproduction.

- *Invalidation de Dicer au niveau des cellules de Sertoli :*

L'invalidation conditionnelle de *Dicer* spécifiquement au niveau des cellules de Sertoli entraine de sévères défauts de maturation et l'apoptose des cellules de Sertoli, mais également des défauts de maturation des cellules germinales qui se traduisent par une diminution massive du poids testiculaire ainsi qu'à une infertilité (Papaioannou et al. 2009). Ainsi, chez les animaux Dicer -/- il est observé une dégénérescence progressive du testicule caractérisée par des anomalies des tubes séminifères et un délais d'entrée en méiose à partir du 5ème jour postnatal, s'aggravant à 60 et 90 jours postnatals pour donner des animaux présentant des phénotypes de Sertoli-Cell-Only (SCO) à 180 jours postnatals.

Enfin, l'invalidation de Dicer dans les cellules de Sertoli entraine la suppression d'expression de microRNAs spécifiques des cellules de Sertoli (miR-299, - 376a, -381, - 409-5p, -674) se répercutant de manière indirecte sur le transcriptome via une probable augmentation de traduction de protéines répresseurs transcriptionnels. Parmi les gènes fortement réprimés on retrouve des gènes essentiels dans l'homéostatsie testiculaire

comme *Gdnf* ou *Scf* suggérant de probables altérations dans le renouvellement des spermatogonies souches.

- *Invalidation de Dicer ou Ago2 au niveau des cellules germinales :*

L'invalidation conditionnelle de Dicer au niveau des cellules germinales entraine des défauts majeurs de la spermatogenèse (Hayashi et al. 2008, Maatouk et al. 2008). Dans leur étude Hayashi et al. ont mis en évidence les testicules issus de ces animaux présentent une altération de la prolifération des cellules germinales primordiales, de prolifération et différenciation des spermatogonies, une infertilité à l'âge adulte causée par un arrêt de spermatogenèse (Hayashi et al. 2008). Le phénotype observé par Maatouk et al. est un peu moins délétère, les animaux présentant un phénotype d'hypofertilité causé par un défaut au niveau du stade de la différenciation spermatide ronde en spermatide allongée et par une mobilité spermatique anormale (Maatouk et al. 2008).

L'étude des animaux Ago2 -/-, en revanche, n'a pas mis en évidence d'altération au niveau testiculaire ni au niveau de la fertilité suggérant que (1) *Ago2* n'est pas indispensable à la meiose et la spermiogenèse, (2) l'éventuelle compensation de la perte d'*Ago2* par les autres membres de la famille argonaute (Hayashi et al. 2008).

En résumé, les données de profils d'expression des miRNAs, de leur machinerie de biogenèse dans le testicule, mais également les informations apportées par l'invalidation de Dicer au niveau testiculaire indiquent que ces petits ARNs jouent un rôle majeur dans le développement testiculaire et la spermatogenèse. De ce fait ils doivent être impliqués dans la régulation d'expression d'un ensemble de gènes nécessaires à la maturation des cellules germinales au cours des phases mitotiques, méiotiques et post-méiotiques de la spermatogenèse. Une étude ciblée (ex. knock-out), miRNA par miRNA, permettra de mieux caractériser leurs rôles respectifs dans la spermatogenèse.

6 Pathologies associées à des altérations dans les microRNAs

La découverte relativement récente et l'intérêt très large qu'a suscité le nouveau mécanisme de régulation d'expression des gènes par les microRNAs, fait que ce type de régulation est actuellement très étudié dans la pathologie humaine. Ainsi, les microRNAs ont

été impliqués dans le cancer (Cowland et al. 2007, Croce 2009), mais également dans un grand nombre d'autres pathologies comme le diabète (Pandey et al. 2009), les maladies cardiovasculaires (Cai et al. 2009), ou encore, les maladies neurologiques (Barbato et al. 2009, Christensen & Schratt 2009). Nous présenterons dans cette partie quelques exemples de miRNAs impliqués dans différents types de cancers, puis nous focaliserons sur l'implication des miRNAs dans les pathologies affectant le testicule et la fonction de reproduction (cancer testiculaire et infertilité).

6.1 Altération des microRNAs dans le cancer

6.1.1 Mise en évidence d'altérations d'expression des miRNAs dans le cancer

Des altérations d'expression de miRNAs ont été mis en évidence dans les cancers et ces changements d'expression semblent directement impliqués dans le processus de carcinogenèse. Ces altérations conduisent, le plus souvent, soit à la surexpression de miRNAs stimulant la prolifération et la survie cellulaire (en ciblant des gènes suppresseurs de tumeurs) qui sont alors qualifiés de miRNAs oncogènes ("oncomiRs"), soit à la perte d'expression de miRNAs impliqués dans l'induction d'apoptose ou la diminution de prolifération cellulaire (en ciblant des oncogènes) qualifiés de miRNAs suppresseurs de tumeurs (Cowland et al. 2007).

Il est retrouvé une diminution ou une perte d'expression de miRNAs suppresseurs de tumeurs aussi bien au niveau des tumeurs liquides que des tumeurs solides (tableau 6) (Croce 2009, Iorio & Croce 2009). Des travaux récents ont pu démontrer l'implication d'une diminution de l'expression de la famille miR-29 dans les cancers du poumon et les leucémies myéloïdes aigües, conduisant à un taux anormalement élevé de leurs transcrits cibles codant notamment DNMT3A (Fabbri et al. 2007, Garzon et al. 2009).

En parallèle de la diminution/perte d'expression des miRNAs suppresseurs de tumeurs on retrouve généralement la stimulation/surexpression d'un certain nombre de miRNAs oncogènes dans les tumeurs (tableau 6). Les premiers miRNAs oncogènes identifiés sont miR-155 et le cluster miR-17-92 qui sont surexprimés dans les tumeurs deu sein, de la prostate ou encore certains lymphomes (Croce, 2009).

MicroRNA	***Type de modification***	***Fonction dans la cellule***	***Transcrits cibles validés***	***Suppresseur de tumeur (TS) ou oncogène (ONC)***
miR-15a et miR-16-1	Perte d'expression dans les CLL, myélomes multiples et cancers de prostate	Induisent l'apoptose et inhibent la tumorigenèse	*BCL2, WT1, RAB9B, MAGE83*	TS
let-7 (a, b, c, d, e, f, g et i)	Perte d'expression dans cancers du poumon, du sein ainsi que dans d'autres types de tumeurs solides et hématopoïétiques	Induisent l'apoptose et inhibent la tumorigenèse	*RAS, MYC, HMGA2*	TS
miR-29 (a, b et c)	Perte d'expression dans les CLL agressifs, leucémies myéloïdes aigües, cancers du sein et cholangosarcomes	Induisent l'apoptose et inhibent la tumorigenèse, réactivent l'expression de gènes supresseurs de tumeurs éteints.	*TCL1, MCL1, DNMTs*	TS
miR-34	Perte d'expression dans cancers du pancreas, du colon, du sein et du foie	Induit l'apoptose	*CDK4, CDK6, CYCLINE E2, EZF3, MET*	TS
miR-145	Perte d'expression dans cancer du sein	Inhibe la prolifération et induit l'apoptose de cellules de cancers du sein	*ERG*	TS
miR-221 et miR-222	Perte d'expression dans les leucémies erythroblastiques	Inhibent la prolifération des erythroblastes	*KIT*	TS
miR-221 et miR-222	Surexpression dans les CLL agressifs, cancers de la thyroïde et hépatocellulaires	Stimulent la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose dans les tumeurs solides	*P27, P57, PTEN, TIMP3*	ONC
miR-155	Stimulé dans les CLL agressifs, lymphoma de Burkitt, cancers du poumon, du sein et du colon	Induit la prolifération cellulaire, les leucémies ou lymphomes chez la souris	*MAF, SHIP1*	ONC
Cluster miR-17-92	Stimulé dans les cancers sein, poumon, colon, l'estomac et pancreas	Induit la prolifération	*E2F1, BIM, PTEN*	ONC
miR-21	Stimulé dans les glioblastomes, leucémies myéloïdes aigües, CLL agressifs, cancers du sein, du colon, du pancréas, du poumon, de prostate, du foie et de l'estomac	Inhibe l'apoptose et augmente la tumorigenicité	*PTEN, PDCD4, TPM1, TIMP3*	ONC
miR-372 et miR-373	Stimulés dans les tumeurs testiculaires	Stimulent la tumorigenicité en association avec l'oncogène RAS	*LATS2*	ONC

Tableau 6. Exemples de microRNAs supresseurs de tumeurs et oncogènes (d'après Croce, 2009)

6.1.2 Mécanismes conduisant aux altérations d'expression des miRNAs dans le cancer

- *Altérations d'expression via des dérégulations de la machinerie de biogenèse :*

Dans certaines tumeurs la dérégulation des taux ou de l'activité des effecteurs de biogenèse des miRNAs (principalement DROSHA ou DICER) peut entrainer des altérations dans les niveaux d'expression de miRNAs (figure 49) (Thomson et al. 2006, Iorio & Croce 2009). Ces observations ont été complétées par l'utilisation de modèles expérimentaux animaux où l'invalidation de *Dicer* entraine une accélération du développement tumoral (Kumar et al. 2007).

- *Altérations d'expression via des aberrations chromosomiques ou des mutations :*

Les premières données ayant permis d'identifier l'éventuelle implication des microRNAs dans le cancer proviennent de l'étude des translocations chromosomiques affectant l'expression miR-15a et miR-16-1 dans les leucémies lymphoïdes chroniques (figure 49) (Calin et al. 2002). Par ailleurs, l'existence de polymorphismes ou de mutations dans les gènes de miRNAs peut contribuer à la formation ou le développement de tumeurs (ex. miR-146a dans les cancers prostatiques) (Xu et al. 2009).

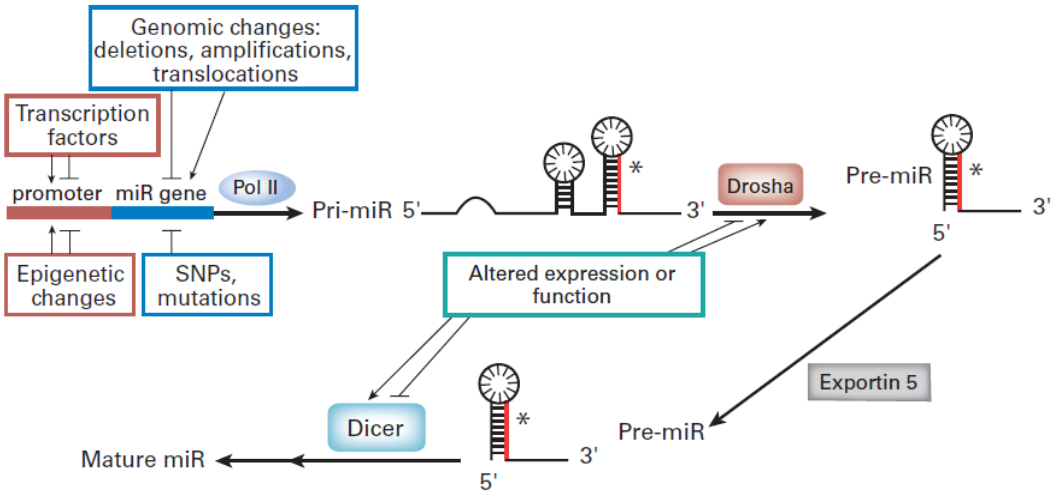


Figure 48. Mécanismes potentiels impliqués dans la dérégulation d'expression des microRNAs dans le cancer (d'après Iorio & Croce, 2009) *Les altérations d'expressions des miRNAs peuvent être dues à des anomalies chromosomiques, des mutations ou polymorphismes (SNPs), une dérégulation des facteurs de transcription, des altérations dans la machinerie de biogenèse des miRNAs (DROSHA, DICER) ou encore des modifications épigénétiques.*

- *Altérations d'expression via des modifications des facteurs de transcription :*

La dérégulation du taux de certains facteurs de transcription contrôlant l'expression de microRNAs est fréquemment retrouvée dans le cancer (figure 49). A titre d'exemple, MYC ou encore E2F1 sont souvent surexprimé dans les tumeurs, stimule notamment l'expression du cluster miR-17-92 ou du cluster MCM7 (miR-106b, -93 et -25) (Croce 2009). De même, P53 peut se lier au niveau du promoteur et activer l'expression de la famille miR-34 qui stimule dans des conditions normales l'arrêt du cycle cellulaire (Calin et al. 2009). La mutation de P53 peut donc affecter cette voie de régulation de la prolifération.

- *Altérations d'expression via des mécanismes épigénétiques :*

Un certain nombre de miRNA sont réprimés par hyperméthylation ou déacétylation au niveau de leur promoteur et le traitement de cellules cancéreuses par des inhibiteurs de méthylation de l'ADN ou des inhibiteurs d'histones déacétylases réactive l'expression d'un certain nombre de miRNA suppresseurs de tumeurs (figure 49) (Shin et al. 2009, Vrba et al. 2010). A titre d'exemple miR-127 ou miR-124a sont réprimés par des mécanismes épigénétiques dans les cancers du sein, du poumon, du colon (Cowland et al. 2007).

6.2 Les microRNAs dans l'infertilité et les cancers testiculaires

6.2.1 Les miRNAs dans l'infertilité

Un travail récent a permis par une approche microarray de caractériser le profil des miRNAs altérés chez des patients atteints d'azoospermie non obstructive (Lian et al. 2009).
Les auteurs ont démontré que les clusters de miRNA sous-exprimés se trouvent majoritairement au niveau des chromosomes 7 (cluster miR-106b), 17 (cluster miR-17-92) et X (cluster miR-106a). Les miRNAs appartenant aux clusters mir-17-92 et miR-372/373 sont diminués contribuant probablement à l'apoptose exagérée chez les patients infertiles.
Les auteurs ont également corrélé la diminution de certains miRNAs avec l'augmentation de leurs gènes cibles connus pour jouer un rôle dans la maturation testiculaire (tableau 8).

miRNAs	*Transcrit ciblé*	*Fonction*
miR-1, -181a, -221 & -9*, diminués	*TIMP3*, augmenté	Développement et différenciation testiculaire
miR-145, diminué	*SOX9*, augmenté	Maturation des cellules de Sertoli et spermatogenèse normale
miR-383, diminué	*GADD45G*, augmenté	Induction d'apoptose et inhibition du cycle cellulaire

Tableau 7. Exemple de microRNAs altérés chez des patients atteints d'azoospermie non obstructive et leurs cibles
(d'après Lian et al, 2009)

6.2.2 Les miRNAs dans le cancer testiculaire

Bien qu'il existe peu d'études à ce jour sur l'implication des miRNAs dans les cancers testiculaires, une étude d'expression globale des miRNAs dans divers types de tumeurs testiculaires à permis de mettre en évidence la surexpression de miR-19a, -21 et -155 et la diminution de miR-133a dans les séminomes comparaison de tissus sains. Au cours de ce travail, les auteurs ont également montré que le cluster miR-372-373 est fortement exprimé dans l'ensemble des tumeurs testiculaires (séminomes, carcinomes embryonnaires et tumeur du sac vitellin) où il joue un rôle oncogénique via l'inhibition du gène suppresseur de tumeurs *LATS2* (Voorhoeve et al. 2006, Gillis et al. 2007).

III - Le concept d'origines développementales de pathologies adultes

(Illustration par le Syndrome de Dysgénésie testiculaire)

1 *Définition du concept*

Le concept d'origines développementales (ou programmation fœtale/néonatale) de pathologies adultes a émergé il y a environ 25 ans. Il a été au départ proposé et très largement appuyé par les travaux de Barker (Barker 1995a, Barker 1995b, Godfrey & Barker 2001, Barker 2007).

Selon ce concept, il existe des périodes critiques au cours de développement durant lesquelles les fonctions de l'organisme et les organes sont malléables (plasticité développementale) et potentiellement sensibles à l'action de l'environnement (ex. stress environnemental). Cette plasticité d'un organisme au cours de son développement précoce permet ainsi, à partir d'un même génotype une adaptation en produisant différents états morphologiques et physiologiques (ou phénotypes) en réponse à différentes conditions environnementales. Donc dans ce concept deux facteurs importants sont à prendre en compte : (1) les facteurs génétiques de l'individu en développement permettant l'adaptation, (2) les facteurs environnementaux qui influencent la réponse de l'organisme qui se développe.

La période de plasticité développementale se situe principalement durant la vie fœtale mais peut également s'étaler au niveau de la période postnatale. Ainsi chez l'homme, il apparait que cette période de sensibilité aux facteurs de l'environnement se déroule au cours de la vie fœtale et des 2 premières années après la naissance. Une fois cette période critique dépassée l'organisme perd sa plasticité et les fonctions des différents organes sont fixées. Donc par la suite, au cours de la vie postnatale et adulte, lorsque l'environnement est différent de celui rencontré durant le développement, alors les mécanismes d'adaptation mis en place sont en décalage avec les besoins et des pathologies peuvent apparaitre (Hanson & Gluckman 2008). En résumé, une modification de l'environnement (ex.

diminution des apports nutritionnels) durant le développement fœtal ou néonatal peut induire des mécanismes d'adaptation persistants toute la vie de l'individu, mais qui engendreront diverses pathologies (ex. diabète) à long terme chez l'individu adulte s'ils sont en décalage avec l'environnement postnatal (ex. apports nutritionnels riches).

Les premières observations chez l'homme qui ont conduit Barker à émettre l'hypothèse de l'origine développementale de pathologies adultes, proviennent de l'étude de la relation entre le développement de pathologies coronaires cardiaques, de diabète et une altération de la croissance durant la vie fœtale ou du poids des individus à la naissance (Barker et al. 1989, Hales & Barker 1992). En effet, dans ces travaux initiaux il a été constaté que le risque de développer les pathologies cardiovasculaires et le diabète de type II était plus élevé chez des personnes dont le poids à la naissance était plus faible que la moyenne. Par ailleurs, un faible poids à la naissance a été démontré comme facteur prédictif de problèmes de tolérance au glucose, une augmentation de la pression sanguine et de l'hypertension. Ce type de relation entre la restriction de croissance fœtale/néonatale et le développement de pathologies cardiovasculaires ou de diabète, a par la suite été démontré sur un ensemble de populations aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis ou en Inde (Pulizzi et al. 2009, Raghupathy et al. 2010). Dans ces études épidémiologiques, le poids des individus à la naissance peut être considéré d'une manière générale comme un marqueur des perturbations ayant eu lieu in utero comme des modifications des taux d'hormones, de facteurs de croissance, des modifications épigénétiques (Johnson et al. 2009).

Un des autres exemples marquant, est l'étude des individus ayant été exposés durant la gestation à la grande famine qui a touché l'ouest des Pays-Bas au cours de la seconde guerre mondiale entre novembre 1944 et mai 1945. Ainsi, dans ce travail les auteurs ont pu mettre en évidence que l'exposition prénatale à la famine était associée à divers phénotypes métaboliques et mentaux, un taux élevé de lipides plasmatiques, un risque accru de développer des pathologies cardiovasculaires ou la schizophrénie (Heijmans et al. 2009).

D'après ces exemples, d'autres études épidémiologiques ont impliqué la programmation développementale dans l'initiation d'un certain nombre de pathologies à l'âge adulte comme les maladies cardiovasculaires, l'obésité, les maladies métaboliques ou encore le cancer. Ces études sont très souvent soutenues par des modèles expérimentaux développés chez l'animal qui visent à comprendre les mécanismes de la programmation

développementale et de les appliquer en général aux pathologies métaboliques et non métaboliques.

2 Programmation fœtale par les PEs des anomalies du tractus génital mâle : le Syndrome de Dysgénésie Testiculaire (SDT)

2.1 Mise en évidence du SDT

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études épidémiologiques ont montré une augmentation des malformations de l'appareil reproducteur (hypospadias, cryptorchidies) en particulier en Europe du Nord (Virtanen & Toppari 2008). A titre d'exemple, au Danemark il a été rapporté que presque 1% des nouveau-nés mâles présentent une cryptorchidie et environ 1% des hommes dans ce pays développent des cancers testiculaires (Skakkebæk et al. 2001). De la même façon, il a été observé une diminution de la qualité du sperme et de la fertilité dans les pays industrialisés (Jørgensen et al. 2010), bien que ces observations soient controversées (Merzenich et al. 2010). Enfin, l'incidence du cancer testiculaire a augmenté de façon importante dans les pays industrialisés. En France, une étude menée à partir de 9 registres régionaux de cancer a montré que l'incidence des cancers du testicule est passée de 3,17 en 1978 à 4,82 pour 100 000 en 2000 (Hedelin & Remontet 2002). Il a été aussi observé dans les pays scandinaves mais également dans le sud de la France un doublement de l'incidence annuelle du cancer testiculaire au cours des vingt dernières années (Ekbom 1998, Walschaerts et al. 2008).

C'est ce type d'observations qui ont conduit Skakkebaek à émettre l'hypothèse d'un syndrome associant ces trois symptômes (figure 57) : **(1)** malformations du tractus génital masculin hypospadias et cryptorchidies, **(2)** altérations de la spermatogenèse et baisse de la qualité spermatique, **(3)** cancer du testicule. Ces trois types de symptômes seraient liés entre eux et constitueraient le Syndrome de Dysgénésie Testiculaire (SDT) (Skakkebæk et al. 2001).

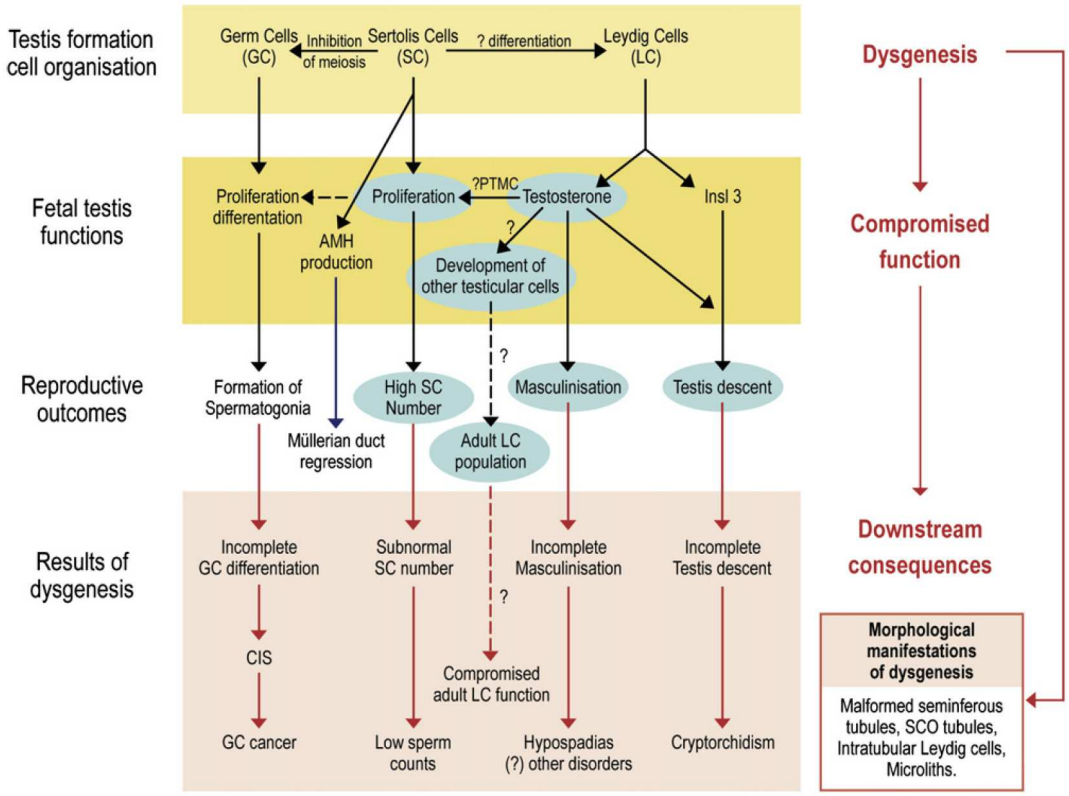


Figure 49. Schéma récapitulatif des évènements impliqués dans la genèse de la dysgénésie testiculaire au niveau du testicule fœtal
(d'après Sharpe et Skakkebaek 2008) *La dysgénésie testiculaire induit notamment des altérations de la fonction des cellules somatiques qui conduisent aux différentes altérations qui constituent le SDT (GC : cellules germinales, SC : cellules de Sertoli, LC : cellules de Leydig, PTMC : cellules péritubulaires myoïdes, CIS : carcinome in situ, SCO : sertoli cell only, Insl3 : insulin-like factor 3, AMH : hormone antimüllerienne).*

2.2 Le SDT : les arguments en faveur d'une origine fœtale

L'hypospadias caractérisé par une anomalie de positionnement (en position ventrale) de l'ouverture de l'urètre au niveau du pénis résulte d'un défaut d'action des androgènes issus du testicule fœtal (Leung & Robson 2007). La cryptorchidie ou non-descente testiculaire, est liée à des anomalies du gène Insl3 (Insuline-Like hormone 3) exprimé par les cellules de Leydig, et est dépendante de l'action des androgènes (Toppari & Kaleva 1999). Enfin, il apparaît également que le cancer testiculaire aurait également une origine développementale (voir plus loin).

2.3 Programmation fœtale du SDT et des altérations du tractus génital masculin : les perturbateurs endocriniens environnementaux et autres facteurs

2.3.1 Programmation fœtale du SDT : hypothèse des perturbateurs endocriniens environnementaux

Le SDT est une pathologie pouvant avoir plusieurs origines. Ainsi deux étiologies ont été évoquées pour être à l'origine du SDT : génétique et environnementale.

Dans le cas des formes sévères de SDT, les patients présentent l'ensemble des caractéristiques du SDT et les causes premières sont génétiques comme chez les individus possédant un caryotype 45X/46XY, les mutations au niveau du récepteur des androgènes ou encore les mutations du gène *SRY* (Wohlfahrt-Veje et al. 2009). Toutefois, le taux d'augmentation du SDT dans la population générale est incompatible avec le taux de mutations spontanées.

Les récentes observations de patients présentant seulement une partie des caractéristiques du SDT, mais également l'augmentation rapide et considérable du taux de cancers testiculaires (environ 400% en deux générations)(Richiardi et al. 2004), du taux d'hypospadias et de cryptorchidies (Caione 2009), et des altérations de la spermatogenèse ne peuvent pas être expliquées par les facteurs génétiques seuls. Donc même si les susceptibilités génétiques peuvent intervenir en partie dans le SDT, l'hypothèse de l'action de facteurs environnementaux est à prendre en considération.

Concernant l'étiologie environnementale, les auteurs ont donc émis l'hypothèse que les individus développant certaines ou toutes les caractéristiques du SDT ont été en contact avec des substances perturbant le système hormonal pendant la vie fœtale ou néonatale. Les perturbateurs endocriniens antiandrogéniques ou estrogéniques sont fortement suspectés d'interférer avec le système hormonal pendant le développement fœtal ou postnatal et pourraient induire des effets chez l'individu adulte comme le SDT (voir chapitre suivant). Des données très convaincantes appuyant ces hypothèses proviennent de la comparaison récente de l'incidence de la cryptorchidie, au cours de ces quarante dernières années, chez les nouveau-nés dans les maternités de Berlin-Est et Ouest (Ivell & Hartung 2003). La fréquence de la cryptorchidie est d'environ 3–4 % pendant la période 1965 à 1971 dans les deux parties de la ville. Ce niveau s'est maintenu à Berlin-Est pendant la décennie suivante 1972–1983 alors que pendant la même période à Berlin-Ouest l'incidence a chuté

en dessous de 1 %. Pendant la décennie 1987–1997, cette incidence décroît dans les deux parties de la ville soit moins de 0,5 % à Berlin-Ouest et moins de 2 % à Berlin-Est. La corrélation avec l'utilisation du DDT parvient à expliquer l'évolution de ces statistiques. Le DDT et son métabolite le DDE sont connus pour posséder des activités estrogénique et antiandrogénique. Ainsi, le DDT a été largement utilisé dans les deux parties de la ville depuis 1960 jusqu'en 1970, puis arrêté à Berlin-Ouest dès 1972 alors qu'il était poursuivi à Berlin-Est jusque dans les années 1980 avant d'être arrêté lors de la réunification de l'Allemagne.

Les hypothèses émises par Skakkebaek sont étayées par les données obtenues sur des modèles expérimentaux d'exposition fœtale (ou néonatale) de rongeurs aux PEs (ex. phthalates, PCBs, vinclozoline) dont les phénotypes à l'âge adulte reproduisent tout ou partie des caractéristiques du SDT (altérations de la fertilité, hypospadias, cryptorchidies) à l'exception du cancer testiculaire (voir chapitre suivant). Ainsi, les données épidémiologiques et expérimentales sont autant d'arguments qui supportent le concept de programmation précoce des altérations de la qualité du sperme ou les malformations du tractus génital mâle. Les informations sont plus parcellaires concernant les tumeurs germinales testiculaires car les modèles expérimentaux font défaut. Cependant le lien l'exposition aux PEs et le cancer testiculaire sont appuyés par le fait que : (1) les cancers testiculaires sont très fréquents chez les individus cryptorchides (Wood & Elder 2009), (2) les hommes présentant des altérations de la fertilité ont un risque plus élevé de développer le cancer du testicule (Peng et al. 2009), (3) les hommes dont la mère a été traitée par le DES durant la grossesse présentent un risque accru de développer le cancer du testicule (Goldberg & Falcone 1999).

2.3.2 Programmation fœtale des altérations du tractus génital masculin par d'autres facteurs de l'environnement

D'autres facteurs que les PEs ont été impliqués dans l'induction de malformations du tractus génital mâle et d'anomalies de fonction de la reproduction. Ainsi, il a été rapporté que le tabagisme maternel pendant la grossesse engendre des altérations du développement testiculaire se traduisant par des altérations de la spermatogenèse (Ramlau-Hansen et al. 2007). D'autre part, il a été démontré une association entre la consommation d'alcool de la mère au cours de la grossesse et l'induction de cryptorchidies chez les fils exposés (Damgaard et al. 2007).

3 Mécanismes ?

Parmi les mécanismes impliqués dans la programmation développementale de pathologies chroniques chez l'adulte, il est maintenant largement admis que les mécanismes de type épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones ou microRNAs, étude bibliographique chapitre 2) soient impliqués dans ce phénomène (Gluckman et al. 2008).

IV - Les perturbateurs endocriniens

1 Définitions et généralités

1.1 Définition

Selon l'agence américaine de protection de l'environnement (U.S. EPA), un perturbateur endocrinien (PE) est "un agent exogène interférant avec la synthèse, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison ou l'élimination des hormones endogènes qui sont normalement impliquées dans l'homéostasie, la reproduction et les processus développementaux". D'un point de vue physiologique, un PE est un composé naturel ou synthétique, qui par une exposition environnementale et/ou développementale inappropriées, va altérer le système endocrinien d'un organisme et/ou de sa descendance (Mauduit et al. 2006, Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

1.2 Nature chimique

1.2.1 Les composés synthétiques

Les composés synthétiques ayant une activité de perturbateur endocrinien peuvent être : (1) des substances chimiques utilisés comme solvant industriel ou lubrifiant et leurs produits de dégradation (ex. diphényles polychlorés/PCBs, dyphényles polybromés/PBBs, dioxines), des plastiques (ex. bisphénol A/BPA), des agents plastifiants (ex. phthalates), des pesticides (ex. méthoxychlore, dichlorodiphenyltrichloroethane/DDT), des fongicides (ex. vinclozoline); (2) des hormones de synthèse comme les contraceptifs oraux, les traitements de substitution ou encore certains additifs pour l'alimentation animale (ex. diethylstilbestrol/DES) (Mauduit et al. 2006).

1.2.2 Les composés naturels

Les composés chimiques naturels qui sont retrouvés dans l'alimentation humaine et animale peuvent agir comme des perturbateurs endocriniens. Ils sont généralement retrouvés dans les plantes (phytoestrogènes, ex. génistéine, daidzéine) ou bien synthétisés

par des microorganismes (ex. zéaralénone). Ces substances métabolisées par l'organisme sont non lipophiles donc ne s'accumulent pas au niveau des graisses et possèdent très souvent une faible affinité pour les récepteurs hormonaux comme les ERs. Cependant il convient de prendre en compte leur activité PE étant donné qu'ils sont souvent consommés chaque jour via l'alimentation.

1.3 Mécanismes d'actions

1.3.1 Différents mécanisme d'action possibles

Les effets délétères des PEs s'exerce principalement sur trois axes hormonaux : l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade, l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde et l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénales. Au départ il a été proposé que la cible primaire des PEs était l'interférence avec les récepteurs nucléaires aux hormones tels les récepteurs des estrogènes (ERs), le récepteur des androgènes (AR), les récepteurs à la progestérone (PR), les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs), le récepteur au glucocortocoïdes (GR) ou encore les récepteurs aux rétinoïdes (Swedenborg et al. 2009). Des études plus approfondies ont finalement montré que leur mode d'action semble plus large en agissant, certes via les récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes, mais également via les récepteurs non nucléaires aux hormones stéroïdes (ex. ERs membranaires), les récepteurs non stéroïdiens (ex. récepteurs aux neurotransmetteurs), les récepteurs orphelins (ex. AhR, Aryl Hydrocarbon Receptor), les voies enzymatiques impliquées dans la synthèse des hormones stéroïdes et d'autres mécanismes qui conduisent au système hormonal ou le système reproducteur (Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

Actuellement, la majeure partie des données connues sur le mode d'action des perturbateurs endocriniens porte sur leur capacité d'interférer au niveau des récepteurs nucléaires hormonaux. Dans notre description nous nous focaliseront sur des composés à activité perturbateurs endocriniens pouvant induire des effets au niveau de l'appareil reproducteur mâle et plus spécifiquement au niveau testiculaire. Ces perturbateurs endocriniens ont généralement une activité de type estrogénique, antiestrogénique ou antiandrogénique. Nous décrirons brièvement quelques autres modes d'action suspectés des perturbateurs endocriniens.

1.3.2 Interférence au niveau des récepteurs nucléaires hormonaux

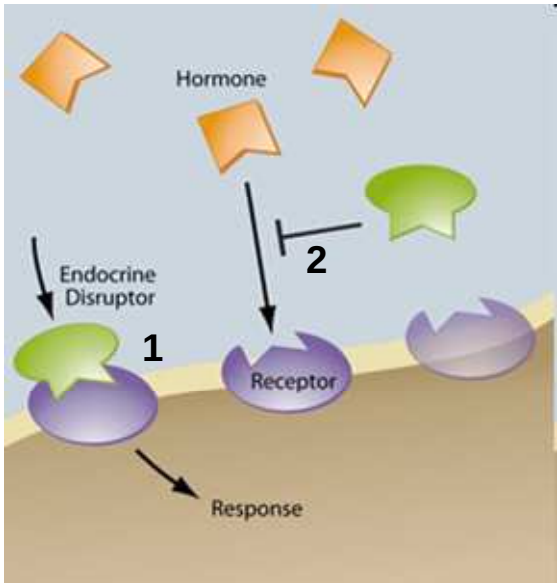


Figure 50. Mécanismes classiques d'interférence des perturbateurs endocriniens au niveau des récepteurs nucléaires aux hormones (d'après http://www.niehs.nih.gov/news/newsletter/2009/july/images/endocrine-disruptor-graphic.jpg).

L'interférence au niveau des récepteurs hormonaux peut se faire par différents mécanismes (figure 50) :

- La liaison du PE au niveau du récepteur nucléaire mime l'action d'une hormone endogène (effet agoniste) et induit des effets similaires à ceux de l'hormone notamment par l'activation de transcription des gènes en aval (ex. PE à activité estrogénique : DES, PE à activité androgénique : triclosan).
- La liaison du PE au niveau du récepteur nucléaire empêche la liaison de l'hormone endogène (effet antagoniste) et donc inhibe l'activité du récepteur dans la transcription de gènes cibles (ex. PE à activité antiandrogénique : vinclozoline).

1.3.3 Exemples d'autres mécanismes d'action des PEs

Les PEs peuvent induire des altérations au niveau de la signalisation hormonale par :

- La modulation du recrutement de coactivateurs ou corépresseurs nécessaires à l'action des récepteurs nucléaires. Ainsi, le traitement périnatal par le bisphénol A (BPA) induit une modification d'expression testiculaire de cofacteurs de récepteurs des stéroïdes comme SRC-1 et NCoR (Salian et al. 2009a).
- La régulation protéique du récepteur nucléaire et/ou de ses cofacteurs par la voie de dégradation du protéasome. Par exemple, il a été mis en évidence que la liaison de

certains composés à activité antiestrogéniques au niveau du récepteur AhR induit la dégradation de ERα par le protéasome (Safe et al. 2000).

- Les PEs peuvent altérer la biodisponibilité des hormones endogènes en modulant leur synthèse et leur catabolisme.

2 Exemples de perturbateurs endocriniens : effets sur le testicule et l'appareil reproducteur mâle

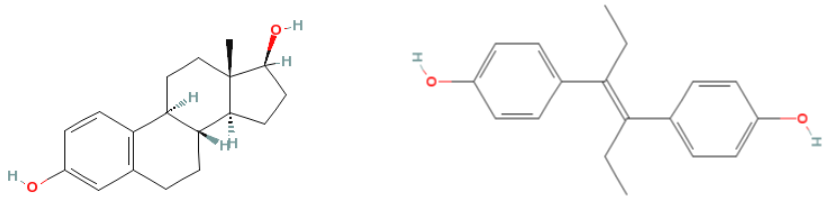
Etant donné le très grand nombre de fonctions physiologiques pouvant être affectées par l'exposition aux perturbateurs endocriniens, nous avons choisi de focaliser notre description sur les perturbateurs endocriniens connus pour affecter l'appareil reproducteur mâle et en particulier le testicule. En outre, les études sur les animaux de laboratoire montrent que l'exposition à un type de PE ou en mixtures peut altérer le tractus génital mâle ou femelle (Sharpe 2010a). D'une manière générale les molécules à activité estrogéniques ont un effet aussi bien chez les mâles que les femelles, tandis que les molécules à activité androgénique affecteront les femelles et les antiandrogènes affectent les mâles (Toppari 2008).

2.1 Perturbateurs endocriniens synthétiques

2.1.1 Le diethylstilbestrol (DES) – PE estrogénomimétique

Le DES est un puissant analogue d'estrogènes de type non stéroïdien (figure 51) qui à été très utilisé au départ chez la femme enceinte entre les années 40 et 70, pour limiter les risques de fausse-couches et d'accouchements prématurés. Ainsi, un grand nombre de données chez l'homme et l'animal sont disponibles concernant les effets du DES. Les premières données concernant les effets néfastes du DES ont été obtenues lors de la mise en évidence d'un risque accru d'adénocarcinomes du vagin chez les filles dont les mères avaient pris du DES lors de leur grossesse. Par la suite, un certain nombre d'études épidémiologiques ont clairement mis en évidence un lien entre l'exposition durant la vie fœtale au DES et l'apparition de malformations de l'appareil reproducteur ainsi qu'un risque accru de développement de cancers (Newbold et al. 2006). Des études épidémiologiques ont

ainsi pu mettre en évidence une augmentation du risque de développement d'hypospadias, de cryptorchidies, de kystes épididymaires et de l'inflammation testiculaire chez les fils de femmes traités au DES pendant leur grossesse (Klip et al. 2002, Palmer et al. 2009).



Estradiol **Diethylstilbestrol**

Figure 51. Différences de structure entre l'estradiol et le diethylstibestrol

L'exposition prénatale de souris mâles au DES induit principalement via ERα des effets néfastes comparables à ceux observés chez l'homme comme la non-descente testiculaire, des kystes épididymaires, la rétention des canaux Mülleriens et des altérations de la spermatogenèse (Cederroth et al. 2007, Toppari 2008). L'exposition néonatale au DES chez le rongeur (ex. 10 µg/kg*jour chez le rat entre 1-12 jpn) induit des altérations au niveau de l'appareil reproducteur mâle caractérisées par une chute du poids des testicules, des épididymes, des vésicules séminales ainsi que de fortes altérations de la spermatogenèse par apoptose des cellules germinales (Goyal et al. 2003, Delbès et al. 2006, Mathews et al. 2009, Volle et al. 2009).

Actuellement, les données concernant l'exposition au DES obtenues chez l'homme, sont les seules à établir un lien indiscutable entre l'exposition à un PE durant la gestation et l'apparition de pathologies (troubles de la fertilité et cancers).

2.1.2 Le bisphénol A (BPA) – PE estrogénomimétique ?

Le BPA est un composé synthétique utilisé dans la production des plastiques polycarbonates et des résines époxy, c'est un des produits chimiques dont les taux de production sont les plus élevés dans le monde. On le retrouve par exemple, dans le revêtement des boîtes de conserve, certains biberons ou encore dans les résines d'obturation utilisées en dentisterie. Aux Etats-Unis, la forme conjuguée du BPA est retrouvée dans l'urine dans 93% de la population (Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

Le BPA a, au départ, été classé comme un PE ayant une activité estrogéno-mimétique sur la base d'études in vitro, mais il apparait que son affinité pour les ERs est de 1000 à 10000 fois inférieure en comparaison de l'estradiol ou du DES (Vandenberg et al. 2009). D'autre part le BPA aurait la capacité d'induire les récepteurs aux estrogènes à travers des voies non génomiques impliquant des ERs membranaires couplés aux protéines G (Bouskine et al. 2009).

Selon les travaux en fonction de la voie d'administration (gavage ou injections), de la dose administrée, mais également en fonction de la période d'exposition (fœtale, néonatale ou adulte), les données concernant un éventuel impact du BPA de la spermatogenèse sont controversées. En effet, certains auteurs ont rapporté des effets délétères sur le testicule via des altérations au niveau des cellules de Sertoli et des cellules germinales (Li et al. 2009, Salian et al. 2009b), tandis que d'autres auteurs ont soit démontré des effets transitoires soit l'absence d'altérations du testicule et de la spermatogenèse (Nagao et al. 1999, Williams et al. 2001, Toyama & Yuasa 2004, Kato et al. 2006).

Finalement, des données récentes alimentent de nouveau la controverse suggérant également que le BPA ne devrait plus être considéré comme un PE de type estrogeno-mimétique, étant donné que peu de travaux parviennent à reproduire in vivo des effets comparables aux molécules ayant une activité estrogénique bien caractérisée (ex. ethinyl estradiol) (Sharpe 2010b).

2.1.3 La vinclozoline – PE antiandrogénique

La vinclozoline est un fongicide très largement utilisé dans les cultures viticoles, de fruits et légumes, de céréales ou pour les plantes ornementales.

La vinclozoline agit au niveau du système hormonal via deux de ses métabolites (M1 et M2), qui ont été démontrés comme agissant en tant qu'antagonistes du récepteur des androgènes (AR) (Nellemann et al. 2003). L'affinité du métabolite M2 pour AR est 50 fois supérieure au M1, et à titre de comparaison deux fois moins par rapport à l'antiandrogène hydroxyflutamide (Kavlock & Cummings 2005). La vinclozoline peut ainsi inhiber la transactivation du récepteur des androgènes, faciliter la dégradation des androgènes (conversion en estrogènes des androgènes non liés à l'AR) et inhiber l'expression de gènes androgénodépendants. Au regard de son mode d'action, l'exposition à la vinclozoline pourrait vraisemblablement causer des anomalies chez l'homme, mais actuellement aucune

étude épidémiologique fiable n'a encore établi un lien avec la pathologie humaine. La majeure partie des informations proviennent donc des modèles expérimentaux animaux.

L'administration de vinclozoline chez l'animal à différentes doses, par différentes voies (injections, gavages), et à différentes périodes (fœtale, néonatale, puberté, adulte) engendre diverses anomalies de l'appareil reproducteur comme : la diminution de la distance anogénitale, la rétention des mamelons, des hypospadias, des cryptorchidies, et une diminution de poids de la prostate ventrale, des vésicules séminales, des épididymes et une réduction du nombre de spermatozoïdes (Gray et al. 1999, Yu et al. 2004). Cependant, d'après l'étude de Wolf et al. (2000), il ressort que la période de sensibilité accrue à la vinclozoline est la période fœtale dont la période la plus critique se situe aux 16ème et 17ème jours post-coïtum (Wolf et al. 2000). Des travaux ont ainsi permis de démontrer qu'une exposition fœtale de rongeurs à la vinclozoline (dès 100 mg/kg*j) altère la différenciation sexuelle chez le mâle, qui se traduisent à long terme chez l'individu adulte par des altérations de la spermatogenèse et au niveau prostatique (atrophie, inflammation et hyperplasie), sans qu'il y ait pour autant d'altération au niveau des taux plasmatiques de testostérone (Wolf et al. 2000, Anway et al. 2005, Anway & Skinner 2008, Elzeinova et al. 2008, Cowin et al. 2010). Au niveau du testicule fœtal, les auteurs ont mis en évidence une augmentation d'apoptose des cellules germinales juste après l'arrêt du traitement (Anway et al. 2008). Au niveau du testicule adulte, l'exposition fœtale à la vinclozoline induit une apoptose des cellules germinales ainsi qu'une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes (Anway et al. 2005 & 2008, Eustache et al. 2009, Cowin et al. 2010). En utilisant ce même type de modèle expérimental, il a été démontré que les animaux développent également d'autres pathologie (ex. adénomes et carcinomes mammaires, anomalies des tubules rénaux) (Anway et al. 2006).

2.1.4 Les phthalates – PEs antiandrogéniques

Les phthalates (esters d'acide phthalique) sont des composés chimiques très utilisés dans l'industrie en tant qu'agents plastifiants notamment au niveau du PVC (emballages alimentaires, adhésifs, matériaux de constructions, peintures etc…) ou encore comme solvants (colorants, insecticides etc…). Etant donné que les phthalates ne sont pas liés de façon covalente à la matrice dans laquelle ils sont ajoutés, ils peuvent donc progressivement être libérés avec le temps. Ainsi, l'homme est continuellement exposé aux phthalates via la

voie orale, cutanée et par inhalations. Les phthalates les plus largement utilisés sont le di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) et le dibutyl phthalate (DBP), qui sont métabolisés dans l'organisme en mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) et mono-butyl phthalate (MBP) respectivement (Habert et al. 2009). Il existe d'autres phthalates comme le benzyl butyl phthalate (BBP) et le di-isononyl phthalate. Chez l'homme, les données ne permettent pas de conclure sur un lien éventuel entre l'exposition aux phthalates et la qualité spermatique (Hauser & Sokol 2008). Ainsi des études ont pu corréler la concentration urinaire en phthalates chez la mère et la diminution de distance anogénitale chez les fils caractéristique d'un effet antiandrogénique (Marsee et al. 2006), ou encore la concentration urinaire en certains phthalates chez des hommes et une réduction de la qualité spermatique ou de leur fertilité (Hauser et al. 2006, Wirth et al. 2008). Tandis que d'autres travaux ne parviennent pas à identifier une relation entre l'exposition aux phthalates et la qualité spermatique (Jönsson et al. 2005).

Les phthalates DEHP, DBP et BBP sont majoritairement connus pour affecter la biosynthèse des androgènes (Toppari 2008). Ainsi, dans les études in vivo chez le rongeur, le DEHP induit des altérations de l'appareil reproducteur mâle majoritairement par une action antiandrogénique dont les mécanismes ne sont pas encore bien décryptés. D'après, Parks et al. (2000), le DEHP n'interagirait pas avec le AR (Parks et al. 2000), mais des approches in vitro utilisant des gènes rapporteur luciférase ont récemment permis de montrer que le DBP, le MBP et le DEHP possèdent tout de même une activité antiandrogénique via leur liaison au niveau du récepteur des androgènes en présence de testostérone (activité antiandrogénique MBP >DBP > DEHP), une activité androgénique en l'absence de testostérone (activité androgénique MBP > DEHP > DBP) et une faible activité estrogénique pour le DBP (Shen et al. 2009).

Ainsi, l'exposition fœtale aux différents phthalates (par ex. 500 mg/kg*j de DBP) induit diverses anomalies de la différenciation des organes androgénodépendants et des malformations au niveau de l'appareil reproducteur mâle (Foster 2006). Chez les animaux adultes, il est observé l'ensemble des caractéristiques du syndrome dysgénésie testiculaire (excepté le cancer testiculaire) avec : des anomalies au niveau de la maturation de cellules de Leydig, de production de testostérone chez le fœtus et l'adulte, des altérations de la prolifération et de la fonction des cellules de Sertoli et, des altérations de la spermatogenèse associées à l'infertilité (Howdeshell et al. 2008, Habert et al. 2009).

2.1.5 Les polychlorobiphényles (PCBs) – PE antiandrogéniques

Les PCBs ont largement été utilisés depuis les années 30 jusqu'à leur interdiction dans les années 70, comme fluides isolant dans les composants électriques (transformateurs, condensateurs), comme fluides hydrauliques, comme produits d'imprégnation du bois et du papier, ou encore comme plastifiants (peintures, laques). Du fait de leur utilisation large, de leur très grande stabilité et de leur nature lipophile (possibilité d'accumulation dans les graisses), ils sont des polluants persistants très redoutables en terme de toxicité induite sur du long terme. Chez l'homme, la source d'exposition première est l'alimentation. Même si le lien entre exposition aux PCBs et les altérations de la fertilité ne sont pas clairement établis, différentes études épidémiologiques réalisées chez l'homme ont établi une association entre l'exposition aux PCBs environnementaux et une diminution de la qualité spermatique en particulier au niveau de la motilité (pour revue Hauser & Sokol 2008).

D'une manière générale, il a été montré dans différentes études que les PCBs avaient la capacité d'altérer la synthèse d'androgènes en dérégulant l'expression de certains gènes codant les enzymes stéroïdogéniques (Murugesan et al. 2008). Les PCBs peuvent affecter le tractus génital mâle par des mécanismes impliquant l'Aryl-hydrocarbon Receptor (AhR) en perturbant la synthèse des estrogènes. Ainsi, il a été rapporté que le PCB 126 stimule l'expression de l'aromatase (CYP19) via le AhR (Li 2007).

Un certain nombre des travaux publiés ont étudié l'impact à long terme des PCBs sur le testicule et la spermatogenèse par des approches d'exposition fœtale de rongeurs à ces molécules. Par exemple, l'exposition fœtale au PCB 126 (13-19 jpc ; 7,5 µg/kg*j) ou au PCB 132 (dose unique à 15 jpc, 1 ou 10 mg/kg) induisent, chez l'animal adulte, des altérations de la production de sperme notamment via l'induction d'apoptose des cellules germinales (Wakui et al. 2007, Hsu et al. 2007). Les PCBs peuvent également altérer in vitro la viabilité et la fonction des cellules de Sertoli (Krishnamoorthy et al. 2005). Par ailleurs, l'exposition prénatale (7-21 jpc) à certains PCBs (PCB 126 à 3 µg/kg*j ou PCB 169 à 30µg/kg*j) a des effets sur la spermatogenèse via l'altération de la stéroïdogenèse (Yamamoto, 2005).

2.1.6 Le méthoxychlore – PE estrogénomimétique et/ou antiandrogénique

Le méthoxychlore est un insecticide organochloré utilisé pour éliminer les parasites du bétail et pour lutter contre les nuisibles des plantes ornementales, fruits et légumes. Un

certain nombre de travaux ont rapporté que l'exposition au méthoxychlore peut induire des anomalies de la différenciation sexuelle, de la formation des gonades et de la reproduction chez le mâle et la femelle.

Il existe plusieurs types de métabolites issus du méthoxychlore qui auront soit une activité agoniste du récepteur ERα, soit une activité antagoniste de ERβ ou encore une activité antiandrogénique (Skinner & Anway 2005). Le métabolite le plus actif est le 2,2-bis (p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane (HPTE) qui comme le methoxychlore possède une activité estrogénique faible.

Une exposition au méthoxychlore durant la période fœtale uniquement (par ex. dès 50 ou 150 mg/kg*j) ou associée à une exposition postnatale induit un phénotype d'infertilité chez le rat adulte caractérisé par une augmentation de l'apoptose des cellules germinales, une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes (Johnson et al. 2002, Cupp et al. 2003, Anway et al. 2005). Par des approches in vitro, certains travaux ont démontré que le méthoxychlore pouvait induire des altérations de production de testostérone par les cellules de Leydig ainsi que des perturbations dans la formation des cordons testiculaires (Cupp & Skinner 2001, Murono et al. 2006).

2.2 Perturbateurs endocriniens d'origine naturelle

2.2.1 Génistéine – PE estrogénomimétique

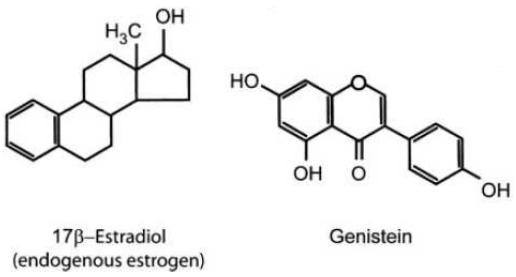


Figure 52. Structure de la génistéine comparée au 17β-estradiol

La génistéine est un phytoestrogène de type isoflavone qui a la capacité d'interagir avec le récepteur des estrogènes et de multiples autres cibles moléculaires. L'exposition humaine se fait notamment par la consommation de soja, de produits infantiles ou de compléments alimentaires dérivés du soja. Jusqu'à présent les études menées chez l'homme

ont plutôt porté sur effet protecteur des phytoestrogènes sur le développement de cancers comme le cancer du sein.

La génistéine agit comme un estrogène non stéroïdien avec une activité estrogénique faible en se liant directement au niveau des récepteurs aux estrogènes (figure 52). L'utilisation de souris transgéniques (gène luciférase couplé à des éléments de réponse aux estrogènes) a permis de montrer que la génistéine, administrée par voie orale ou par le lait maternel, pouvait entrainer au niveau testiculaire l'activation transcriptionnelle médiée par les ERs (Montani et al. 2008, 2009).

Des approches in vitro sur des spermatozoïdes humains et murins ont permis de mettre en évidence un effet positif de la génistéine qui stimulerait de manière inapropriée la capacitation et la réaction acrosomique (Fraser et al. 2006). Différentes études *in vivo* impliquant l'exposition fœtale, durant la lactation ou encore chez l'adulte ont été réalisées, mais les résultats à ce jour restent encore équivoques. En effet, quelques études ont montré que l'exposition de rongeur mâles à de forte doses de génistéine ou à une alimentation riche en soja durant la vie périnatale entraine différentes anomalies : réduction de la distance anogénitale, diminution des taux de testostérone, diminution du poids des testicules associée à des altérations de la spermatogenèse et de la prostate ainsi qu'une démasculinisation (Delclos et al. 2001, Wisniewski et al. 2003). A l'inverse certaines études ne montrent pas d'effet de la génistéine administrée in utero sur la distance anogénitale ni sur les poids des organes hormonodépendants chez le rat mâle (Masutomi 2003, Faqi et al. 2004). Finalement chez des rats adultes, l'utilisation de régime riche en phytoestrogènes induit des altérations de la spermatogenèse caractérisée par l'apoptose des spermatocytes et spermatides rondes, et ceci, sans changement de taux des gonadotrophines plasmatiques et de testostérone testiculaire (Assinder et al. 2006).

2.2.2 Zéaralénone (ZEA) – PE estrogénomimétique

La zéaralénone (ZEA) est une mycotoxine produite par les moisissures de type Fusarium (ex. F. graminearum, F. culmorum) qui contaminent les céréales stockées dans des conditions trop humides (ex. sillots à grains). La zéaralénone et un de ses métabolites α-zéaralénol est très souvent retrouvée dans différents types de céréales (maïs, orge, blé, avoine, sésame) qui constituent la matière première dans divers produits alimentaires pour l'homme et les animaux (Zinedine et al. 2007). Des travaux ont rapporté que l'exposition à la

ZEA peut engendrer une diminution de la survie embryonnaire, de la taille des portées à la naissance, des anomalies du tractus génital chez le mâle ou la femelle aussi bien chez des animaux de laboratoire que domestiques (Zinedine et al. 2007).

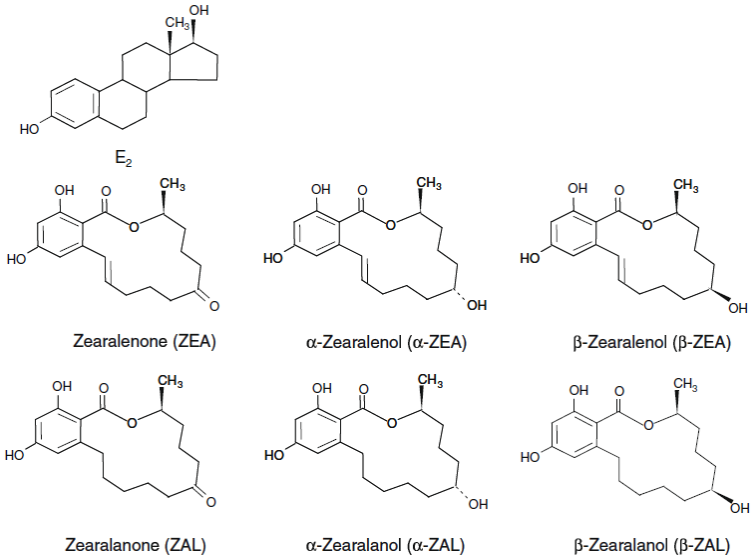


Figure 53. Structure de la zéaralénone et ses dérivés comparée à l'estradiol (E2)

Il apparait que la zéaralénone et ses métabolites α-zéaralénol (α-ZOL), β-zéaralénol (β-ZOL), zearalanone (ZAL), α-zéaralanol (α-ZAL), β-zéaralanol (β-ZAL), peuvent agir en tant que PEs estrogéno-mimétiques non stéroïdiens au niveau des récepteurs aux estrogènes (figure 53). Ainsi, Kuiper et al. ont identifié pour la ZEA, une action agoniste de ERα et une action mixte agoniste-antagoniste au niveau de ERβ (Kuiper et al. 1998). Par ailleurs, d'après des approches in vitro couplées une analyse transcriptomique focalisée sur les gènes estrogénodépendants, l'action estrogénique de la ZEA et de ses métabolites à faible doses serait globalement assez proche de l'action de l'estradiol (Parveen et al. 2009). D'après ce même travail, l'effet estrogénique de la ZEA et ses dérivés a pu être classé en allant du composé le plus estrogénique au moins estrogénique comme suit : α-ZOL = α-ZAL > ZAL > ZEA = β-ZAL > β-ZOL.

L'exposition de rongeurs ou d'autres animaux de laboratoire à la ZEA entraine la plupart du temps des effets divers de type estrogénique comme la diminution de fertilité, des augmentations de létalité embryonnaire, la diminution de taille des portées, des modifications des taux d'hormones sériques (progéstérone, estradiol)(Ruzsás et al. 1979, Zinedine et al. 2007). Plus spécifiquement au niveau de l'appareil reproducteur mâle, l'injection postnatale de ZEA (5-15 jpn, 4 et 40 µg/j) induit des effets testiculaires

comparables à l'estradiol comme : la diminution de poids du testicule, du diamètre et de la longueur des tubes séminifères, une chute du nombre de cellules de Sertoli et de spermatogonies (Filipiak et al. 2009). Par ailleurs, des travaux chez le rongeur adulte, montrent que l'injection de ZEA ou α-ZOL induit de l'apoptose au niveau des cellules germinales (principalement spermatogonies et spermatocytes) qui se traduit par une diminution du poids testiculaire et une diminution de la production de sperme (Kim et al. 2003, Yang et al. 2007). In vitro, la ZEA et le α-ZOL inhibent la steroidogenèse au niveau de la cellule de Leydig via une répression de la transcription des gènes 3β-HSD, P450scc et StAR (Yang, Zhang, et al. 2007).

2.3 Composés modèles de PEs et leur action sur l'appareil reproducteur mâle

2.3.1 Modèles d'exposition aux estrogènes

Afin de mieux comprendre le rôle et les mécanismes potentiels impliqués dans la perturbation par les xénoestrogènes du développement et de la maturation du tractus génital mâle, beaucoup de travaux ont consisté en l'administration (injection ou gavage) de rongeurs (rats et souris) par des composés pharmacologiques à activité estrogénique pure. Parmi ces composés analogues d'estrogènes on retrouve très souvent l'estradiol (17β-estradiol) ou des composés dérivés de l'estradiol comme l'estradiol benzoate (EB) ou encore l'ethinyl estradiol (EE) (figure 54). L'exposition à de tels composés vise à reproduire les perturbations du signal estrogénique, généralement des activations inappropriées, induites par la liaison des xénoestrogènes au niveau des récepteurs hormonaux et ceci à différentes périodes critiques du développement.

Ces estrogènes de synthèse ont la capacité de lier les récepteurs aux estrogènes ERα et β (voie génomique), ou encore à des récepteurs aux estrogènes membranaires (voie non génomique) ou d'autres facteurs de signalisation non-ER pour activer au niveau nucléaire la transcription de gènes cibles des estrogènes possédant des Estrogen Responsive Elements (ERE) (figure 55).

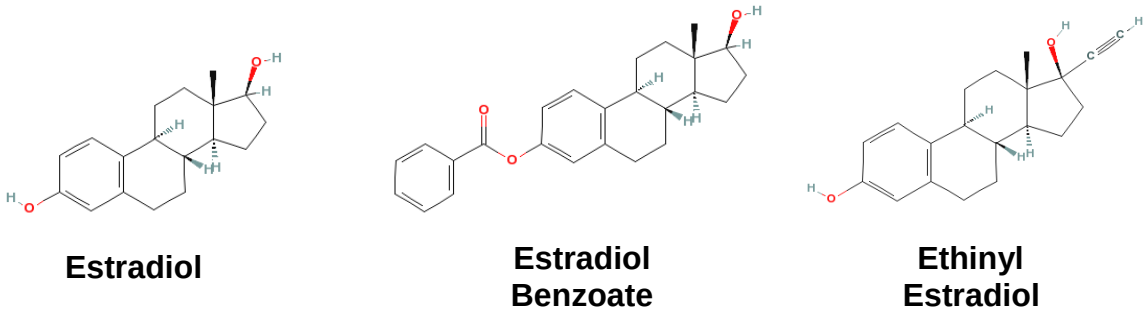


Figure 54. Structures de l'estradiol (17β-estradiol) et des ses analogues synthétiques

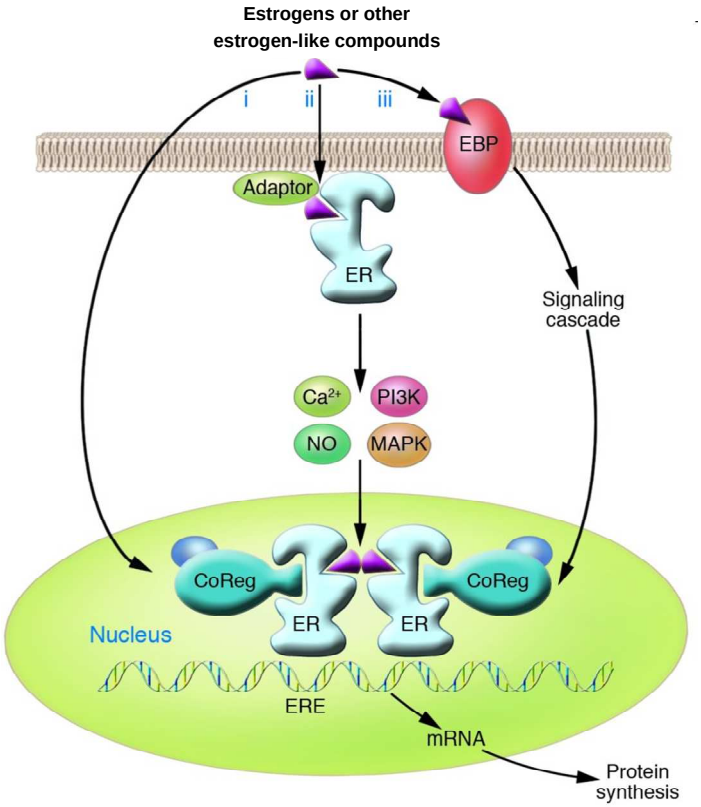


Figure 55. Représentation simplifiée des voies d'action génomique et non génomique des estrogènes et composés estrogéno-mimétiques

(d'après Deroo & Korach 2006) *Les estrogènes ou composés à activité estrogéno-mimétique peuvent :* ***(i)*** *agir selon une voie classique génomique en se liant aux ERs et ainsi activer la transcription des gènes possédant des ERE au niveau du noyau via le recrutement de cofacteurs régulateurs (CoRegs) comme des coactivateurs,* ***(ii)*** *agir selon une voie non-génomique rapide via des ERs situés dans ou près de la membrane plasmique grâce à des facteurs adaptateurs (ex. récepteur couplé aux proétines G comme GPR30), cette voie active rapidement les mécanismes de signalisation intracellulaires (ex. kinases) pour moduler la transcription des gènes cibles,* ***(iii)*** *agir via des Estrogens Binding Proteins différentes des ERs qui activent également la signalisation intracellulaire.*

L'exposition aux estrogènes purs a globalement des effets néfastes sur la maturation du tractus génital mâle, sur le testicule et la spermatogenèse. Le tableau 9 résume de manière non exhaustive des données représentatives de l'effet des perturbations estrogéniques sur le tractus génital mâle et le testicule. De manière simplifiée, l'exposition pendant la vie fœtale engendre des perturbations très marquées du développement sexuel avec notamment l'induction de non-descente testiculaire (cryptorchidies) (Nef et al. 2000). L'exposition néonatale aux estrogènes a également fait l'objet de nombreux travaux (tableau 8). Ainsi, l'administration néonatale de composés estrogéniques peut induire une diminution de la production de testostérone et des gonadotrophines (Atnassova et al. 1999, Tena-Sempere et al. 2000, Putz et al. 2001), des altérations du développement testiculaire et du reste de l'appareil reproducteur mâle (tableau 8) (Kincl et al. 1963, Nagao et al. 1999, Putz et al. 2001). Cette même fenêtre d'exposition peut entrainer des effets testiculaires irréversibles à long terme chez les animaux matures comme : (1) des altérations de la maturation et du nombre des cellules germinales, (2) des anomalies au niveau des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig (tableau 8) (Kincl et al. 1963, Aceitero et al. 1998, Toyama et al. 2004, Sharpe et al. 1998). Enfin, le traitement chronique à l'âge adulte donne des effets globalement assez similaires à l'effet observé par le traitement néonatal (Toyama et al. 2001, Hossaini et al. 2003).

Voie d'administration	***Molécule***	***Dose***	***Animal, souche***	***Age traitement et/ou durée de traitement***	***Age observations***	***Observations***	***Références***
Injection mères gestantes	17β-estradiol	6 mg par injection	Souris, CD1	Traitement in utero 13,5 jpc	17,5 jpc, J0	Cryptorchidies	(Nef et al. 2000)
Gavage mères gestantes	Ethinyl estradiol	0,02 à 2mg/kg par jour	Souris, Jc1:MCR	Traitement in utero, 11 à 17 jpc	18 jpc	Ovotestis, cryptorchidies, ↗ gonocytes, ↘ cellules de Sertoli, hyperplasie cellules de Leydig	(Yasuda et al. 1985), (Yasuda, Kihara, Tanimura, et al. 1985)
Injection sous-cutanée	EB	50 µg par injection	Rat, Wistar	Néonatal, J1	J1 à J45	↘ FSH, LH et testostérone	(Tena-Sempere et al. 2000)
Injection sous-cutanée	EB	500 µg par injection	Rat, (?)	Néonatal, J1	J10	↘ testostérone intra-testiculaire	(Bellido et al. 1990)
Injection sous-cutanée	EB	100 et 200 mg/kg par injection	Rat, Wistar	Néonatal, J1	J10, 22, 33, 45 et 60	↘ épaisseur épithélium séminifère, dilatation rete testis, retard de maturation des cellules de Leydig	(Aceitero et al. 1998)
Injection sous-cutanée	EB	30 et 120 µg par injection	Rat, (?)	Néonatal, J5	Adulte	Infertilité, inhibition spermatogenèse, atrophie des glandes accessoires	(KINCL et al. 1963)
Injection sous-cutanée	EB	2 mg/kg par jour	Rat, Sprague-Dawley	Néonatal, J1 à 5	J21, 90 et 105	↘ capacités à s'accoupler, ↘ poids testis, ↘ poids épididyme, ↘ cellules germinales + atrophie tubes séminifères, prostatite + infiltrations lymphocytaires de la prostate	(Nagao et al. 1999)
Injection sous-cutanée	EB	0,015 µg/kg à 15 mg/kg par jour	Rat, Sprague-Dawley et Fisher	Néonatal, J1, J3 et J5	J35 et 90	↘ testostérone circulante à J90 (fortes doses), épididymes, prostates (faibles doses), ↘ poids testis, épididymes, vésicules séminales et prostates (fortes doses), souche Fisher plus sensible	(Putz, Schwartz, LeBlanc, et al. 2001)
Injection sous-cutanée	17β-estradiol	10 µg/jour	Souris, Swiss	Néonatal, J1 à J9	J10	↘ testostérone circulante	(Cooke & Eroschenko 1990)
Injection sous-cutanée	17β-estradiol, EB	6,25 à 125 ng/jour	Souris, ICR	Néonatal, J1, J3, J5, J7, J9 et J11	2 à 10 semaines	Altération de morphologie des spermatides et spermatozoïdes, Animaux fertiles, effet transitoire réversé chez les adultes	(Toyama et al. 2004)
Injection sous-cutanée	17β-estradiol, EB	12,5 à 500 ng/jour	Rat, Wistar	Néonatal, J1, J3, J5, J7, J9 et J11	2 à 10 semaines		

Tableau 8. Récapitulatif non exhaustif des effets induits sur l'appareil reproducteur mâle par l'exposition aux estrogènes purs à différentes fenêtres d'exposition

Voie d'administration	*Molécule*	*Dose*	*Animal, souche*	*Age traitement et/ou durée de traitement*	*Age observations*	*Observations*	*Références*
Injection sous-cutanée	EB	12,5 µg par jour	Rat, Wistar	Néonatal, J5 à J15	J16	↘ poids testis, ↘ diamètre tubes séminifères, défauts de maturation des cellules de Sertoli, ↗ apoptose des cellules germinales et des cellules de Sertoli	(Walczak-Jedrzejowska et al. 2007)
Injection sous-cutanée	Ethinyl estradiol	10 µg/jour	Rat, Wistar	Néonatal, J2, J4, J6, J8, J10, J12	J18, 75 et 90	↘ poids testis dose-dépendant, ↘ nombre de cellules de Sertoli (J18), ↘ proportion de cellules germinales dans testis, ↘ sécrétion de testostérone, ↘ FSH mais pas de LH	(Sharpe et al. 1998) (Atnassova et al. 1999)
Injection sous-cutanée	Ethinyl estradiol	1 µg/kg à 1mg/kg par jour	Rat, (?)	Néonatal, J1-J11	Animal pré-pubère et adulte	Malformations du pénis, ↘ poids testis, épidiymes et vésicules éminales, ↘ fertilité à 10 µg/kg et infertilité à partir de 100 µg/kg	(Mathews et al. 2009)
Injection sous-cutanée	EB	40 µg/kg par injection	Rat, Wistar et Fisher	Adulte, J60 environ, 3 fois par semaine pendant 4 semaines	J90	↘ testostérone, LH, FSH, inhibine et ↗ prolactine à J90, ↘ poids testis, épididymes et vésicules séminales, ↘ diamètre tubes séminifères, atrophie épithélium séminifère, perte de cellules germinales post-méiotiques (spermatides) et ↗ apoptose cellules germinales, très peu de spermatozoïdes épididymaires, souche Fisher plus sensible	(Hossaini et al. 2003)
Injection intra-péritonéale	EB	10, 16, 20, 40, 80 et 160 µg/kg par jour	Souris, ICR	Adulte, chaque jour pendant 2, 3 jours, 1, 2, 4 et 8 semaines	Adulte	Dégénérescence des cellules germinales vers la lumière des tubes séminifères, altération de la spermatogenèse (surtout stade XII), altération du nombre de spermatides	(Toyama et al. 2001)

Tableau 8 (suite). Récapitulatif non exhaustif des effets induits sur l'appareil reproducteur mâle par l'exposition aux estrogènes purs à différentes fenêtres d'exposition

2.3.2 Modèles d'exposition aux antiandrogènes (flutamide)

Un certain nombre d'équipes ont mis en place des modèles expérimentaux chez le rongeur reposant sur un traitement fœtale, néonatal ou adulte par le flutamide afin de mieux caractériser le rôle des PEs à activité antiandrogénique (Mauduit et al. 2006). Le flutamide est un antiandrogène synthétique non stéroïdien avec une application pharmacologique dans le traitement du cancer de la prostate. Ses effets passent principalement par sa forme active, l'hydroxyflutamide, qui a la capacité de se lier au récepteur des androgènes pour empêcher sa liaison au niveau des ARE (Androgen Responsive Elements) situés au niveau des régions promotrices des gènes androgénodépendants et finalement inhiber leur transcription (figure 56). Le flutamide empêche donc l'action des androgènes par une inhibition compétitive de leur liaison au niveau d'AR.

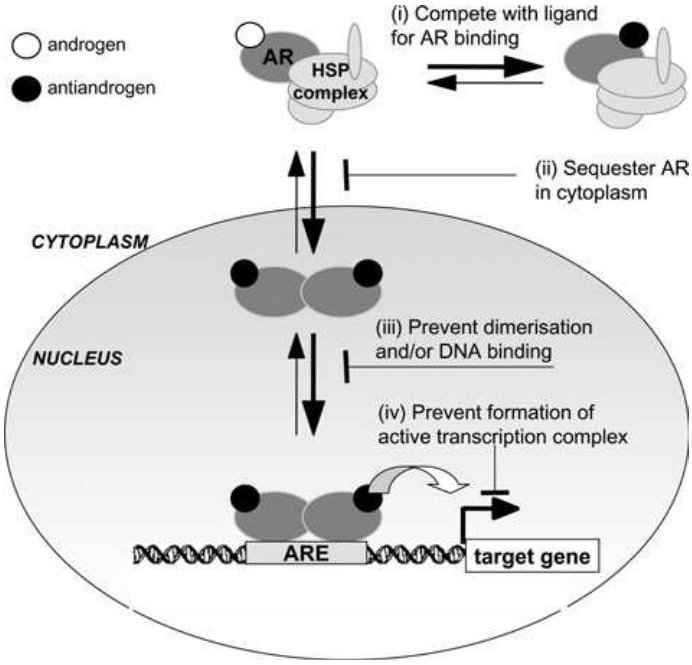


Figure 56. Mécanismes d'action potentiels des composés antiandrogéniques (ex. hydroxyflutamide) liant le récepteur des androgènes

*Le composé peut empêcher la liaison de la testostérone sur le AR **(i)**, ce qui peut empêcher la translocation de l'AR dans le noyau **(ii)**, mais aussi sa dimérisation et sa liaison sur l'ADN **(iii)**, pour finalement empêcher la transcription des gènes cibles androgénodépendants **(iv)**.*

Un certain nombre d'études rapportent des données concernant l'exposition néonatale ou adulte, mais la majorité des informations ont été générées par des modèles d'exposition intra-utérine au flutamide. Au cours de la période d'exposition fœtale (ex. entre le 10ème et le 21ème jour de gestation), le flutamide engendre des effets délétères et

irréversibles sur le tractus génital mâle. Au cours de cette période la production de testostérone est maximale à 16-17 jours post-coïtum et on observe le début de mise en place des organes génitaux internes et externes. Selon l'étude de McIntyre et al. (2001), dès la dose de 6,25 mg/kg par jour il est observé une diminution de la distance anogénitale ainsi que des anomalies du tractus génital mâle comme : hypospadias, cryptorchidies et agénésie des glandes annexes (McIntyre et al. 2001). Par ailleurs aux plus forte doses (12,5 ; 25 et 50 mg/kg par jour) il est mis en évidence une diminution du poids des testicules qui s'explique par la perte massive de cellules germinales se traduisant par de forte altérations de la spermatogenèse.

En comparaison de la fenêtre d'exposition fœtale, le traitement néonatal par flutamide (dès 25 mg/kg/jour) induit au niveau du testicule pré-pubère des altérations des tubes séminifères, une hyperplasie des cellules de Leydig et une diminution du poids (indiquant la perte de cellules germinales), associées à une augmentation du taux de testostérone intratesticulaire (Mikkilä et al. 2006). De la même manière, l'exposition d'animaux adultes à des doses comparables à celles utilisées in utero (10 mg/kg*jour), engendre des effets comparables au niveau du testicule (ex. apoptose des cellules germinales). Cependant alors qu'une exposition fœtale provoque une apoptose chronique des cellules germinales adultes, une exposition néonatale ou adulte provoque des altérations testiculaires (apoptose des cellules germinales) transitoires étant donné qu'elles ne sont plus décelées, sur des testicules issus d'animaux adulte dans le cas de l'exposition postnatale immédiate (Kassim et al. 1997), ou quelques jours après l'arrêt du traitement dans le cas d'une exposition adulte (Omezzine et al. 2003).

3 Effets épigénétiques des perturbateurs endocriniens

3.1 Effets des PEs sur la méthylation de l'ADN

3.1.1 Le DES

Les données princeps concernant le potentiel effet épigénétique des perturbateurs endocriniens ont été obtenues sur un modèle d'exposition néonatale au DES (J1-J5, 2 µg par jour) chez la souris (Li et al. 1997, Li et al. 2003). L'exposition néonatale au DES induit chez la femelle l'apparition de cancers au niveau de l'épithélium utérin. Dans ce travail, les auteurs

ont mis en évidence au niveau de l'utérus de souris exposées au DES une déméthylation à 21 et 30 jours postnatals au niveau de deux sites CpG (en -454 et -464) situés au niveau du promoteur en amont de l'ERE du gène de la lactoférrine. Par ailleurs, au niveau de l'utérus de souris traitées et âgées de 18 mois, cette déméthylation en -464 était maintenue et associée à une surexpression persistante du gène de lactoférrine. Finalement les auteurs ont démontré qu'une exposition au DES d'animaux matures (J30), à la même dose et pendant la même durée, n'entrainait aucune différence de méthylation entre le groupe contrôle et le groupe traité. Ces données suggèrent l'importance de la fenêtre d'exposition néonatale dans la déméthylation induite à long terme par le DES. Récemment, les travaux de Sato et al. (2009) ont permis d'éclaircir les mécanismes potentiels impliqués dans la déméthylation observée après exposition au DES (Sato et al. 2009). Ainsi, les effets sur la méthylation après exposition au DES impliquerait une diminution d'expression des gènes de *Dnmt1* (à J5 et J14), *Dnmt3A* (à J14) et *Dnmt3B* (à J5) que les auteurs expliquent par une altération d'expression des facteurs de transcription *Sp1* (à J14) et *Sp3* (à J5). Ces altérations sont également associées à des hyperméthylation ou hypométhylations au niveau de certains loci du génome (Sato et al. 2009).

3.1.2 La vinclozoline

Des données, publiées en 2005 dans la revue Science par le groupe de Skinner, concernant les effets épigénétiques après une exposition fœtale à la vinclozoline ont eu un grand retentissement dans le domaine de l'étude des perturbateurs endocriniens (Anway et al. 2005). En effet dans leurs travaux les auteurs ont mis en évidence : (1) que l'exposition fœtale à la vinclozoline entrainait, chez les individus exposés (génération F1), des modifications à long terme du profil global de méthylation de l'ADN (hyper et hypométhylations) associées à des altérations de la spermatogenèse, (2) que la descendance au moins jusqu'à la génération F3 (voire F4) présentait le même phénotype que les individus F1 (altérations spermatogenèse, de la prostate et d'autres organes) associé à des altérations dans les profils de méthylation de l'ADN. Ces données suggèrent ainsi une transmission transgénérationnelle indépendamment de mécanismes mutationnels mais plutôt via des altérations épigénétiques de méthylation de l'ADN. Toutefois, ces données n'ont pas été confirmées par d'autres études (Inawaka et al. 2009, Schneider et al. 2008).

Les données obtenues chez la femelle avec le DES et chez le mâle avec la vinclozoline montrent un rôle important du processus de méthylation de l'ADN dans la programmation développementale de pathologies après exposition aux PEs. Ces observations amènent à poser différentes questions :

(1) Si le profil de méthylation global est modifié après exposition développementale aux PEs, qu'en est-il de l'activité/expression des DNMTs ?

(2) Si l'activité/expression des DNMTs est altérée, est-ce que cette perturbation à un impact fonctionnel ?

(3) Quels pourraient être les mécanismes en amont qui contribuent à altérer l'expression des DNMTs ?

3.2 Effets sur les microRNAs

Il n'existe à ce jour que très peu de données concernant l'effet de molécules à activité perturbateur endocrinien sur la biogenèse ou la transcription des microRNAs. Cependant, une étude récente sur un modèle d'induction de néoplasie des glandes mammaires par l'exposition chronique de rattes au 17β-estradiol, montre que l'exposition à l'estrogène entraine l'induction (ex. miR-21, miR-129-3p) et la répression (ex. miR-127, miR-539) de certains miRNAs (Kovalchuk et al. 2007). Par ailleurs, les approches in vitro de traitement par les estrogènes ont très largement impliqué les estrogènes et les récepteurs aux estrogènes ERα dans la régulation des taux de miRNAs notamment en agissant sur leur biogenèse (Cohen et al. 2008, Macias et al. 2009, Yamagata et al. 2009). Ainsi, les miRNAs peuvent être des cibles des PEs et être impliqués dans les phénotypes induits par l'exposition aux PEs.

Résultats

V - Résultats

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet de publications ou d'articles en cours de préparation.

1 - Données supplémentaires : **Validation du modèle expérimental d'exposition néonatale de rats à l'estradiol benzoate.**

2 - Article n°1: **Neonatal programming of adult germ cell death: role of microRNA miR-29 family in the downregulation of DNA methyltransferases and MCL-1.**
MEUNIER L., LEMAIRE G., VEGA A., LAKHDARI N., SIDDEEK B., BARS R., MAUDUIT C., ROUQUIE D., BENAHMED M. Soumis pour publication.

3 - Article n°2: **Long term changes in the expression of IAP proteins and Smac/DIABLO in the adult rat testis exposed in utero to flutamide.**
SIDDEEK B., BOZEC A., MAIRE M., **MEUNIER L.**, BENAHMED M., MAUDUIT C. En cours de préparation.

4 - Données supplémentaires : **Altérations de l'expression des ADN méthyltransférases (DNMTs) au niveau du testicule de rat après exposition fœtale au flutamide.**

Par ailleurs au cours de ma thèse j'ai effectué des travaux qui ont fait l'objet de publications présentées en annexes :

Article n°3: **Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell.** Oncogene, 2008, 27(20):2858-67.
LEOTOING L., **MEUNIER L.**, MANIN M., MAUDUIT C., DECAUSSIN M., VERRIJDT G., CLAESSENS F., BENAHEMED M., VEYSSIERE G., MOREL L., BEAUDOIN C.

Article de revue: **Long-term effects of environmental endocrine disruptors on male fertility.**
MAUDUIT C., FLORIN A., AMARA S., BOZEC A., SIDDEEK B., CUNHA S., **MEUNIER L.**, SELVA J., ALBERT M., VIALARD F., BAILLY M., BENAHMED M.
Gynecol Obstet Fertil. 2006 Oct; 34(10):978-84.

Article n°4: **Apoptotic profile induced by EGME in testicular rat germ cells and alteration of the androgen signal.**
AMARA S., **MEUNIER L.**, VEGA A., SIDDEEK B., BOZEC A., HAMMAMI I., BENAHMED M., MAUDUIT C. En cours de préparation.

Pour une unité thématique de ce mémoire, j'ai choisi de présenter dans la partie résultats les données se rapportant aux mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens dans la programmation développementale des altérations de la gonade mâle.

1 – Données supplémentaires : Validation du modèle expérimental d'exposition néonatale de rats à l'estradiol benzoate : (1) données phénotypiques macroscopiques et histologiques, (2) données phénotypiques moléculaires

---

Résumé :

Les modèles expérimentaux de rongeurs exposés pendant la vie fœtale à des composés à activité antiandrogénique (ex. flutamide, vinclozoline) ou durant la période fœtale/néonatale à des molécules estrogénomimétiques (ex. diethylstibestrol) se sont révélés pertinents pour établir un lien entre l'exposition aux PEs et certaines pathologies développementales se déclarant à l'âge adulte, reproduisant ainsi les pathologies observées chez l'homme (voir étude bibliographique).

Dans le cas de l'exposition néonatale aux composés à activité estrogénomimétique les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les altérations testiculaires restent à ce jour très mal connus. Dans ce contexte, nous avons développé un modèle expérimental d'exposition néonatale entre J1-J5 à l'estradiol benzoate (EB). Une étude préliminaire d'exposition néonatale à l'EB (2,5; 12,5 et 25 µg/jour (µg/j)) a permis de mettre en évidence des altérations au niveau de l'appareil reproducteur mâle comme la diminution du poids testiculaire et des glandes accessoires. Plus spécifiquement, au niveau testiculaire les animaux exposés présentent de fortes altérations de la spermatogenèse avec une perte massive de cellules germinales (méiotiques et post-méiotiques) aux doses 12,5 et 25 µg/j se traduisant par une diminution de la production de sperme. Une seconde gamme de doses plus faibles (0,75; 1,25 et 2,5 µg/j) a été choisie pour les approches moléculaires de façon à éviter les pertes cellulaires majeures dans le testicule qui pourraient fausser les interprétations des variations géniques. Dans cette deuxième étude, le poids testiculaire n'était altéré à aucune des doses testées. Après exposition néonatale à 0,75; 1,25 et 2,5 d'EB, il est mis en évidence une augmentation dans le testicule adulte dose-dépendante du taux de caspase 3 activée (voir article n°1) et une diminution de Mcl-1 (voir article n°1) suggérant une activation chronique du processus apoptotique dans les cellules germinales testiculaires.

A l’aide de ces deux expériences nous avons : (1) établi que l’exposition néonatale à l’EB provoque un phénotype clair au niveau du tractus génitale mâle, avec une réponse drastique (perte germinale massive) aux plus fortes doses (12,5-25 µg/j), (2) établi une gamme de doses (0,75-2,5 µg/j) pour lesquelles nous observons peu de pertes de cellules germinales, mais nous objectivons un effet clair avec une augmentation de l’apoptose, ces dernières doses sont adéquates pour l’étude moléculaire et mécanistique.

L'étude au niveau moléculaire montre que la majeure partie des transcrits marqueurs de cellules de Leydig sont inchangés exceptés *Star* et *Cyp1b1* qui sont diminués. De façon similaire, aucun des gènes marqueurs de cellules de Sertoli testés n'est affecté à la dose de 2,5 µg/j. Les analyses globales de transcriptomique indiquent que plusieurs phénomènes biologiques sont significativement altérés (ex. métabolisme lipidique, le transport de molécules, croissance et signalisation cellulaire).

Validation du modèle d'exposition néonatale aux estrogènes (estradiol benzoate) :

(1) données phénotypiques macroscopiques et histologiques

(2) données phénotypiques moléculaires

Présentation du modèle expérimental

Dans ce travail, nous avons développé et caractérisé un modèle expérimental d'exposition néonatale (de 1 à 5 jours postnatals (jpn)) de rats à l'analogue d'estrogènes, l'estradiol benzoate (EB) (figure 58). Les animaux sont laissés sans traitement à partir de 6 jpn.

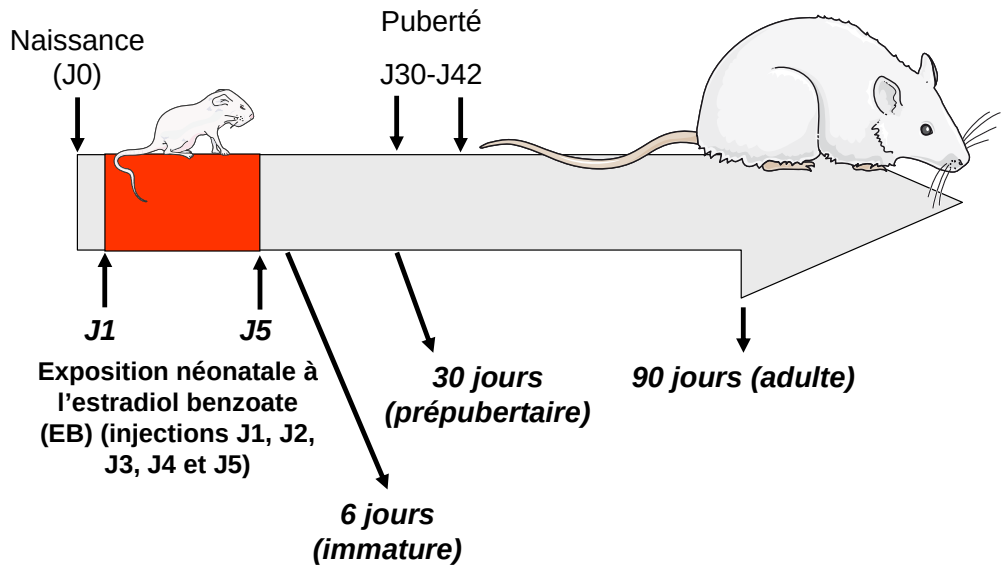


Figure 57. Présentation du modèle expérimental d'exposition néonatale à l'estradiol benzoate

Deux expériences d'effet-dose ont été réalisées : une première étude (EXP1) reposant sur l'exposition néonatale à une gamme de doses élevées d'EB de 2,5; 12,5 et 25 µg/j (soit 250, 1250 et 2500 µg/kg/j), une seconde étude (EXP2) reposant sur une exposition néonatale à une gamme de doses plus faibles d'EB de 0,75; 1,25 et 2,5 µg/j (environ 75; 125 et 250 µg/kg/j). Nous avons conservé la dose 2,5 µg/j comme point de repère entre les deux expériences. Enfin, nous avons complété notre approche comme présenté dans l'article n°1 par une étude ontogénique (EXP3) où les animaux sont traités durant la vie néonatale par 2,5 µg/j d'EB et où les testicules ont été prélevés à 6 jpn (immature), 30 jpn (prépubère) et à 90 jpn (adulte).

Données phénotypiques macroscopiques générales

Afin d'identifier un potentiel effet toxique général chez les animaux exposés pendant la période néonatale à l'EB, les animaux adultes ont été systématiquement pesés avant la nécropsie. Ainsi, il n'a pas été mis en évidence d'effet toxique général chez les animaux traités dans les différentes expériences (Fig. 59A).

Les organes (testicules, lobes prostatiques et vésicules séminales) dont le développement dépend des androgènes ont été prélevés sur les animaux adultes. Pour l'EXP1, l'exposition néonatale à l'EB provoque chez les rats mâles une diminution significative et dose-dépendante du poids du testicule à 2,5 (16,5%, p=0,003) ; 12,5 (45,5%, p<0,001) et 25 (52,3%, p<0,001) µg/j (Fig. 59B). De façon similaire, une diminution significative du poids des lobes ventraux de la prostate chez les animaux adultes exposés à 2,5 (23%, p=0,001), 12,5 (70%, p<0,001) et 25 (65%, p<0,001) µg/j a été identifiée (Fig. 59C). Un profil similaire d'altération significative du poids a été identifié pour les deux autres lobes prostatiques (latérodorsal et cranial) (Fig. 59D-E). Le poids des vésicules séminales diminue de façon dose-dépendante : 2,5 (30%, p<0,001), 12,5 (80%, p<0,001) et 25 (85%, p<0,001) (Fig. 59G). La diminution du poids testiculaire a des conséquences fonctionnelles puisqu'une diminution significative du nombre de spermatozoïdes a été identifiée à 2,5 (25%, p<0,001) ; 12,5 et 25 µg/j (85%, p<0,001) (Fig. 59H).

Ces observations ont permis de mettre en évidence un phénotype clair suggérant une programmation développementale de l'hypospermatogenèse et des altérations du tractus génital mâle après exposition néonatale à l'EB. Toutefois de telles anomalies (perte massive des cellules germinales testiculaires) ne sont pas compatibles avec des analyses mécanistiques plus fines au niveau moléculaire.

Dans l'EXP2, nous avons utilisé des doses plus faibles en conservant la dose de 2,5 µg/j. Dans cette expérience, nous n'observons pas de modification significative du poids du testicule (Fig. 59B) et des différents lobes prostatiques (Fig. 59C-E). Toutefois, une tendance à la diminution du poids est observée à la dose de 2,5 µg/j pour les lobes prostatiques. Le compte spermatique, comme le poids testiculaire n'est pas modifié dans l'EXP2. En revanche, une diminution significative du poids des vésicules séminales est observée à 1,25 (20%, p=0,021) et 2,5 (30%, p=0,003) µg/j (Fig. 59G). Cette diminution est similaire (30%) à la dose de 2,5 µg/j pour les expériences 1 et 2. Ces résultats suggèrent que le poids des vésicules séminales est un marqueur sensible de l'action de l'EB et que la dose de 2,5 est une

dose charnière pour l'identification d'effets phénotypiques macroscopiques (voir discussion).

Données phénotypiques : morphologie, apoptose et prolifération au niveau du testicule

Au niveau histologique, nous observons une perte massive de cellules germinales chez les animaux exposés à 12,5 et 25 µg/j d'EB (Fig. 60 et article n°1 Fig. 1B). La perte des cellules germinales étant très marquée chez la plupart des animaux du groupe 25 µg/j. Les animaux traités par 2,5 µg/j d'EB durant la vie néonatale ne présentent pas d'altérations (EXP2) ou bien présentent des altérations discrètes (EXP1) de la structure des tubes séminifères, sans perte massive de cellules germinales.

L'analyse de l'apoptose testiculaire par la technique du TUNEL montre la présence de cellules germinales TUNEL-positives (apoptotiques) chez les animaux traités par 2,5 et 12,5 µg/j d'EB durant la vie néonatale (Fig. 60B et Fig. 1D de l'article n°1). Les cellules TUNEL-positives sont les cellules germinales (spermatocytes et/ou spermatides) tandis que les cellules somatiques ne sont pas marquées. Etant donné que la perte cellulaire était très importante chez la plupart des individus aux doses 12,5 et 25 µg/j, une étude quantitative de l'apoptose n'a pu être réalisée chez ces animaux. En revanche, à la dose de 2,5 µg/j, nous mettons en évidence une augmentation de 50% du nombre de cellules apoptotiques chez les animaux traités en comparaison des animaux du groupe non traité (Fig. 60B et Fig. 1C de l'article n°1). L'apoptose des cellules germinales testiculaires est dose-dépendante puisqu'une augmentation du taux de caspase 3 activée est observée aux doses 1,25 (facteur 2; $p<0,05$) et 2,5 (facteur 1,8; $p<0,05$) µg/j chez les animaux traités comparés aux animaux contrôles (Fig. 1C de l'article n°1). En somme, la perte de cellules germinales adultes provoquée par une exposition néonatale à l'EB est liée à un phénomène d'apoptose chronique plutôt qu'à une diminution de la prolifération puisqu'il n'a été mis en évidence aucune modification du nombre de cellules PCNA-positives entre les animaux contrôles et traités (voir Fig. 1E de l'article n°1).

Données phénotypiques moléculaires : gènes impliqués dans la stéroïdogenèse et marqueurs de cellules de Leydig

Par des approches classiques de PCR quantitative en temps réel (Q-PCR) différents gènes impliqués dans la stéroidéogenèse et dans les fonctions des cellules de Leydig ont été testés.

Ainsi, nous avons pu détecter une diminution significative de l'expression du gène *Star* (facteur de diminution 1,3; p=0,0156) chez les animaux adultes exposés (2,5 µg/j) durant la période néonatale par l'EB. A l'inverse, l'expression des autres gènes codant les enzymes de la stéroïdogenèse *Cyp11a1*, *Hsd3b3*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*, *Hsd17b7*, *Hsd17b3* et *Hsd17b7* n'est pas modifiée. En parallèle, l'expression de certains gènes marqueurs des cellules de Leydig ont également été testés. Il n'a pas été mis en évidence d'altération du niveau d'expression des gènes *Insl3*, *Nr5a1 (SF1)* et *Dhcr7*. En revanche, nous avons pu mettre en évidence une diminution significative du marqueur leydigien *Cyp1b1* (facteur de diminution 1,3; p<0,001).

Données phénotypiques moléculaires : gènes marqueurs des cellules de Sertoli et gènes androgéno-dépendants

Dans le but d'identifier des altérations au niveau des fonctions des cellules de Sertoli, le taux de transcrits correspondant à des gènes spécifiques de ces cellules ont été mesurés dans notre modèle. Ainsi, l'analyse des transcrits de *TUBB3 (Tubuline beta 3)*, *AmhR2*, *Shbg*, *Scf*, Gstα2 ne montre aucun changement dans l'expression de ces gènes chez les animaux exposés à l'EB (2,5 µg/j). De même, l'analyse de transcrits correspondant aux gènes androgéno-dépendants *Rhox5* et *Gpd1* ne montre pas d'altération significative de leur expression dans notre modèle.

Données phénotypiques moléculaires : analyse transcriptomique (données préliminaires)

Parallèlement, nous avons effectué une analyse globale des transcrits par la technique de microarray à l'aide de puces ADN Agilent pangénomiques rat (44 000 transcrits) dans les testicules d'animaux adultes exposés durant la vie postnatale à l'EB (dose 2,5 µg/j). L'analyse des données indique que 87 gènes (38%) sont significativement stimulés et 140 gènes (62%) sont significativement diminués avec un facteur de dérégulation supérieur à 1,2 (p-value=0,01). Nous nous sommes basés sur la classification "Gene Ontology" (GO) afin d'identifier les groupes de transcrits appartenant aux principaux processus biologiques et fonctions moléculaires affectées. La majorité des transcrits altérés sont impliqués dans le métabolisme lipidique, le transport moléculaire, la prolifération et la croissance cellulaire, la signalisation cellulaire, la régulation transcriptionnelle, la synthèse et la dégradation protéique, la réplication et la réparation de l'ADN, la production énergétique ou encore la mort cellulaire (figure 61).

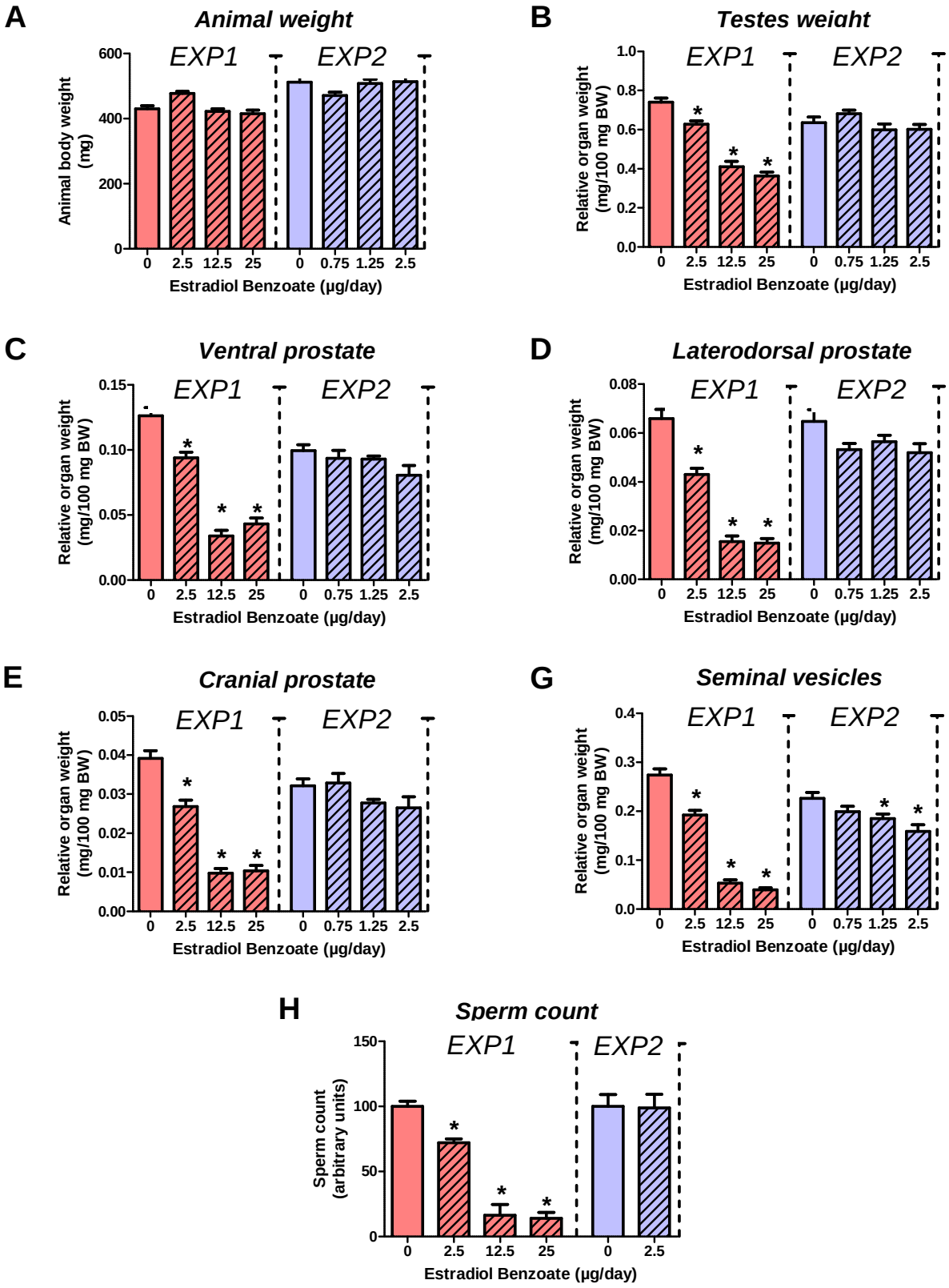


Figure 58. Poids des animaux, poids des organes et comptages spermatiques
Poids des animaux (A), poids des organes (testicules, prostates, vésicules séminales) (B-G) et comptages spermatiques (H) chez les individus adultes exposés durant la vie néonatale à l'estradiol benzoate.

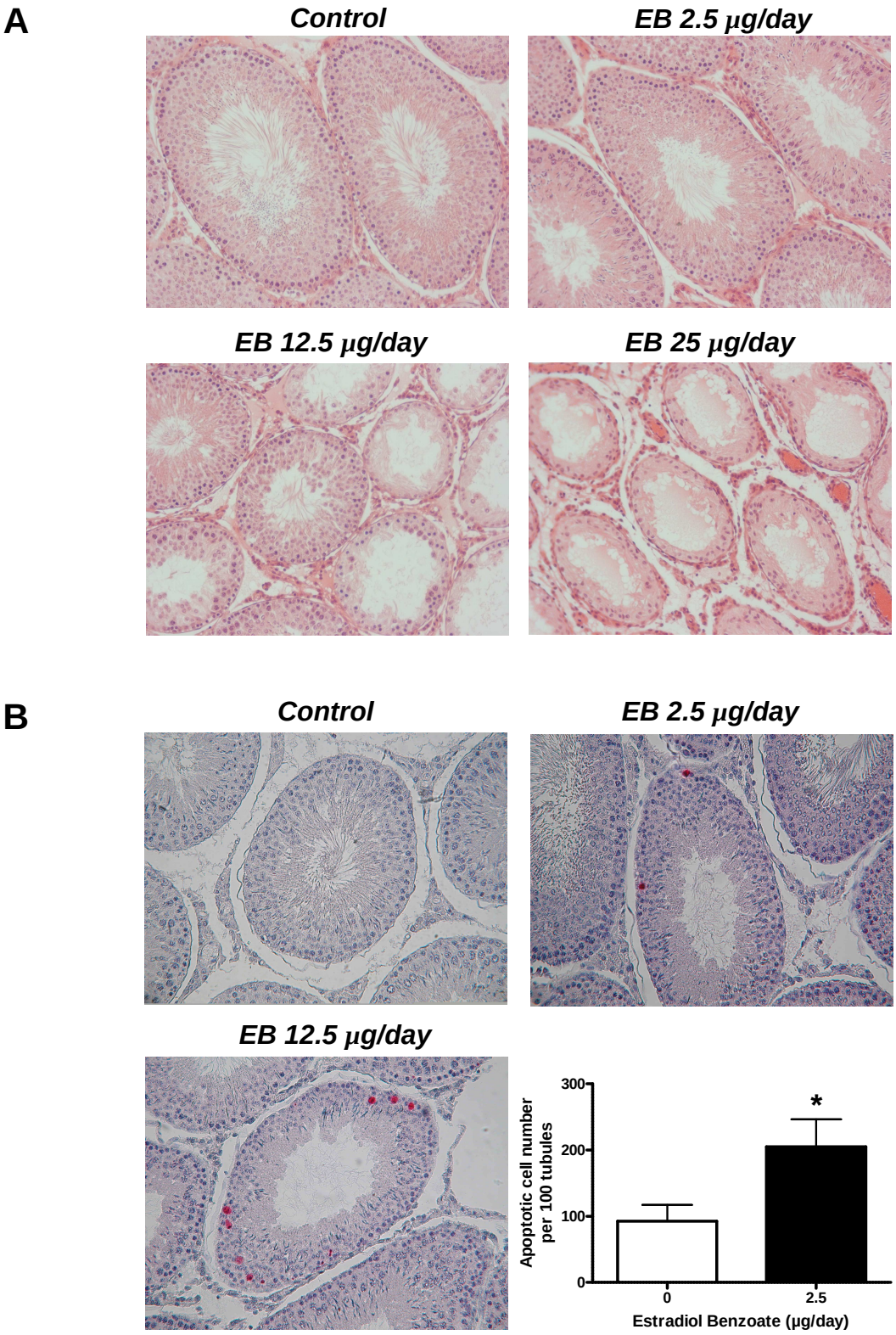


Figure 59. Analyses morphologiques et de l'apoptose chez les animaux exposés à l'estradiol benzoate
Analyse morphologique des testicules adultes issus des animaux exposés à 2,5; 12,5 et 25 µg/jour d'EB durant la période néonatale (A), mise en évidence de cellules apoptotiques à 2,5 et 12,5 µg/jour et quantification des cellules apoptotiques chez les individus adultes non traités ou exposés durant la vie néonatale à 2,5 µg/jour d'EB (B).

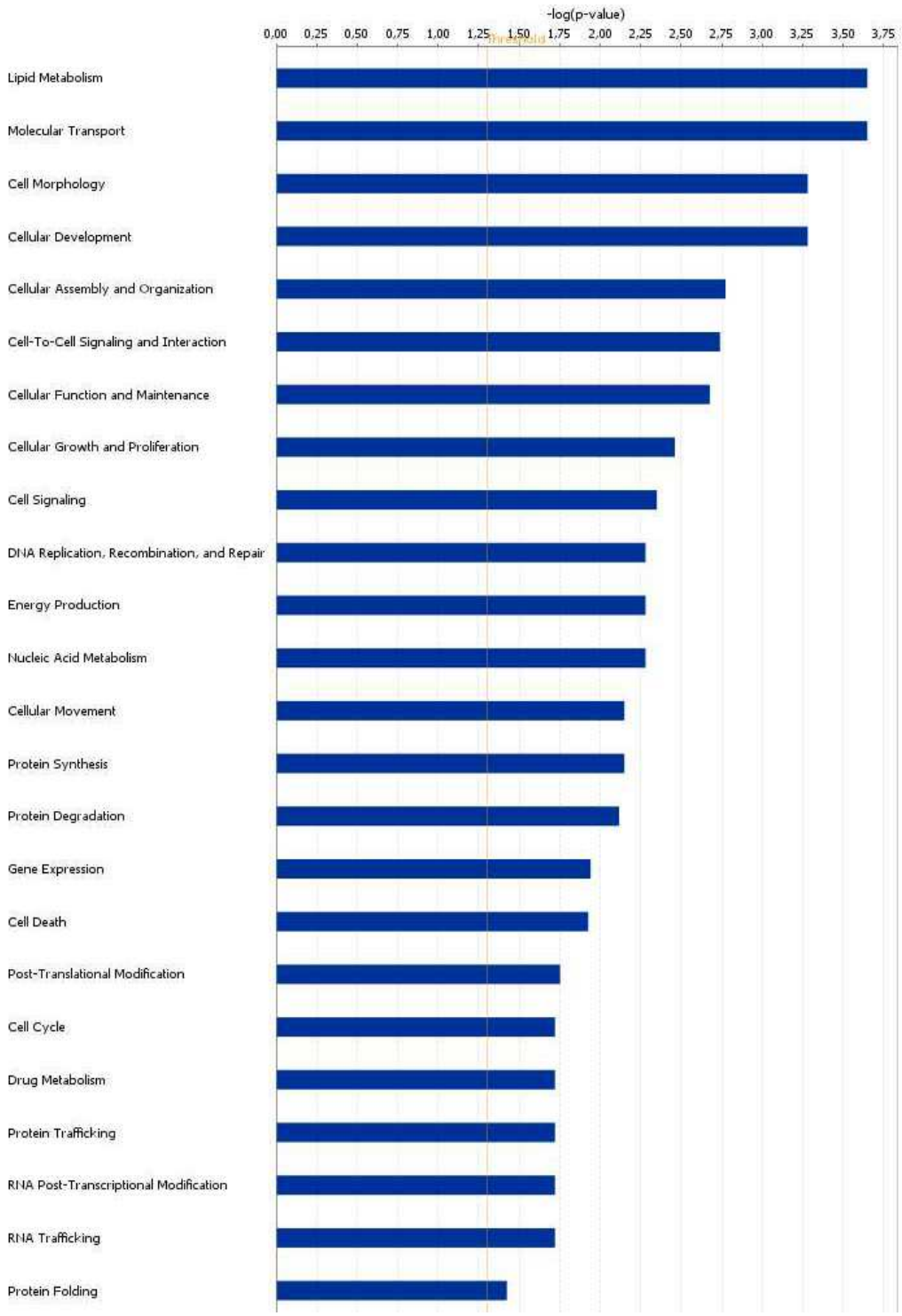


Figure 60. Analyse préliminaire à partir de la "Gene Ontology" de la liste des transcrits dérégulés au niveau du testicule adulte exposé durant la vie néonatale à 2,5 µg/jour d'EB

La barre rouge indique la valeur seuil à partir de laquelle le processus biologiques est significativement altéré.

2 - Article n°1 : Programmation néonatale de la mort des cellules germinales adultes : implication des microRNAs de la famille miR-29 dans l'inhibition des ADN méthyltransférases et de MCL-1

(Neonatal programming of adult germ cell death: role of microRNA miR-29 family in the downregulation of DNA methyltransferases and MCL-1)

MEUNIER L., LEMAIRE G., VEGA A., LAKHDARI N., SIDDEEK B., BARS R., MAUDUIT C., ROUQUIE D., BENAHMED M.

Résumé de l'article:

Les résultats présentés dans la partie précédente indiquent que l'exposition néonatale à l'estradiol benzoate (EB) induit à long terme un phénotype d'hypospermatogenèse chez les individus adultes exposés. Parmi les mécanismes suspectés d'être impliqués dans l'effet à long terme des PEs, quelques études chez l'animal sur des expositions fœtales à des composés antiandrogéniques (ex. vinclozoline) ou estrogénomimétique (ex. DES) suggèrent la mise en jeu des mécanismes de type épigénétique (ex. méthylation de l'ADN, modification des histones). La méthylation de l'ADN effectuée par les ADN méthyltransférases (DNMTs) est un des mécanismes épigénétiques participant au contrôle de l'expression des gènes, qui semblent jouer un rôle crucial dans les cellules germinales au cours du processus de spermatogenèse. Nous avons cherché à mettre en évidence si la machinerie de méthylation de l'ADN pouvait être impliquée et altérée dans le phénotype d'apoptose chronique induit par une exposition néonatale à l'EB.

Ainsi, nous montrons que le taux des 3 protéines DNMTs majeures (DNMT3A, 3B et 1) est affecté dans le testicule adulte (90 jpn) (diminution 60-70%) d'animaux exposés en période néonatale à l'EB, mais pas dans le testicule immature (6 jpn) ou prépubère (30 jpn). Cette inhibition de l'expression des protéines DNMT3A, 3B et 1 est dose-dépendante dans le testicule adulte. Les taux de protéines DNMT3A et 3B sont significativement diminués dès la dose de 0,75 µg/jour, alors que les taux de DNMT1 sont inhibés à partir de la dose 1,25 µg/j. En revanche, le taux des transcrits de *Dnmt3A* et *3B* ne sont pas modifiés dans le testicule adulte, tandis que les transcrits de *Dnmt1* sont modestement diminués à 2,5 g/j. Ces

données suggèrent qu'une altération du taux de protéines DNMTs pourrait être impliquée dans le processus apoptotique chronique observé au sein des testicules adultes d'animaux exposés pendant la période néonatale à l'EB et que le mécanisme de dérégulation serait au niveau traductionnel (DNMT3A, 3B et 1) plutôt que transcriptionnel (excepté DNMT1).

D'un point de vue fonctionnel, la diminution des protéines DNMTs après exposition néonatale à l'EB se traduit par l'augmentation d'expression de séquences connues pour être contrôlées par la méthylation (*Ibtk*, *LINE-1*). L'augmentation des transcrits *Ibtk* et *LINE-1* est détectée dans le testicule adulte, mais pas dans le testicule immature ceci est en accord avec l'absence de modification du taux des protéines DNMTs à 6 jpn. La réactivation d'expression des séquences *LINE-1* pourrait notamment induire une instabilité génomique conduisant à la mort des cellules germinales.

Concernant la dérégulation à long terme du taux de protéines DNMTs, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait être liée à une modification du taux des microRNAs (capables de moduler la traduction des DNMTs). La famille miR-29 (29a, b et c) a récemment été montrée comme régulant l'expression des DNMTs chez l'homme et la souris. Il apparait que, dans les testicules adultes issus d'animaux exposés durant la vie néonatale à l'EB, les trois miR-29 (29a, b et c) sont surexprimés suivant une augmentation dose-dépendante dès la dose de 0,75 µg/jour, et ce dans le testicule adulte alors qu'ils ne sont pas modifiés dans le testicule immature. Ce profil d'altération (dose-dépendance uniquement chez l'adulte) est semblable pour les DNMTs. Par ailleurs, par des approches de transfection d'une lignée de cellules germinales murines nous avons confirmé le rôle des miR-29s et particulièrement de miR-29b dans la régulation des taux de protéines DNMTs. Ces résultats suggèrent que l'exposition néonatale à l'EB induit une dérégulation développementale des taux de miR-29s au niveau testiculaire conduisant à la diminution d'expression des taux protéiques de DNMTs Nous avons analysé une autre cible des miR-29 décrite dans la littérature comme étant un facteur antiapoptotique MCL-1 appartenant à la famille BCL-2. L'augmentation des miR-29s est fonctionnelle puisque nous montrons que l'expression de la protéine MCL-1 est significativement diminuée chez les animaux exposés à l'EB.

En conclusion, notre travail indique que l'exposition néonatale à l'EB pourrait induire une programmation développementale du phénotype d'hypospermatogenèse chez l'adulte et mettrait en jeu une altération d'expression des DNMTs sous le contrôle des microRNAs de la famille miR-29.

Neonatal programming of adult germ cell death: role of microRNAs miR-29 family in the down regulation of DNA methyltransferases and Mcl1.

Running title: Down regulation of DNMTs by miR-29 family in germ cell death

Léo MEUNIER[1,2], Géraldine LEMAIRE[1,2,3], Aurélie VEGA[1,2], Nadjem LAKHDARI[1,2], Benazir SIDDEEK[1,2], Rémi BARS[3], Claire MAUDUIT[1,4,5], David ROUQUIE[3], Mohamed BENAHMED[1,2,6]

[1]Inserm, U895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Team 5, Nice, F-06204, France.

[2]Université de Nice-Sophia, UFR Médecine, Nice, F-06000, France.

[3]Bayer CropScience, Department of Research Toxicology, Sophia Antipolis, F-06560, France.

[4]Université Lyon 1, UFR Médecine Lyon Sud, Lyon, F-69921, France

[5]Hospices Civils de Lyon, Hôpital Lyon Sud, laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques, Pierre-Bénite, F-69495, France

[6]Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle de Gynécologie Obstétrique Reproduction Endocrinologie (GORE), CECOS, Nice, F-06202, France

Corresponding author: Dr Mohamed Benahmed, INSERM (Institut National of Health and Medical Research), U895, Team 5, Bâtiment Universitaire Archimed, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), 151 route Saint-Antoine Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 3, France; Tel : (33) 492 035 630 ; Fax : (33) 492 035 640 ; e-mail: benahmed.m@chu-nice.fr

ABSTRACT

Different studies have pointed out that developmental exposure to environmental endocrine disruptors can induce long-term testicular germ cell death probably through epigenetic mechanisms. By using a model of early neonatal (postnatal day (PND) 1 to 5) exposure to estradiol benzoate (EB), the aim of this study was to determine the role of microRNAs (miRNAs) and DNA methyltransferases (DNMTs) in the long-term effects of EB on germ cell death. Germ cell apoptosis, DNMTs proteins and transcripts levels were assessed in the testis from immature (PND6) and adult (PND 90) rats. Neonatal exposure to EB induced long-term apoptosis of adult testicular germ cell associated with increased expression of miR-29a, b and c whose can control directly or indirectly DNMTs levels. The functional consequences are decreased DNMTs protein levels in the adult (but not immature) testis without major modification in their transcript levels. The DNMTs decrease was associated with increased transcript levels of DNA methylation target genes (*Ibtk*, *LINE-1 ORF1* & *ORF2*). In vitro transfection of germ cell line with miR-29s analogues confirmed the inhibitory effect of these microRNAs on DNMTs protein levels. Our results suggest the involvement of DNMTs downregulation triggered by miR-29s upregulation in the neonatal programming of adult germ cell death.

KEYWORDS: estrogens, endocrine disruptors, neonatal programming, epigenetic, DNA methyltransferases, DNMT3A, DNMT3B, DNMT1, microRNAs, miR-29 family.

Abbreviations: cDNA : complementary DNA, DNMTs : DNA methyltransferases, DOHaD : developmental origins of health and disease, EED : environmental endocrine disruptors, EB : estradiol benzoate, LINE : long interspersed nuclear elements, miR : microRNA, miRNA : microRNA, MMLV : moloney murine leukaemia reverse transcriptase, mRNA : messenger RNA, PCNA : proliferating cell nuclear antigen, PBS : phosphate buffered saline, PND :

postnatal day, Q-PCR : quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction, SINE : singles interspersed nuclear elements, TRIS : trishydroxymethylaminomethane, TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase end labelling, CASP3 : Caspase3.

INTRODUCTION

Human epidemiological studies have indicated that the risk of developing diseases in later life may be related to disorders occurring during the developmental period. Developmental life is a vulnerable period of the lifespan during which adverse environmental factors could result in late-onset diseases such as hypertension, type 2 diabetes, and cancer which have become major medical and public health concerns (Barker et al. 1989**,** Hales & Barker 1992**,** Hanson & Gluckman 2008**,** Raghupathy et al. 2010). Such a concept has been also applied to the reproductive pathology such as hypospermatogenesis, male reproductive tract malformation and testicular germ cell tumors (Skakkebæk et al. 2001). In recent years, a causal link between in utero and/or neonatal exposure to molecules (i.e. endocrine disruptors (EDs)) that alter endocrine functions and the development of genital tract abnormalities, such as impaired spermatogenesis and long-term testicular germ cell apoptosis, has emerged from studies in rodents. Indeed, in utero or neonatal exposure to EDs with antiandrogenic (Benbrahim-Tallaa et al. 2008, Bozec et al. 2004, McIntyre et al. 2001, Omezzine et al. 2003) or estrogenic activitiy (Atanassova et al. 1999, Mathews et al. 2009, Nef et al. 2000, Putz et al. 2001, Yasuda et al. 1985) induces a wide range of abnormalities of the male genital tract, including small testes, cryptorchidism, hypospadia evidenced at the birth and male infertility (through long-term germ cell apoptosis) at adulthood. Even though the exact molecular basis of the long-term testicular germ cell apoptosis induced by neonatal exposure to EB remains unknown, some studies have suggested that epigenetic mechanisms might be involved (Anway et al. 2008, Cowin et al. 2010). The recent identification of several families of microRNAs (miRNAs) involved in the different cell processes, especially apoptosis via the apoptomirs miR-29, led us to hypothesize as to whether these short non-coding RNA might upstream be involved in the neonatally programmed adult germ cell death process following early developmental exposure to xenoestrogens.

The current study aimed at (i) identifying the apoptomir miR-29 and four of their target DNMT1, 3a, 3b and Mcl-1 potentially involved in the adult programmed germ cell death process.

RESULTS

Long-term testicular apoptotic phenotype induced by neonatal exposure to estradiol benzoate (EB)

The long-term apoptotic germ cell (and subsequent hypospermatogenesis) process induced by a neonatal exposure to the estrogenic analogue estradiol benzoate (EB) was investigated for histological and molecular phenotypes. At the highest EB dose (25 µg/day) used, adult (PND 90) testes showed severe testicular atrophy phenotype (Fig. 1A) with alterations in the seminiferous epithelium ranging from partial germ cell loss (spermatocytes and spermatids) to massive germ cell loss (Fig. 1B). At 2.5 µg/day EB, minor histological alterations in the seminiferous tubules were observed in some animals (Fig. 1B) and none at lower doses (0.75, 1.25 µg/d, data not shown). These data were correlated with the absence of modification in testicular weight at 2.5 µg/day and lower doses of EB (Table 1). Because the aim of the present study was to analyze the phenotype at molecular level in the testis, EB doses 0.75, 1.25 and 2.5 µg/day were chosen to minimize or avoid massive germ cell loss that may confound the interpretation of EB effects on testicular (germ cell) gene expression and protein levels.

Neonatal exposure to EB induced a cell death process monitored through a significant increase (50%, $P < 0.05$) in the TUNEL-positive cell number (Fig. 1C) and active CASP3 (Fig.1D). Active CASP3 protein levels were significantly increased in testes from 1.25 µg/day treated animals (2-fold, $p<0.05$) and 2.5 µg/day treated animals (1.8-fold, $p<0.05$, Fig. 1D). The TUNEL-positive cells are mainly germ cells (spermatocytes and/or spermatids), since

somatic (Sertoli and Leydig) cells exhibited no staining. We then assessed potential changes in the rate of proliferation. In the testis, spermatogonia and preleptotene spermatocytes specifically displayed PCNA staining (Fig. 1E). No significant change in the accumulation of PCNA was observed between untreated and EB-exposed male rats (Fig. 1E).

Neonatal exposure to estradiol benzoate induces long-term alteration of apoptomiRs in the adult rat testis

Early postnatal exposure to EB induced a dose-dependent increase of miR-29 (a, b and c) levels in the adult (PND90) rat testicular tissue. Indeed, miR-29a displayed significant increase at 1.25 (1.4-fold, $p<0.01$), 2.5 (1.3-fold, $p<0.05$) µg/day of EB (Fig. 2A). A high significant increase in miR-29b transcripts was observed at 1.25 (1.6-fold, $p<0.05$) and 2.5 (2.6-fold, $p<0.01$) µg/day EB (Fig. 2B). Again, miR-29c levels were significantly increased at 0.75 (1.35-fold, $p<0.05$), 1.25 (1.6-fold, $p<0.01$) and 2.5 (1.4-fold, $p<0.05$) µg/day of EB (Fig. 2C). MiR29a (Fig. 2D), 29b (Fig. 2E) and 29c (Fig. 2F) were affected at PND90 but not at PND6 (immature testes). Indeed, no mature miR-29b could be detected in immature testes from untreated animals (Fig. 2D), thus confirming the data obtained by Yan and co-workers (Yan et al. 2007). Moreover no induction of its expression was detected after neonatal EB exposure (Fig. 2D).

Among the proteins targeted by the miR-29 members are, at least, two potential candidates that might be involved both directly and/or indirectly in the germ cell apoptotic process: Mcl-1 and the DNMTs (Garzon et al. 2009, Mott et al. 2007, Takada et al. 2009). In adult testes from rats exposed during the early postnatal life to EB, MCL-1 protein levels (but not mRNA, data not shown) were significantly reduced at dose 2.5 (40 % decrease, $p<0.05$) µg/day (Fig. 3). MCL-1 protein levels were affected at PND90 but not at PND6 (Fig. 3). Similarly, in adult testes from rats exposed during the early postnatal life to EB, DNMT3A protein levels were

significantly reduced at dose 0.75 (40% decrease, p=0.036), 1.25 (65% decrease, p<0.0001) and 2.5 (70% decrease, p<0.0001) µg/day (Fig. 4B). DNMT3B (3B2 isoform) protein levels were decreased at doses 0.75 (60% decrease, p=0.0075), 1.25 (85% decrease, p=0.0005) and 2.5 (70% decrease, p=0.0029) µg/day EB (Fig. 4D). Again, DNMT1 protein levels were decreased by 60% at 1.25 (p=0.0004) and 2.5 (p=0.0006) µg/day in adult rat testes (Fig. 4F). Concerning the transcript levels, Dnmt3A (Fig. 4A) and Dnmt3B (Fig. 4C) mRNA level remained unchanged. By contrast, Dnmt1 mRNA levels showed a modest but significant decrease (1.2-fold, p=0.0222) in the adult testis from 2.5 µg/day treated animals (Fig. 4E). Dnmt3A2 mRNA levels were unchanged in adult rat testes (data not shown). Moreover, because antibodies rose against DNMT3A2 lack specificity, we were not able to quantify potential changes in the protein levels. We were not able to quantify the *Dnmt3L* levels in the adult testis. Indeed, as previously reported (La Salle et al. 2007) *Dnmt3L* expression was extremely low/undetectable in the adult testis. While DNMT3A (Fig. 5A), DNMT3B (Fig. 5B) and DNMT1 (Fig. 5C) protein levels were significantly (p<0.05) decreased in adult (PND90) testes from rats exposed during the early postnatal life to EB, the DNMTs protein levels were unchanged in the immature (PND6) rat testes (Fig. 5).

In order to identify the functional consequences of DNMTs protein level alterations in the adult testis we further investigated expression of genes or sequences known to be controlled by a DNA methylation mechanism. The genes *Ibtk*, *Tcf3* and *Abt1* were chosen, as they are known to acquire their full level of methylation by de novo process during postnatal spermatogenesis (Oakes et al 2007). The transcripts originating from transposable elements *LINE-1* and *SINE B2* were chosen because they normally remain silent through DNA methylation. Interestingly, *Ibtk* mRNA levels (1.5-fold, p=0.001, Fig. 6A) were significantly increased in adult (PND90) testes from rats exposed during the early postnatal life to EB while *Tcf3* and *Abt1* mRNA levels were unchanged (data not shown). Similarly, a significant

increase of *L1 ORF1* (1.5-fold, p=0.01, Fig. 6B) and *L1 ORF2* (1.2-fold, p=0.04, Fig. 6C) transcripts were observed while the SINE (B2_Rn) transcripts levels were unchanged (data not shown). In accordance to the results obtained for DNMTs in immature (PND6) testes, the transcript levels corresponding to methylated target sequences (*Ibtk*, *L1 ORF1*, *L1 ORF2*) were unchanged (Fig. 6A-6C) in immature rats.

In order to demonstrate the inhibitory effects of miR-29s on DNMT protein levels, we used an in vitro model of transient transfection of synthetic miRNAs in a rodent testicular germ (GC-1) cell line, which harbours male germ cell features of type B spermatogonia to spermatocytes (Hofmann et al. 1992). When compared to scrambled oligonucleotide, miR-29a transfection had a clear repressive effect on DNMT3A (50% decrease, p=0.027, Fig. 7A) and DNMT1 protein levels (50% decrease, p=0.0191, Fig. 7B) whereas miR-29a transfection had no effect in down-regulating DNMT3B protein levels (Fig. 7C). The most marked inhibitory effect of miR-29 over expression on DNMTs protein levels was observed for miR-29b, which highly reduced DNMT3A (75% decrease, p=0.0042, Fig. 7B) and DNMT3B (75% decrease, p=0.0052, Fig. 7B) protein levels, and to a lesser extent DNMT1 protein levels (50% decrease, p=0.007, Fig. 7C). Transient transfection of miR-29c reduced only the DNMT3A protein levels were (75% decrease, p=0.0017, Fig. 7A), since no modification was observed in DNMT3B (Fig. 7B) and DNMT1 (Fig. 7C) protein levels. Similar results were observed for Mcl-1. Indeed, compared to scrambled oligonucleotide, miR-29a, b and c transfection had a clear repressive effect on MCL-1 (Fig. 7D)

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that an early (PND 1 to 5) post-natal exposure to the pure estrogenic antagonist EB results in late-onset testicular abnormalities such as long-term germ cell apoptosis. High EB doses (25 µg/d) induce a severe hypospermatogenesis with decreased relative weight of the testis and induced massive germ cell loss. These data are in accordance to the results of Putz et al. (2001). High doses of EB and more generally EEDs are relevant to assess a clear testicular phenotype but induce massive germ cell loss, which leads to important modification in the relative cell type proportions. Such changes could lead to false interpretations, because the observed differences in gene expression are the result of changes in testicular cell content rather than the real regulation of gene expression. Through a dose effect experiment of EB, we first determined the concentration that did not dramatically affect testicular weight but maintains molecular testicular phenotype. Indeed, lower EB doses (0.75-2.5 µg/d) did not affect testicular weight but induced discrete alterations of the seminiferous tubules (2.5 µg/d) and increased germ cell apoptosis (1.25 and 2.5 µg/d) without modifying the proliferation rate. This allowed us to assume that at the doses used (0.75-2.5 µg/d) for the molecular analyses, the modifications of gene expression were significant, not the consequences of altered cell content. Our model is also relevant to evaluate and dissect the endocrine disrupting activities of EEDs with estrogenic activities such as diethylstilbestrol, dieldrin, endosulfan, kepone, nonylphenol or cadmium. Indeed, exposure of pups to EB from day 1 to day 5 corresponds to the *in utero* second and third trimester development of human counterparts, since this window of exposure corresponds to the period of testicular development that begins in the foetal life and continues after birth by proliferation of germ cells and somatic Sertoli cells (Vergouwen et al. 1993).

Here, we suggested that the long-term germ cell apoptosis induced by an early post-natal exposure to EB might be linked to increased expression of some members of the miR-29

family (miR-29a, b and c). MiRNAs are a class of short non-coding RNAs (~ 22 nucleotides) that are involved in the post-transcriptional regulation of gene expression in most of eukaryotic organisms. MiRNAs sometimes silence their targets through induction of direct cleavage, but in most cases, through either a cleavage-independent degradation mechanism or translational repression (Liu 2008, Breving & Esquela-Kerscher 2009). MiRNAs play important roles in cellular processes such as cell differentiation, growth/proliferation, migration, apoptosis/death, metabolism and defence (Breving & Esquela-Kerscher 2009). With regards to miR-29, it has been shown that miR-29a/b/c up-regulates p53 by targeting p85 and CDC42 and induces apoptosis in a p53-dependent manner in breast and colorectal cancer cell lines (Park, 2008). MiR-29b was also shown to target Mcl-1 and to sensitize cells to TRAIL-induced apoptosis (Mott et al. 2002) and may promote apoptosis through a mitochondrial pathway that involves Mcl-1 and Bcl-2 (Xiong, 2010). In this context, we showed that the increased expression of miR-29s was associated with decreased levels of the anti-apoptotic Mcl-1. The same developmental pattern was observed for both, given that altered expression of miR-29s and Mcl-1 was observed in adult (PND90) but not immature (PND6) testes. Moreover, the functionality of miR-29s over expression on Mcl-1 was assessed in the testicular model by the transfection studies.

The second target gene of miR-29s that might drive germ cell apoptosis is DNMTs. Indeed, miR-29s and particularly miR-29b control DNMTs levels in human normal and cancer cells (Fabbri et al. 2007, Garzon et al. 2009, Veeck & Esteller 2010), but also in murine germ cells (Takada et al. 2009). To our knowledge, it is reported here for the first time that an exposure upon an early neonatal period to an endocrine disruptor activity triggers an increased expression of a miR family, which modulate key epigenetic factors. Indeed, early post-natal exposure to EB induces a dose-dependant dramatic decrease (reduction higher than 50%) in DNMT protein levels observed at the lowest doses tested (0.75 µg/d) for both DNMT3A and

3B and 1.25 µg/d for DNMT1. The present data indicate also that DNMT3A and DNMT3B may be directly targeted by miR-29s whereas DNMT1 may be indirectly targeted by miR-29s up regulation. Indeed, increased miR-29 levels may induce deregulation of transcription factors involved in *Dnmt1* transcriptional regulation consistent with the fact that it is the only one altered at the transcript level by neonatal exposure to EB. Moreover, the up regulation of other miRNAs as miR-148b-3p and miR-152 (as predicted by Targetscan database) can target DNMT1 in order to destabilize its mRNA or inhibit its translation.

Mir-29 increase induced therefore changes in DNA methylation status in the testis through decreased levels in the adult (PND90) testis of de novo (DNMT3A and 3B) and maintenance (DNMT1) DNMTs. The decreased DNMTs levels might be involved in the adult germ cell death process induced upon early neonatal EB exposure given that conditional knock out of *Dnmt3A* induced a dramatic spermatogenesis failure characterized by decreased testicular weight and azoospermia (Bourc'his et al. 2001, La Salle et al. 2007, Kaneda et al. 2004). Moreover, transient knockdown of *Dnmt1* in the germ stem cells induced a dramatic apoptotic phenotype (Takashima et al. 2009). Administration of DNMT inhibitors (5'-azacytidine or 5-aza-2'-deoxycytidine) to adult rats or mice induced a disruption of DNA methylation activity in spermatogenesis associated to reduced fertility, decreased testicular weight, severe alterations in the seminiferous epithelium and increased germ cells apoptosis (Doerksen et al. 2000, Kelly et al. 2003). Although it remains to identify and elucidate the precise mechanisms through which reduced DNMTs can induce apoptosis in germ cells, however a potential explanation could be that increased expression of *LINE-1* elements might induce chromosomal alteration and elicit the apoptotic process in germ cells. Indeed, the decreased DNMT levels induced functional consequences. We observed that expression of some genes (*Ibtk* and *LINE-1),* regulated through promoter methylation (Oakes, La Salle, et al. 2007;

Oakes, Kelly, et al. 2007) (Liang et al. 2002), is decrease in adult (PND 90) rats (the present study).

The present data are to our knowledge the first to show that the increased expression of the miRNA 29 family members represent the highest upstream mechanisms identified to date that provide a basis of explanation for the adult germ cell death process in the neonatally rats exposed to xenoestrogens. However, such observations raise further questions related to the upstream gene control of miR-29 expression, including for example the nature and role of transcription factors involved as well as epigenetic control mechanisms potentially altered in the adult germ cells following neonatal estrogen activity disruption. Potential putative transcription factors controlling miRNA 29 expression could be identified with the use of in silico analysis (see http://diana.cslab.ece.ntua.gr/mirgen/). Moreover, epigenetic control of miR-29 expression alterations at the level of DNA methylation and/or chromatin remodelling processes might be at play. However, it is unlikely that DNA methylation changes occurring after neonatal exposure to EB might deregulate miR-29 expression given that (i) in silico analysis (miRGen database) showed that miR-29 members did not harbor CpG islands in their genomic context, thus it is not likely that DNA methylation can be involved in miRNA deregulation and (ii) miR-29 levels are not affected by DNMT1 or 3A or 3B knock down in the GC1 cell line (our unpublished data). Finally, among the potential mechanisms involved, chromatin remodelling has been suggested to be at the origin of the long-term deregulation of specific miRNAs following exposure to estrogenic compounds. Indeed, in vitro exposure of mammary epithelial cells to diethylstilbestrol can modulate histone H3 methylation marks (H3K27me3 & H3K9me2) at the miR-9-3 gene leading to epigenetic inactivation (Hsu et al. 2009). Specifically for miR-29 family, studies have demonstrated that during muscle differentiation miR-29b and -29c expression could be regulated by YY1 transcription factor involved in the recruitment of different histone modifying enzymes like histone deacetylases

and Polycomb group proteins (Wang et al. 2008). It is thus tempting to speculate that in our model, neonatal exposure to EB may have induced histone modifications at specific miRNA clusters, leading to permanent chromatin remodelling and transcriptional activation of specific miRNA genes. It would be therefore of interest to investigate the status histone marks (e.g. H3K27me3, H3K9me2) and their related histone methyltransferase enzymes (e.g. EZH2, G9a). As a first clue that argues for such regulation of miRNA genes, a work previously published by our laboratory has demonstrated that neonatal exposure of mice to estrogenic compounds EB or diethylstilbestrol induced down regulation of G9a at the mRNA and protein levels, decreased H3K9me1 and H3K9me2 marks, as well as transcript accumulation of several G9a-target genes (Volle et al. 2009).

One of the most original aspects in our present paper is related the delayed apoptotic effects on the adult germ following the neonatal exposure to the xenoestrogen. This observation is reminiscent of the “Barker hypothesis” related to the concept of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) (Barker 2004). It is of interest to note that the changes in the miRNA miR-29 a, b and levels are not observed immediately (PND6) after the endocrine disruption between day 1 to Day 5 after birth but later in the adulthood (PND90) concomitantly to the appearance of the adult germ cell death phenotype. These delayed changes in miRNA profile were, not surprisingly, accompanied by the delayed changes in their targets DNMTs and MCl-1 levels, two factors actively involved in the adult germ cell, as previously indicated. Whether these delayed changes in DNMTs and MCL-1 driven by the miRNA mir29 in the adult germ cells may provide some initial bases of explanation of the DOHaD would be of major interest to investigate. In this context, it is noteworthy that altered miRNA pattern might be linked to disturbed developmental processes during foetal or neonatal life. For example, high fat treatment of gestating mice induced long-term deregulation of several miRNAs in the liver of the progeny (Zhang et al. 2009).

Exposure of mice to ethanol during the fetal life has also been shown to induce long-term increase of miRNAs in the brain of exposed animals (Wang et al. 2009).

In summary, our data showed that early post-natal exposure to an estrogen-like EEDs (EB) induced a long-term testicular germ cell apoptosis linked to increased expression of apoptomiRs (miR-29 family). The consequences of increased levels of miR-29s are decreased expression of DNMTs and Mcl-1 two types of targets that elicit cellular apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

In vivo experimental studies

Pregnant female Sprague-Dawley rats at gestational day 15 (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were individually housed in temperature-controlled rooms with 12 hours light/dark cycles and given free access to water and feed. At birth, each pup was sexed, weighed, and identified. Pups were administered vehicle (corn oil, MP Biomedicals, Illkirch, France) or estradiol benzoate (Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau, France) by daily subcutaneaous injections from post natal day (PND) 1 to PND 5 at doses of 0, 0.75, 1.25, or 2.5 µg/day. From PND 6, rats were left without treatment and killed at PND 6, 30 or 90 by CO2 inhalation. During necropsy, position of each testis was carefully noticed, testes were removed and weighed. Only bilateral descended testes were studied in the present report. One of the testes was snap frozen for quantitative molecular approaches; the other was fixed for morphological studies. At least seven different animals from four different litters were used in untreated and treated groups. This study was conducted in accordance with current regulations and standards approved by Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (Inserm) Animal Care Committee (Protocol N° 2008-43)

Histology

Testes were immediately fixed for 48 hours in Bouin's fluid, dehydrated stepwise in graded ethanol baths and embedded in paraffin. Bouin-fixed testes were sectioned at 5µm-thick, prepared and stained with hematoxylin, eosin and safran (n=5 animal per group).

TUNEL and Immunohistochemistry

Paraffin sections (5 µm) of Bouin-fixed testis were mounted onto Superfrost Plus slides. The slides were used for either TUNEL or immunohistochemistry approaches. TUNEL

experiments were performed as previously described (Mauduit et al., 2001), using terminal deoxynucleotidyl transferase (Euromedex, Mundolsheim, France), biotin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Meylan, France), Streptavidin-Alkaline Phosphatase conjugate (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and Sigmafast FastRed TR/Naphthol AS-MX (Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau, France) according to the manufacturer's instructions. Immunohistochemistry experiments were performed using the Envision Plus kit (Dako, Trappes, France) as indicated by the manufacturer with anti-PCNA antibody (SantaCruz Biotechnology, C-20, sc-9857). The results were expressed as the number of TUNEL-positive or PCNA-positive cells per 100 random round seminiferous tubules.

Western Blotting analysis

Frozen testicular tissue was ground in liquid nitrogen to obtain tissue powder. Aliquots of powder were homogenized in ice-cold hypotonic buffer (25 mM Tris-HCl, 0.1% SDS and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau, France). Tissue homogenates were further submitted to sonication (10 sec at 80 watts). Protein concentration was determined using the Bicinchoninic Acid Assay. The experimental procedures were carried out as previously described (Benbrahim-Talaa et al, 2008). The antibodies used in this study were Dnmt3A (1/1000, Cell Signalling, #2160), Dnmt3B (1/1000, Cell Signalling, #2161), Dnmt1 (1/1000, Stressgen, KAM-TF040), Cleaved Caspase-3 (1/500, Cell Signalling, #9661), β-Actin (1/20000, Jackson's Laboratory). Membranes were scanned using Luminescent Image Analyser 3000 CCD Camera (Fujifilm, Dusseldorf, Germany) and quantified using MultiGauge logiciel (Fujifilm).

Real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated from frozen testicular powder using TRIzol Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) coupled to a on-column purification and DNAse treatment with RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Complementary DNA was synthesized from total RNA (1 µg) with MMLV (10 units/µL) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and random hexamer primers (5 µM) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in a final volume of 20 µL according to manufacturer's instructions. A 1/20 dilution of each reverse transcription products were used for real-time PCR analyses. The real-time PCR measurement of individual cDNAs (2 µL of 1/20 dilution) was performed using Quantitect SYBR Master Mix (4 µL) (Qiagen), PCR primers (2 µL of 10 µM solution) and ultrapure water (2 µL) to measure duplex DNA formation with the Roche Lightcycler system. The primers sequences used were *Dnmt3A*: Forward 5'-TGCCAAGACTCACCTTCCAG-3', Reverse 5'-GGCTTTCCTCCACAGCATTC-3'; *Dnmt3B*: Forward 5'-TATCAGTCCTACTGCACCGT-3', Reverse 5'-ACATATAGCAGCTCCAGGGT-3'; *Dnmt1*: Forward, 5'-AGACCACTGTTCCTCCTTCT-3', Reverse 5'-ACACCAGCCAAATGGATCAG-3'; *Dnmt3A2*: Forward 5'-CAGACGGGCAGCTATTTACA-3', Reverse 5'-CTGCAATCACCTTGGCTTTC-3'; *Dnmt3L*: Forward 5'-ACAAGACTGTGTCTGCATGG-3', Reverse 5'- TTCCTCCCTCAGAACCAGAA-3'; *Ibtk*: Forward 5'-CTCTCCAGCCCTAAATGTTG-3', Reverse 5'-CCGCTCTTCTTCTACAATGG-3'; *Tcf3*: Forward 5'- TACAGCAACGACCACTTCTC-3', Reverse 5'-TGGAGACAGTGGGTAATACG-3'; *Abt1*: Forward 5'-AGTGGCAGCCAGTCTACATA-3', Reverse 5'- AAGGCAAGGTGTTCACTGAG-3'; *β actin*: Forward 5'-AGCCTCGCCTTTGCCG-3', Reverse, 5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3'; primers used for LINE-1 (ORF1, ORF2) and SINE B2 have been previously described elsewhere (Lucchinetti et al. 2006). Gene amplification was carried out as follows: initial activation of HotStarTaq

DNA polymerase at 95 C for 10 min; 45 cycles in three steps: 95 C for 15 sec, 60°C for 15 sec, and 72 C for 15 sec. At the end of amplification cycles, melting temperature analysis was carried out by a slow increase in temperature (0.1 C/sec) up to 95 C Standard curves were generated with testicular cDNA pools from animals with different treatments. Normalized expression was calculated using the Ct method. The data were normalized to *β actin* levels.

Real-time PCR analysis of microRNA expression

Reverse transcription and PCR reactions were performed using stem-loop RT-PCR method as previously described (Chen et al., 2005) that was specific for mature miRNA (TaqMan miRNA assays, Applied Biosystems, Foster City, CA). Total RNA was reverse transcribed in using Multiscribe Reverse Transcriptase and a TaqMan miRNA RT primer (Applied Biosystems). Ten nanograms of total RNA were reverse transcribed in a 7.5-µl reaction using Multiscribe Reverse Transcriptase and a TaqMan miRNA RT primer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reaction mixture was incubated at 16°C for 30 min, 42°C for 30 min, then 85°C for 5 min finally held at 4°C until next analysis or stored at -20 °C. Five microlitres of the reverse transcribed product (20-fold dilution from RT PCR reaction) was assayed using TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase, and 1 µl of TaqMan miRNA PCR primers/probe mix in a 15-µl reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time PCR was performed on a ABI7900 system (Applied Biosystems) using the following conditions: after 10 min at 95°C, 40 cycles were performed at 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. Normalized expression was calculated using the Ct method. The data were normalized to U87 and SnoRNA.

Cell Cultures and transfection

GC-1 spg (GC-1) mouse spermatogonia type B-spermatocyte cell line, provided by Pr Chambon (IGBMC, Strasbourg, France) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's Medium - Glutamax medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) at 37°C in a humidified, CO2-controlled (5%) incubator. For the transient transfection of miR-29a, b or c microRNAs, cells were transfected in 12-well plates by using Hiperfect Transfection Reagent (Qiagen) according to manufacturer's protocol, with 50 nM (final concentration) scrambled negative control miRNA or miR-29a, miR-29b and miR-29c analogues (Applied Biosystems). Cells were left 48h with miRNA treatment and harvested for protein isolation.

Data Analysis

The data from the different experiments were analyzed with Graphpad software version 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The values were expressed as the mean ± SEM to account for sample and animal variation within a data set. Student's *t*-test for single comparison analysis or one-way analysis of variance (ANOVA) for multiple comparison were performed to determine whether there were differences between all groups ($p<0.05$). For ANOVA, this was followed by the Bonferroni post hoctest if $p<0.05$ to determine the significance ($p<0.05$) of differences between the pairs of groups.

Acknowledgements and grants information: This study was conducted with the financial support from the French Institute for Health and Medical Research (INSERM), the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie and BayerCropScience (CIFRE doctoral grant to LM), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-SEST-13) (Post-doctoral grant to GL) and BayerCropScience.

Competing interests of declaration: The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

REFERENCES

Anway, M.D., Rekow, S.S. & Skinner, M.K., 2008. Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome. *Genomics*, 91(1), 30-40.

Atanassova, N. et al., 1999. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology*, 140(11), 5364-73.

Barker, D.J. et al., 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2(8663), 577-80.

Barker, D.J., 2004. The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(6 Suppl), 588S-595S.

Bourc'his, D. et al., 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5551), 2536-9.

Breving, K. & Esquela-Kerscher, A., 2009. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *The international journal of biochemistry & cell biology*.

Cowin, P.a. et al., 2010. Vinclozolin Exposure in Utero Induces Postpubertal Prostatitis and Reduces Sperm Production via a Reversible Hormone-Regulated Mechanism. *Endocrinology*, 151(February), 783-792.

Doerksen, T., Benoit, G. & Trasler, J., 2000. Deoxyribonucleic acid hypomethylation of male germ cells by mitotic and meiotic exposure to 5-azacytidine is associated with altered testicular histology. *Endocrinology*, 141(9), 3235-44.

Fabbri, M. et al., 2007. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15805-10.

Garzon, R. et al., 2009. MicroRNA -29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene re-expression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*, 6411-6418.

Hales, C.N. & Barker, D.J., 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35(7), 595-601.

Hanson, M.A. & Gluckman, P.D., 2008. Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 102(2), 90-3.

Hofmann, M.C. et al., 1992. Immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen. *Experimental cell research*, 201(2), 417-35.

Hsu, P. et al., 2009. Xenoestrogen-induced epigenetic repression of microRNA-9-3 in breast epithelial cells. *Cancer research*, 69(14), 5936-45.

Kaneda, M. et al., 2004. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, 429(24), 1-4.

Kelly, T.L., Li, E. & Trasler, J., 2003. 5-aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome. *Journal of andrology*, 24(6), 822-30.

La Salle, S. et al., 2007. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Developmental Biology*, 7(1), 104.

Liang, G. et al., 2002. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Molecular and cellular biology*, 22(2), 480-91.

Liu, J., 2008. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Current opinion in cell biology*, 20(2), 214-21.

McIntyre, B.S., Barlow, N.J. & Foster, P.M., 2001. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 62(2), 236-49.

Mott, J.L. et al., 2007. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, 26(42), 6133-40.

Nef, S., Shipman, T. & Parada, L.F., 2000. A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Developmental biology*, 224(2), 354-61

Oakes, C.C. et al., 2007. Adverse effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on spermatogenesis include reduced sperm function and selective inhibition of de novo DNA methylation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 322(3), 1171-80.

Oakes, C.C. et al., 2007. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental biology*, 307(2), 368-79.

Putz, O. et al., 2001. Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: II. Effects on male puberty and the reproductive tract. *Biology of reproduction*, 65(5), 1506-17.

Raghupathy, P. et al., 2010. Glucose tolerance, insulin resistance and insulin secretion in young south Indian adults: Relationships to parental size, neonatal size and childhood body mass index. *Diabetes research and clinical practice*, 87(2), 283-92.

Skakkebæk, N.E., Rajpert-De Meyts, E. & Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(5), 972-8.

Takada, S. et al., 2009. Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(8), 1507-14.

Takashima, S. et al., 2009. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biology of reproduction*, 81(1), 155-64.

Veeck, J. & Esteller, M., 2010. Breast Cancer Epigenetics: From DNA Methylation to microRNAs. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*.

Vergouwen, R.P. et al., 1993. Postnatal development of testicular cell populations in mice. *Journal of reproduction and fertility*, 99(2), 479-85.

Volle, D.H. et al., 2009. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(12), 3752-64.

Wang, H. et al., 2008. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer cell*, 14(5), 369-81.

Wang, L. et al., 2009. Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 24(3), 562-79.

Yasuda, Y. et al., 1985. Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice. *Teratology*, 32(2), 219-27.

Zhang, J. et al., 2009. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC genomics*, 10, 478.

FIGURE LEGENDS:

Fig. 1. Characterisation of adult testicular phenotype induced by neonatal exposure to Estradiol Benzoate.

(A) Macroscopic examination of adult testis showied a severe atrophy induced by neonatal EB exposure. (B) Testicular morphology in adult rat testes from untreated animals, 2.5 and 25 µg/day treated animals. (C) Adult rat testes were subjected to TUNEL analysis to visualize and count apoptotic cells in untreated (0) and EB-treated males (2.5 µg/day). The histograms represent the number of TUNEL-positive (apoptotic) germ cells per 100 seminiferous tubules from adult rats exposed neonatally to EB. The values represent the mean ± SEM determined from at least four different animals per condition (* $p<0.05$, Student's *t*-test, compared to untreated group). (D) Cleaved caspase-3 levels were determined by Western Blotting analysis in adult rat testis from unexposed or 0.75, 1.25 and 2.5 µg/day EB exposed animals. Histograms represent cleaved caspase-3 protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/β actin protein) detected in the untreated group. The values represent the mean ± SEM determined from seven different animals (* $p<0.05$, One-way ANOVA, Bonferroni post-test, compared to control group). (E) PCNA immunostaining was performed on testis sections from untreated (0) and EB-treated males (2.5). The histograms represent the number of PCNA-positive cells per 100 seminiferous tubules from adult rats exposed neonatally to EB. The values represent the mean ± SEM determined from five different animals per condition.

Fig. 2. Neonatal exposure to EB induces a long-term alteration in miR-29s levels.

Mature miR-29a (A), miR-29b (B) and miR-29c (C) levels were determined by real-time PCR in adult rat testis from unexposed or 0.75, 1.25 and 2.5 µg/day EB-exposed animals. Mature miR-29a (D), miR-29b (E) and miR-29c (F) levels were determined by real-time PCR in

immature (PND6) or adult (PND90) rat testis from unexposed or 2.5 µg/day EB-exposed animals. Histograms represent relative microRNA levels normalized to U87 and SnoRNA levels. The values represent the mean ± SEM determined from 7-8 different animals (* $p<0.05$, One-way ANOVA, Bonferroni post-test, compared to control group).

Figure 3: Neonatal exposure to EB induces a long-term alteration of testicular Mcl-1 protein levels in adult rats. Protein levels for Mcl-1 were determined by Western Blotting analysis in adult (PND90) or immature (PND6) testes from untreated or 2.5 µg/day EB-exposed animals. Histograms represent protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/β actin protein) detected in the untreated group. The values represent the mean ± SEM from seven animals (PND90) or 5 pools of 3 testes from different animals (* - $p<0.05$, Student's *t*-test, compared to control group at the same age).

Fig. 4. Neonatal exposure to EB induces a long-term alteration of testicular DNMTs protein levels in adult rats without mRNA modification.

Transcripts levels of *Dnmt3A* (A), *Dnmt3B* (C) and *Dnmt1* (D) were determined by real-time PCR analysis in adult testis from unexposed and 2.5 µg/day EB-exposed rats. Histograms represent *Dnmt3A* (A), *Dnmt3B* (C) and *Dnmt1* (E) relative mRNA levels normalized to β-actin levels. The values represent the mean ± SEM determined from eight different animals (* $p<0.05$, Student's *t*-test, compared to untreated group). Protein levels for DNMT3A (B), DNMT3B (D) and DNMT1 (F) were determined by Western Blotting analysis in adult rat testis from unexposed or 0.75, 1.25 and 2.5 µg/day EB exposed animals. Histograms represent DNMT3A (B), DNMT3B (D) and DNMT1 (F) protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/β actin protein) detected in the untreated group. The values represent the

mean ± SEM determined from seven different animals (* p<0.05, One-way ANOVA, Bonferroni post-test, compared to control group).

Fig. 5. Neonatal exposure to EB induces a long-term alteration of testicular DNMTs protein levels in adult rats but not in immature rats.

Protein levels for DNMT3A (A), DNMT3B (B) and DNMT1 (C) were determined by Western Blotting analysis from pooled immature testes (PND6, 5 pools of 3 testes from different animals) and adult testis (PND90) from untreated or 2.5 µg/day EB-exposed animals. Histograms represent DNMT3A (A), Dnmt3B (B) and Dnmt1 (C) protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/β actin protein) detected in the untreated group at the same age. The values represent the mean ± SEM from five (PND6) or seven (PND90) different animals (* - p<0.05, Student's *t*-test, compared to control group at the same age).

Fig. 6. Long-term effects of neonatal exposure to EB on transcript levels of target sequences controlled by DNA methylation.

Transcript levels of *Ibtk* (A), *L1-ORF1* (B) and *L1-ORF2* (C) were determined by real-time PCR analysis in immature and adult rat testes exposed to EB. Histograms represent *Ibtk* (A), *L1-ORF1* (B) and *L1-ORF2* (C) transcripts levels normalized to β-actin levels compared to untreated group at the same age. The values represent the mean ± SEM determined from 8 different animals (* p<0.05, Student's *t*-test, compared to control group at the same age).

Fig. 7. Neonatal exposure to EB induces a long-term alteration of miR-29s family in the adult testis controlling DNMTs protein levels in germ cells.

Protein levels for DNMT3A (A), DNMT3B (B) and DNMT1 (C) were determined by Western Blotting analysis in GC-1 germ cell line transiently transfected (48h) by miR-29a, miR-29b and miR-29c. Histograms represent DNMT3A (A), DNMT3B (B) and DNMT1 (C) protein levels expressed as the percentage of the ratio (target protein/β actin protein) detected in the scramble-treated control cells. (D) Protein levels for Mcl-1 (B) were determined by Western Blotting analysis in GC-1 germ cell line transiently transfected (48h) by miR-29a, miR-29b and miR-29c. Histograms represent protein levels expressed as the percentage of the ratio (target protein/β actin protein) detected in the scramble-treated control cells. The values represent the mean ± SEM, (* $p<0.05$, Student's *t*-test, relative to untreated group).

TABLE 1: Body and testicular weight from adult (PND90) rats exposed during early neonatal period to EB. The data represent the mean ± SEM.

	Estradiol Benzoate (µg per day)			
	0	***0.75***	***1.25***	***2.5***
(n)	(8)	(10)	(10)	(13)
Body weight (g)	511.7 ± 19.4	471.2 ± 10.2	507.8 ± 13.1	511.5 ± 4.4
Testes weight (g)	3.231±0.133	3.205±0.100	3.026±0.132	3.057±0.071

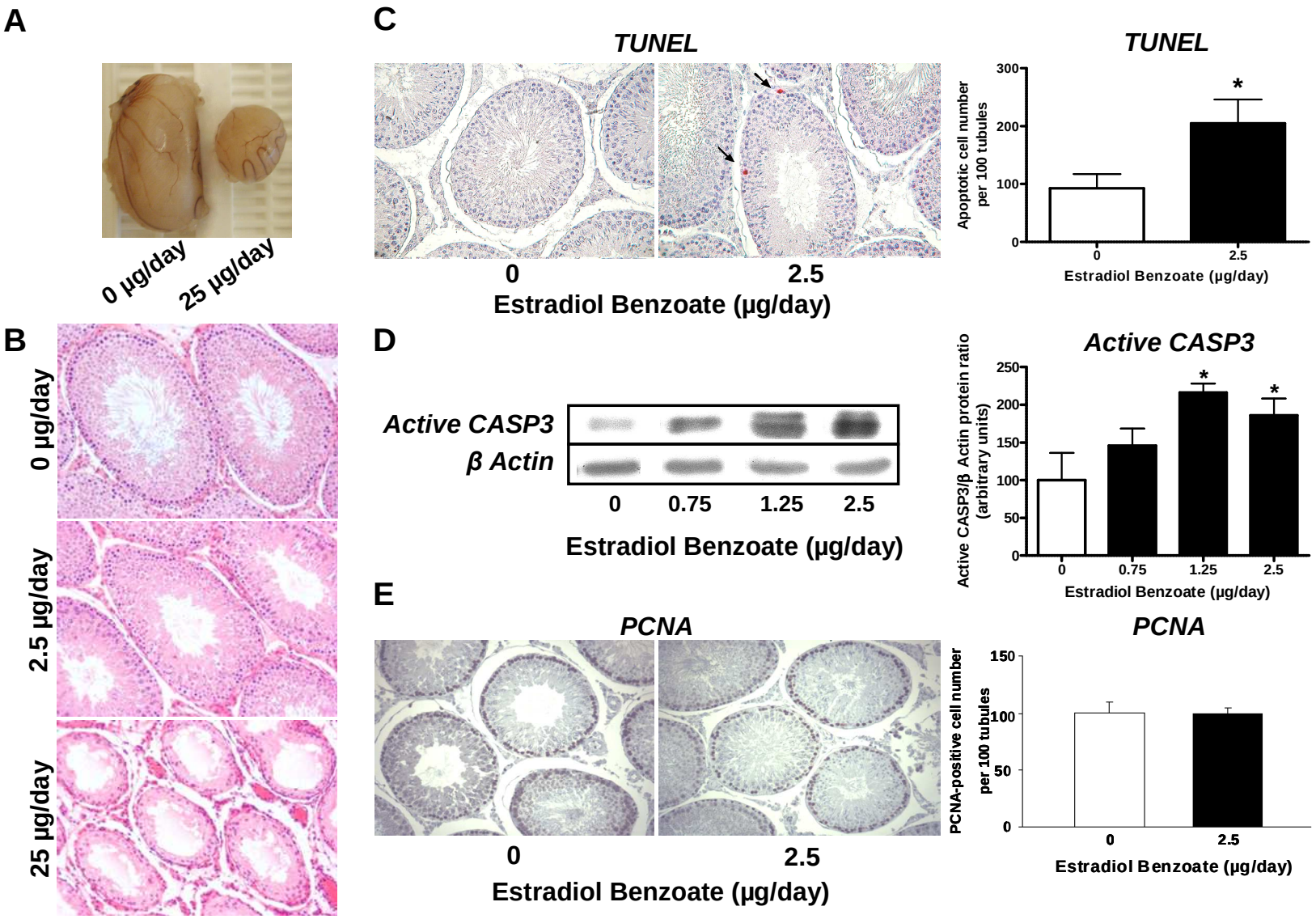


Fig. 1 Meunier et al.

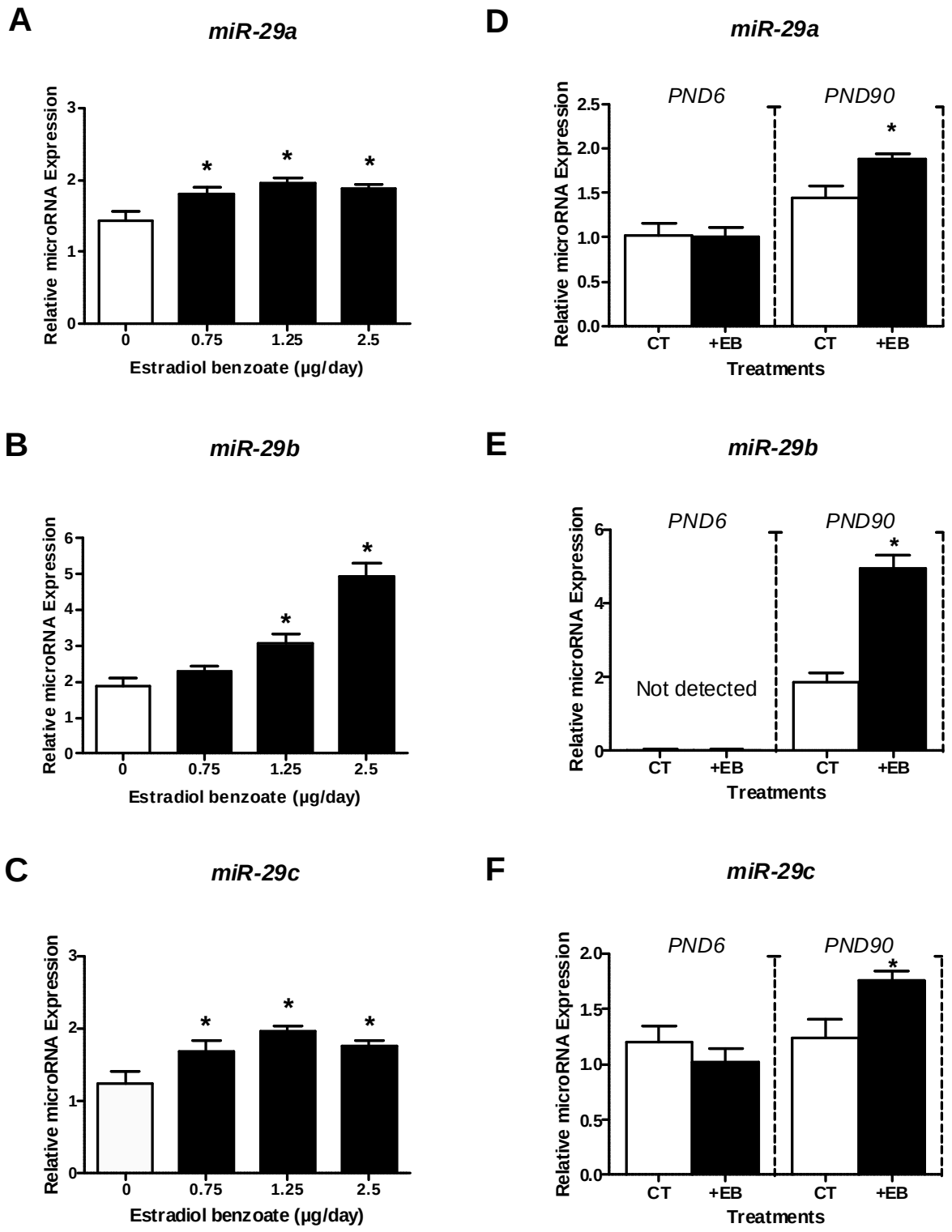


Fig. 2 Meunier et al.

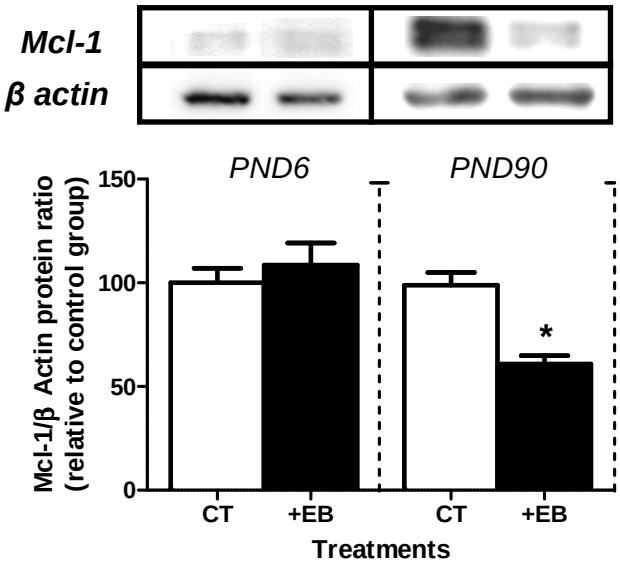


Fig. 3 Meunier et al.

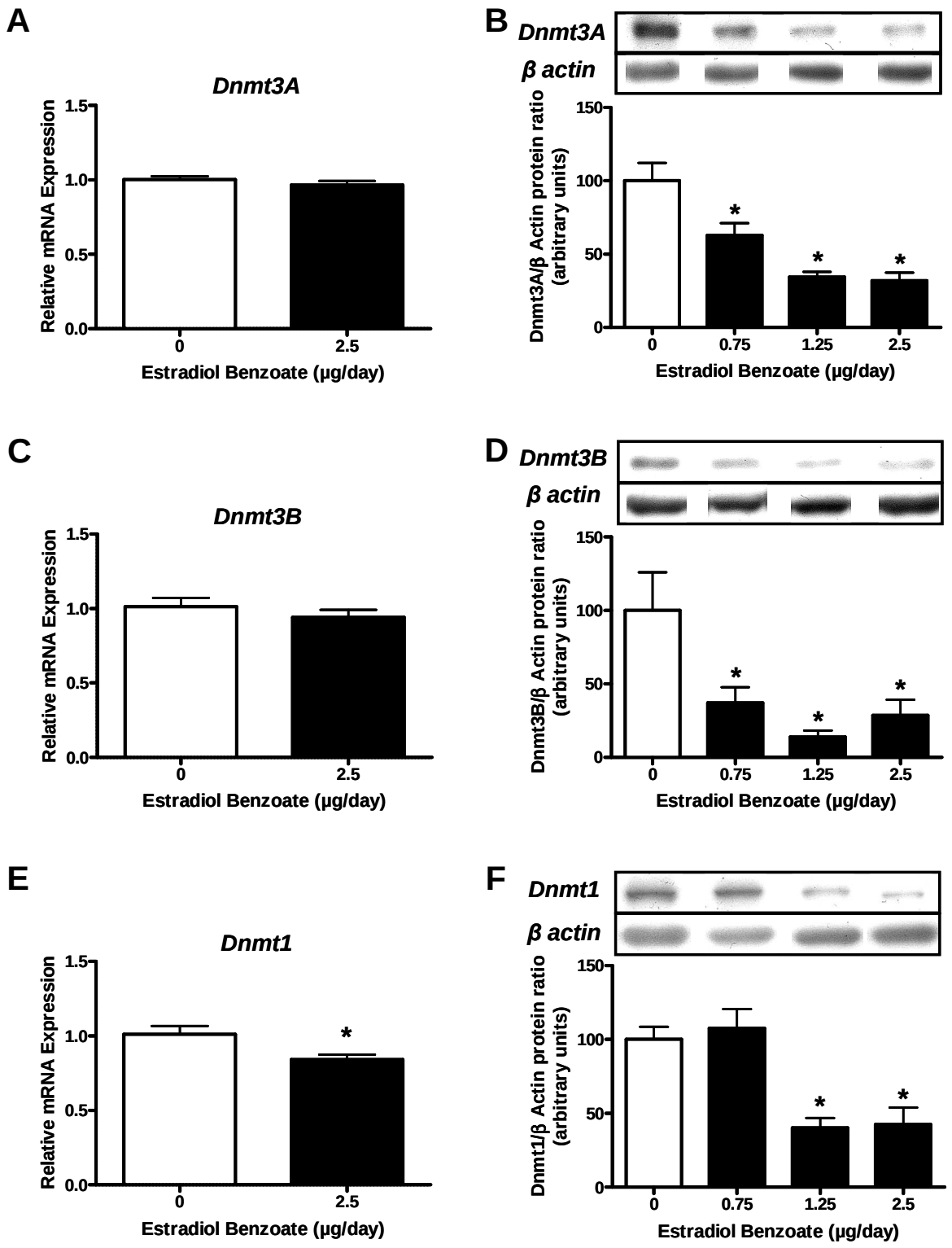


Fig. 4 Meunier et al.

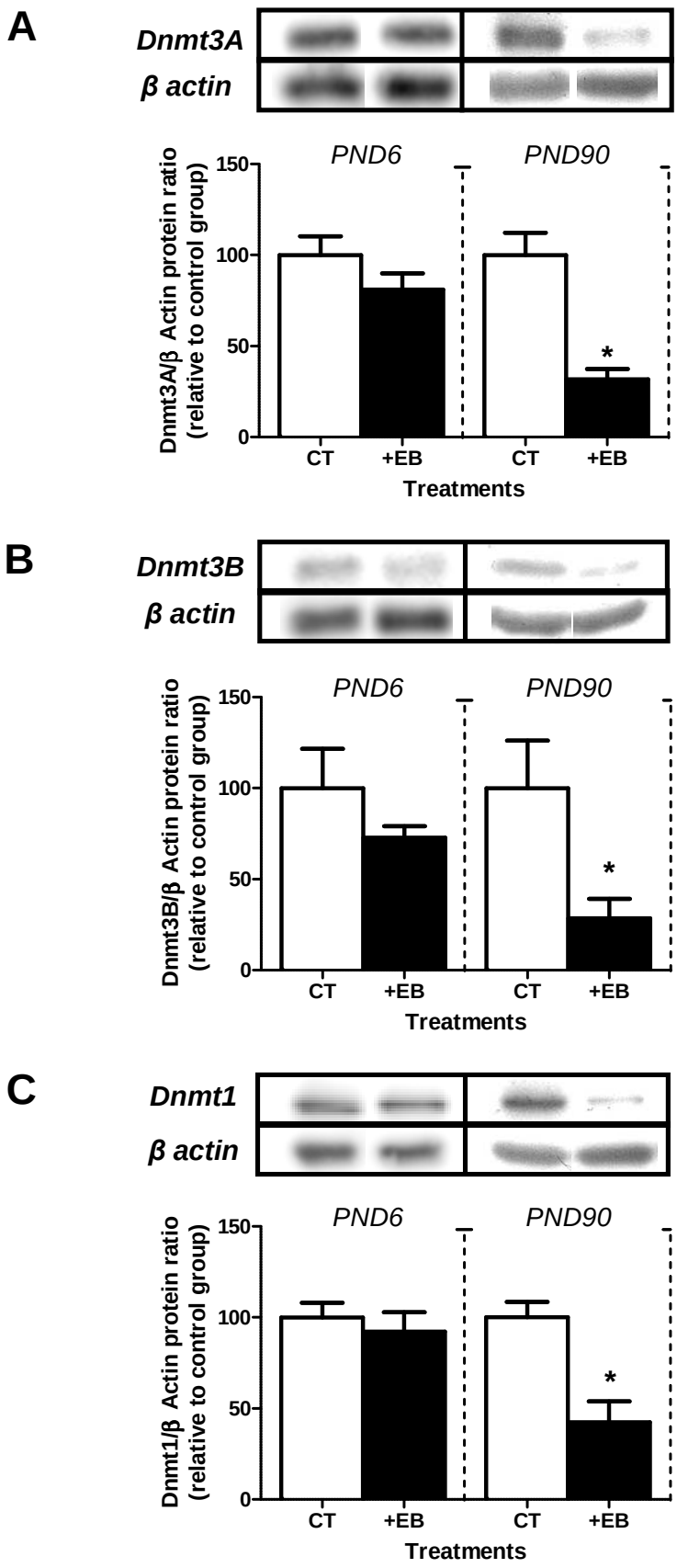


Fig. 5 Meunier et al.

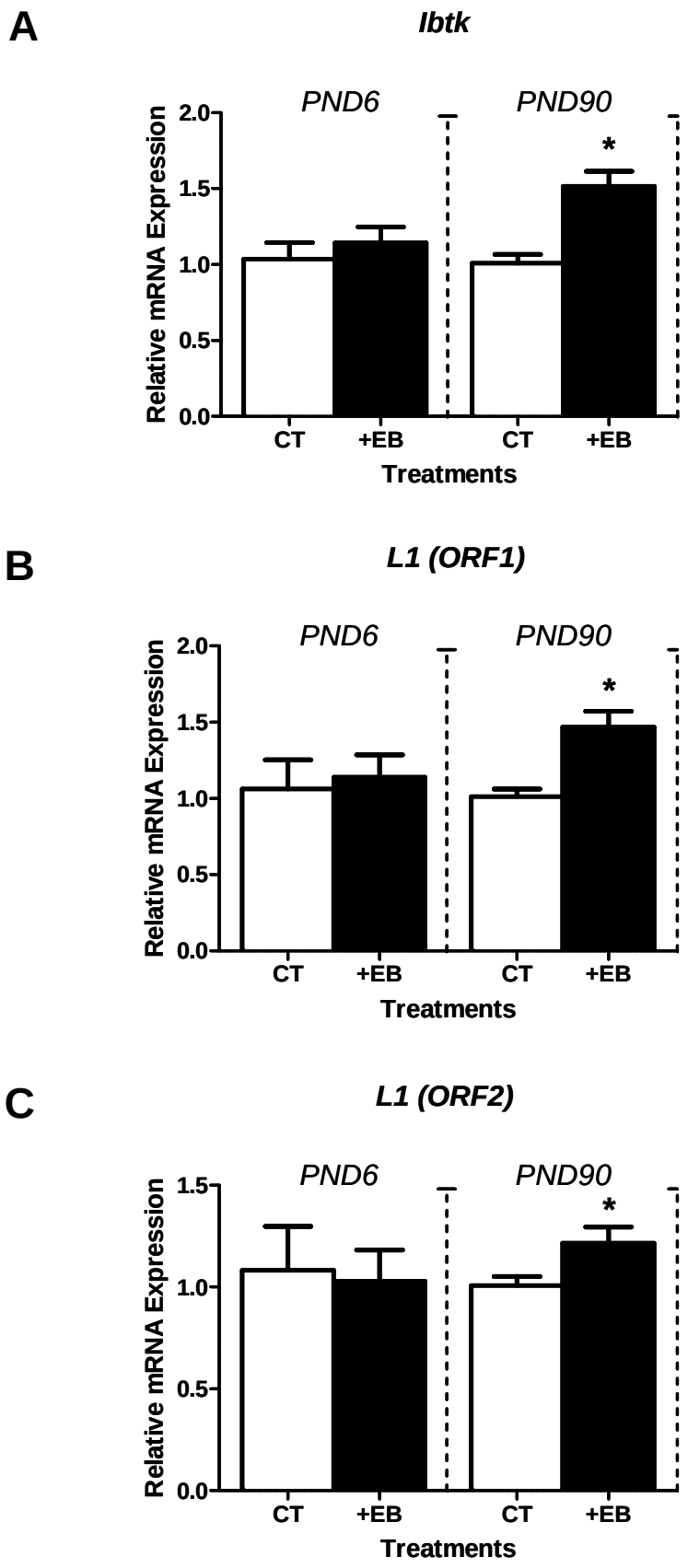


Fig. 6 Meunier et al.

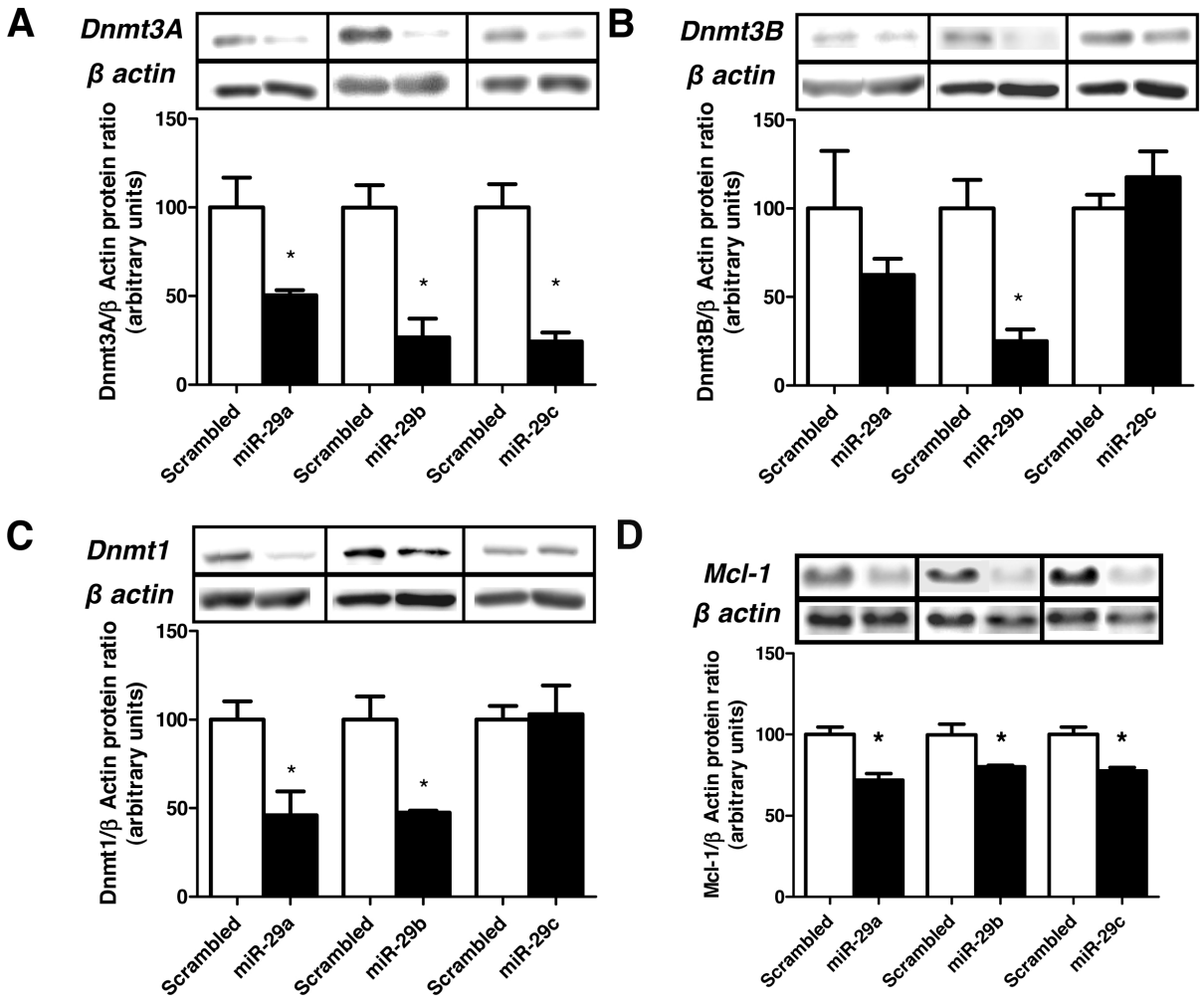


Fig. 7 Meunier et al.

3 - Article n°2 : Modifications à long terme du profil d'expression des protéines IAPs et SMAC/DIABLO dans le testicule de rat adulte après exposition *in utero* au flutamide

(Long term changes in the expression of IAP proteins and SMAC/DIABLO in the adult rat testis exposed in utero to flutamide)

SIDDEEK B., BOZEC A., MAIRE M., **MEUNIER L.**, BENAHMED M., MAUDUIT C.

Dans le cadre de l'exposition développementale à des composés perturbateurs endocriniens pouvant affecter le tractus génital mâle, notre laboratoire a développé depuis quelques années un modèle d'exposition fœtale à l'antiandrogène flutamide. Dans ce contexte le flutamide sert de composé prototype de perturbateur endocrinien à activité antiandrogénique. Les premières études menées dans notre équipe ont montré que l'exposition durant la vie fœtale (de 10 à 21 jpc) à l'anti-androgène flutamide à des doses de 0,4; 2 et 10 mg/kg*jour provoque une apoptose chronique, impliquant notamment l'activation des caspases effectrices 3 et 6, au niveau des cellules germinales testiculaires de rat adulte. Cette programmation fœtale de l'apoptose des cellules germinales touche spécifiquement les stades androgénodépendants de l'épithélium séminifère.

Afin d'approfondir l'étude des mécanismes apoptotiques mis en jeu après exposition fœtale au flutamide, nous avons cherché à identifier les mécanismes de régulation des caspases à travers la caractérisation de leurs inhibiteurs les IAPs (cIAP-1, cIAP-2, Survivin et XIAP) et de leur antagoniste SMAC/DIABLO par : (1) la mise en évidence de la localisation de ces protéines au niveau testiculaire, (2) l'étude de leur expression aux différentes doses d'exposition dans le testicule adulte et prépubère.

La localisation de ces molécules dans le testicule montre que dans les cellules germinales sont préférentiellement détectés : cIAP-1 (spermatocytes et spermatides), cIAP-2 (toutes les cellules germinales), et SMAC/DIABLO (spermatocytes). Dans les cellules

somatiques, les cellules de Sertoli expriment XIAP tandis que les cellules de Leydig expriment XIAP et la survivine.

La quantification des protéines par la technique du Western Blotting montre qu'une exposition *in utero* au flutamide provoque une diminution de l'expression des facteurs antiapoptotiques cIAP-1 et cIAP-2 dans le testicule adulte, et ce dès les faibles doses de flutamide (0,4 et 2 mh/kg*jour). L'expression du facteur proapoptotique SMAC/DIABLO augmente à la dose de 10 mg/kg*j. Des résultats comparables sont observés dans le testicule prépubère. En somme, l'exposition foetale au flutamide provoque une apoptose chronique des cellules germinales en raison d'une activation des caspases effectrices et une diminution d'expression de leurs inhibiteurs (IAPs).

Par ailleurs, nous savons que les cellules somatiques ne présentent pas de phénomènes apoptotiques chez les animaux exposés *in utero* au flutamide. Une des hypothèses envisageable serait que ces cellules développent des mécanismes de résistance à l'apoptose. En effet, dans les cellules de Sertoli, l'expression du facteur antiapoptotique XIAP augmente dans le testicule adulte et prépubère. De façon similaire, l'expression de la survivine augmente de façon significative dans les cellules de Leydig.

Enfin, il restait à déterminer si l'apoptose des cellules germinales est due à une altération initiale au niveau des cellules germinales ou au niveau des cellules de Sertoli. Pour cela, nous avons développé un modèle de cocultures où les cellules de Sertoli purifiées à partir d'animaux exposés ou non *in utero* au flutamide ont été cultivées avec des cellules germinales purifiées (spermatocytes ou spermatides) provenant d'animaux exempts de tout traitement. Ainsi, nous détectons une diminution de l'expression de cIAP-2 et une augmentation de son antagoniste SMAC/DIABLO dans les cellules germinales en coculture avec les cellules de Sertoli isolées d'animaux exposés *in utero* au flutamide. Ces résultats suggèrent que l'apoptose chronique des cellules germinales dans notre modèle implique une altération des fonctions sertoliennes qui de ce fait, ne sont plus capables de protéger les cellules germinales contre l'apoptose.

En conclusion, ces résultats montrent que les protéines appartenant à la famille des IAPs sont exprimées au niveau des cellules testiculaires. L'expression des IAPs dans le testicule apparait comme programmée sous l'action des androgènes durant la vie fœtale. Ceci se traduit dans le cas d'une exposition fœtale au flutamide par une altération de la programmation fœtale de la survie/mort des cellules testiculaires. En effet, les cellules de

Sertoli semblent subir une altération foetale de leur fonction lors de l'exposition *in utero* à l'antiandrogène qui se traduit à l'âge adulte par la mort des cellules germinales.

LONG TERM CHANGES IN THE EXPRESSION OF IAP PROTEINS AND SMAC/DIABLO IN THE ADULT TESTIS FROM RATS EXPOSED *IN UTERO* TO FLUTAMIDE.

ALINE BOZEC*[1], BENAZIR SIDDEEK*[1], MAGALI MAIRE, LEO MEUNIER[1], MOHAMED BENAHMED[1], CLAIRE MAUDUIT[1]

[1]**INSERM U895,**

[2]**BayerCropScience,** Sophia-Antipolis F-06903, France;

* AB and BS have equally contributed to the work in this manuscript.

Abbreviated title: fetal androgen disruption, Sertoli programming and IAPs protein expression

Correspondence to Dr Claire MAUDUIT

INSERM U 407, Faculté de Médecine Lyon-Sud, BP 12, 69921 Oullins Cedex-France

Tel: (33) 4 78 86 31 24

Fax: (33) 4 78 86 31 16

E-mail: mauduit@grisn.univ-lyon1.fr

Abstract.

While inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) are widely expressed in different cell types of the organism, no evidence have been yet reported on the regulation of their expression, particularly by hormones. In the present report, by using as a model adult or prepubertal rats exposed *in utero* to an anti-androgen (flutamide), we studied the regulation of IAPs expression in the testicular cells. Firstly the IAPs proteins studied were immunolocalized. cIAP-1, cIAP-2 and their antagonist Smac/DIABLO were mainly detected in testicular germ cells whereas XIAP and survivin were observed in testicular somatic cells. *In utero* exposure to flutamide induced a decrease of cIAP-1 (48%, $P<0.0001$) and cIAP-2 (59%, $P<0.0004$) protein levels in adult and prepubertal testes, while it induced an increase in Smac/DIABLO protein levels (9 fold, $P<0.0001$). In somatic testicular cells, survivin (1.5 fold, $P<0.0016$) and XIAP (10 fold, $P<0.0001$) protein levels were increased in the adult testis from rats exposed *in utero* to flutamide. Although *in utero* exposure to flutamide induced a chronic apoptosis in germ cells, the testicular somatic cells did not display programmed cell death, as previously shown. A possible explanation for this phenomenon could be the decrease of cIAP1 and cIAP2 expression in germ cells and the increase of XIAP and Survivin in somatic cells. The further issue to address was which testicular cell type is targeted for the initial alteration? By using as a model Sertoli cell - germ cell co-cultures, we showed that when Sertoli cells were isolated from rats exposed *in utero* to flutamide an increase in cleaved caspase-3 and Smac/DIABLO protein levels was observed in germ cells (originated from untreated rats) compared to germ cells co-cultured with Sertoli cells isolated from unexposed rats. In conclusion, IAPs expression is under the control of androgens and more likely under a fetal programming exerted by androgens.

INTRODUCTION

Proteins involved in apoptosis regulation are of biological interest and appear to be attractive therapeutic targets to circumvent the dysregulation of cell death pathways that occurs for example in cancer, immunodeficiciency or diseases induced by toxicological molecules. It is well known now that cellular apoptotic signaling pathways converge at the level of the specific proteases, the caspases. These proteases are synthesized as pro-enzymes, which usually undergo proteolysis that generate cleaved active caspases. Procaspase cleavage occurs as a cascade with upstream initiator caspases that cleave and activate downstream effector caspases. The active effector caspases, then, cleave cellular substrates leading to disruption of cytoskeletal integrity and to autodigestion of the cell (Hengartner, 2000; Wajant, 2002). However, the caspase activation and/or activity are regulated. Indeed, several cellular and viral proteins act as caspase inhibitors. For example, eukaryote cells contain inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) that can inhibit capases (Lawen, 2003). To date, at least, five different IAPs were described in man : X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), cIAP-1, cIAP-2, neuronal IAP and survivin. XIAP, cIAP-1, cIAP-2 and survivin are direct caspase inhibitors, since they bind to and inhibit several active caspases : XIAP inhibits caspases-3, –7 and procaspase-9 while cIAP-1 and cIAP-2 inhibit caspases-3 and –7 (Deveraux and Reed, 1999). The binding and inhibition of caspases by IAPs is mediated by the baculovirus IAP repeats (BIR) domain(s) present within IAP sequence. All mammalian IAPs have three BIR domains except survivin, which displays only one BIR domain. Smac/DIABLO, released from the mitochondria along with cytochrome c during apoptosis, has been shown *in vitro* to interact with several of IAP proteins including XIAP, cIAP-1, cIAP-2 and survivin by their BIR domains to inhibit their capacity to bind to active caspases (Du et al., 2000). However, the regulation of IAPs expression remains actually unknown. Since hormones and particularly androgens have been shown to trigger anti-apoptotic signals in different cell types, it is of interest to know if they regulate IAPs expression. In the present report, use was made of an experimental model of rats exposed *in utero* to different doses (0, 0.4, 2, 10 mg/kg/d) of the anti-androgen flutamide, their testicular functions were analysed at prepubertal and adult age. The drug flutamide (4’-nitro-3’-trifluoromethyl-isobutyranilide) and its active metabolite hydroxyflutamide are non-steroidal synthetic chemicals able to inhibit the action of androgens at the receptor level (Peets et al., 1974). *In utero* exposure to flutamide has been shown to induce major alterations in the accessory sex glands and in testis development and spermatogenesis in male rat offspring (Imperato-McGinley et al., 1992; Kassim et al., 1997;

McIntyre et al., 2001). Exposure to flutamide resulted in alterations ranging from macroscopic lesions with a decrease in the gonad weight to marked testicular histological alterations with moderate to severe hypospermatogenesis (McIntyre et al., 2001). The different types of lesions in the adult testes are depending upon the doses of flutamide received during the fetal life. At the macroscopic level, a significant decrease in testis weight (resulting from massive germ cell loss) was observed at the highest dose of flutamide (50 mg/kg/day). Although below 10 mg/kg/d of flutamide, testis weight and histology were not significantly altered, a long term apoptosis was detected even at the lowest doses (0.4 mg/kg/d.) (Bozec et al., 2004; Bray et al., 2002; Omezzine et al., 2003).

The aim of the present study was to determine (i) whether the components of the IAPs family and their inhibitor Smac/DIABLO are potentially involved in the death regulation machinery leading to caspase activation in adult rat germ cells from rats exposed *in utero* to flutamide, in this context Smac/DIABLO (pro-apoptotic protein), XIAP, survivin, cIAP-1 and cIAP-2 (anti-apopotic proteins) were localized and their expression was measured in terms of mRNA and protein and (ii) to determine which testicular cell type is targeted for the initial alteration induced by an *in utero* exposure to anti-androgen.

MATERIALS AND METHODS

Materials

TRIzol®, deoxynucleotides triphosphates (dNTPs) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 medium (1:1) were obtained from Life Technologies (Eragny, France). Flutamide, obtained from Aldrich Chemical Co (Mannheim, Germany) was dissolved in an aqueous solution of methylcellulose 400 (Fluka, Mulhouse, France) at 0.5 % (w/v) and stored for a maximum of one week at approximately 5C (± 3C). Protease inhibitor cocktail and collagenase/dispase were obtained from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Sigma (Meylan, France) was the source for random hexanucleotides, anti-actin and anti-XIAP antibodies, Tween-20, Biomax MR film, bicinchoninic acid (BCA), insulin, transferrin, and HEPES. Taq polymerase was purchased from Promega Life Science (Madison, WI). Horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG and chemiluminescent kit were obtained from CovalAb (Lyon, France). Horseradish peroxidase-labelled anti-goat IgG and the following primary antibodies were purchased from Santa Cruz biotechnology (Santa Cruz, CA): cIAP-1, cIAP-2 and Smac/DIABLO. The Envision^{+} kit, Mayer's hematoxylin and the aqueous mounting medium (faramount) were obtained from Dako (Trappes, France). The

UltraVision Detection System for immunology was obtained from Lab Vision Corporation (Fremont, CA). M-MLV and [α-^{33}P]-dATP (1000-3000) Ci/mmol were purchased from Amersham (Orsay, France). Primers were synthetized by ProligoFrance SAS (Paris, France). Penicillin-streptomycin and nystatin were obtained from ICN Biomedicals Inc.

Experimental animals

Fifteen pregnant rats (Sprague Dawley rats from Charles River laboratories St Aubin les Elbeuf, France) per group were administered vehicle (methylcellulose) or flutamide by gavage from gestation day 10 (GD 10) up to the day before delivery (GD 21 or 22). This period include the period of male internal and external sex differentiation. In order to study gene expression changes in this model, the doses of flutamide were chosen to avoid or minimize important germ cell loss that may confound the interpretation of the anti-androgen effects on gene testicular expression (McIntyre et al., 2001). Indeed, alterations in testicular cellularity (i.e. the ratio of somatic cells to germ cells) may confound the interpretation of the anti-androgen effects on gene expression in the different testicular cell types (for a review, see (Ivell, 2002 #481). Animals were administered flutamide at doses of 0, 0.4, 2, or 10 mg/kg body weight/day adjusted daily based on body weight. Dams were weighed daily from GD 10 up to day of delivery. At birth, each pup was sexed, weighted and identified. The male offspring received no flutamide treatment and were raised until the end of the study (post-natal day - PND - 14 or 90) where male rats were killed by CO_2 inhalation. The position of each testis was carefully appreciated and each testis was weighted before being fixed or frizzed. Only bilateral descended testes were studied in the present report. All studies on animals were conducted in accordance with current regulation and standards approved by INSERM animal care committee.

For the coculture studies, pregnant rats were treated as described above with flutamide (0 and 10mg/kg/day). The male offspring (30 male rats from differents litters for each experimental conditions) was sacrificed at 15-day-old. Sertoli cells were isolated as previously described by collagenase dissociation (Goddard et al., 2003). The Sertoli cells obtained were seeded in 6 cm diameter Petri dishes (Falcon, Los Angeles, CA) at a density of 500,000 cells/cm^2, and cultured in standard conditions (Goddard et al., 2003). Testicular germ cells (spermatocytes and spermatids) were isolated, as described by Boussouar et al. (Boussouar et al., 2003) from adult rats (PND 90 days) that were never exposed to anti-androgens. Two days after Sertoli cell isolation and culture, germ cells were added to Petri dishes generating three groups of cultured cells: Sertoli cells cultured without germ cells, Sertoli cells cultured in the presence

of spermatocytes (500,000 cells/cm^2) and Sertoli cells cultured in the presence of spermatids (500,000 cells/cm^2). After 72h of culture, the cells were collected, for western blotting analyses, in a cold PBS (Phosphate buffer saline) containing protease inhibitor cocktail (1% vol/vol).

Immunohistochemistry

Paraffin sections of Bouin-fixed testis were sectionned at 5 µm. The sections were mounted on positively charged Superfrost plus glass slides (Menzel-Glaser, Frelburg, Germany), deparaffinized, hydrated, treated 20 min at 93 - 98C in citric buffer (0.01M, pH 6), rinsed in osmosed water (2 x 5 min) and washed (2 x 5 min) in Tris buffer saline pH 7.8 (TBS). The Envision$^+$ kit (anti-cIAP-1, cIAP-2 antibodies) and the UltraVision Detection System (anti Smac/DIABLO antibody) were used as described earlier (Mauduit et al., 2001). The CSA II kit (Dako, Trappes, France) (anti XIAP antibody) was used as recommanded by the manufacturer. Antibodies were diluted as follows: 1/50 anti-cIAP-1 and anti-cIAP-2, 1/100 for anti-Smac, and 1/500 for anti-XIAP. As a negative control, the primary antibody was replaced by the antibody diluent. The same antibodies were used for immunohistochemistry and western blot analyses.

Western blotting analysis

Testicular tissues or testicular cell co-cultures, homogenized in 200 µL ice-cold hypotonic buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, protease inhibitor cocktail 1% vol/vol), were sonicated (10 sec at 80). Protein concentration was determined by the BCA assay.

Proteins (10 to 100 µg) were resolved on 10% SDS/polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes as earlier described (Mauduit et al., 2001). CIAP-1, cIAP-2 and Smac/DIABLO antibodies were diluted at 1/100, XIAP antibody was diluted at 1/1000. The protein loading was checked by reprobing the blot with an rabbit IgG anti-actin antibody (1/500). The films were scanned on Gel doc 2000 apparatus (BioRad) and quantitation was realized with Quantity one Software BioRad (Marne-la-Coquette, France). The results of at least three experiments were expressed as a percentage ratio to untreated animals.

PCR coamplification

Total RNAs were extracted from rat testis with TRIzol® reagent. The amount of RNA was estimated by spectrophotometry at 260 nm. cDNAs were obtained by reverse transcription of

2 µg of total RNAs using random hexanucleotides as primers (5 µM), in the presence of dNTP (0.2 mM), DTT (10 mM) and M-MLV life technologie (10 U/µl), 1h at 37C. At the end of experiment reverse transcription mix was diluted 1/2 with RNA-free water. For PCR each target gene (cIAP-1, cIAP-2, XIAP and Smac/DIABLO) was coamplified with an housekeeping gene (Cyclophilin A or S20), in presence of 2µL reverse transcription mix, 0,0255U/µL of Taq polymerase, 1 µM of target primers and 0.5 µM of Cyclophilin A or S20 primers, 100 µM of dNTP and 0,075 µL of [α-^{33}P]dATP. PCR amplification conditions were 95C for 5 min followed by 27 cycles for cIAP-1, 24 cycles for cIAP-2, XIAP, Smac/DIABLO of 95C 30 sec, melting temperature (Tm) 30 sec (Tm = 55C for XIAP; 56C for cIAP-1; 58C for cIAP-2 and Smac/DIABLO); 72C 30 sec. PCR ends with a step at 72C 5 min. At the end of PCR experiments, PCR products (from target and housekeeping genes) were resolved on a 8% polyacrylamide gel. The dried gels were exposed on a phosphor screen about 30 min at 1h. Quantification of each PCR product was performed on Cyclone (Packard) with the Optiquant Software (Packard, Meriden, CT, USA). The following primers were used : cIAP-1 Forward 5'-CCCCACTGTCCATTTCT-3' Reverse 5'- GGGTCATCTCCGGGTTC-3'. PCR product was 232 bp. cIAP-2 Forward 5'- CGGCATCAGGTGACTTG-3' Reverse 5'-CCTTGACTAAGATGGTGTCG-3'. PCR product was 191 bp. XIAP Forward 5'-TCTTGACAGGCCGTCG-3' Reverse 5'- CCCCGTGTAGTAGAGTCC-3'. PCR product was 195 bp. Smac/DIABLO Forward 5'- TCTCTCAGTAACGAAGCA-3', Reverse 5'-CACACCTCATCTTCCTCC-3'. PCR product was 192 bp. CyclophilineA Forward, 5'-ACCCCACCGTGTTCTTCG-3' Reverse, 5'-CATTTGCCATGGACAAGA-3'. PCR product was 299 bp. S20 Forward, 5'-GAGGAACAAGTCGGTCAGG-3' Reverse 5'-CTCCACTCCAGGCTCAATACT-3' PCR product was 367 bp. All PCR products were checked by direct sequencing. PCR analyses were carried out from the logarithmic phase of amplification. RT-PCR primers were designed inside separate exons to avoid any bias related to residual genomic contamination. Moreover, for all primers, no amplification was observed when PCR was performed on RNA preparations.

Data Analysis

For protein and mRNA level quantitation, ten animals from different litters were used for each experimental condition. Three different experiments of *in utero* exposure to flutamide were carried out. The results shown were a representative experiment. For statistical analysis one way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine whether there were differences between all groups ($P < 0.05$), and then the Bonferroni post-test was performed **to**

determine the significance of the differences between the pair of groups. A P value below 0.05 was considered significant. The statistical tests were performed on StatView software version 5.0 (SAS institute Inc, Cary, NC).

RESULTS

Localization of IAPs in adult testes exposed in utero to flutamide.

cIAP-1 immunostaining was detected exclusively in seminiferous tubules (Fig. 1A), mainly germ cells, pachytene spermatocytes and to a lesser extend in round spermatids. cIAP-1 immunostaining was observed at all the stages of the seminiferous epithelium in the testis from unexposed adult rats (Fig. 1A). cIAP-2 was detected in all the cells of the seminiferous tubules including Sertoli and germ cells but was not detected in intertitial Leydig cells (Fig. 1C). cIAP-2 was present at the different stages of seminiferous epithelium and particularly the androgeno-dependent stage VIII (Fig. 1C). Smac/DIABLO immunostaining was exclusively in testicular germ cells (pachytene spermatocytes and round spermatids) and was present in all stages of the seminiferous epithelium testes in the exposed or unexposed adult rat (Fig. 1E-F). XIAP immunostaining was predominantly localized to somatic Sertoli and Leydig cells with a higher expression in Sertoli cells (Fig. 1G). XIAP was not detected in myoid cells or germ cells from unexposed rats (Fig. 1G). XIAP was present in all seminiferous stages of testes (Fig. 1G). By contrast, survivin was exclusively detected in somatic Leydig cells (Fig. 1I). *In utero* exposure to flutamide (10 mg/kg per day) did not modified the immunolocalization for the different IAP proteins studied in the testis (Fig. 1B, D, F, H, J).

Effects of in utero exposure to flutamide on IAPs mRNA and protein levels in adult and prepubertal rat testes.

In utero exposure to the anti-androgen induced in the adult rat testes (PND 90) a dose-dependent decrease in both cIAP-1 mRNA and protein levels (Fig. 2 A-B). A significant decrease in cIAP-1 mRNA levels was observed at 2mg/kg/d (about 34.5%, $P<0.0023$). The highest decrease (about 48% $P<0.0001$) was observed at 10 mg/kg.d of flutamide (Fig. 2A). Similarly, cIAP-1 protein levels were decreased after *in utero* exposure to the anti-androgen at the different doses used 0.4 (55% decrease $P<0.0002$), 2 (65% decrease $P<0.0001$) and 10 (77% decrease $P<0.0001$) mg/kg.d of flutamide (Fig. 2B). In the prepubertal testes (PND 14), the cIAP-1 protein levels were lower than in adult testes and were not affected by an *in utero* exposure to flutamide (Fig. 2C). Concerning cIAP-2, *In utero* exposure to anti-androgen had

no effect on its mRNA levels in the adult rat testes (Fig. 3A) while it induced a significant decrease in cIAP-2 protein levels at the doses 0.4 (P<0.0001), 2 (about 50% P<0.0038) and 10 (about 59% P<0.0004) mg/kg.d (Fig. 3B). Similarly, a decrease in cIAP-2 protein levels was detected in the prepubertal testes with a significant decrease observed at 2 (about 67% P<0.0001) and 10 (about 73% P<0.0001) mg/kg•d. of flutamide (Fig. 3C).

Since cIAP-1 and cIAP-2 were immunolocalized in testicular germ cells, it is of interest to know if their antagonist Smac/DIABLO, also expressed in germ cells, was affected by the anti-androgen exposure. Smac/DIABLO mRNA levels were not affected in adult rat testes exposed *in utero* to the different doses (0, 0.4, 2, 10 mg/kg/d) of anti-androgen (Fig. 4A). In contrast, Smac/DIABLO protein levels were increased (Fig. 4B). A significant (P<0.0001) increase (about 9 fold) in Smac/DIABLO protein levels was detected at 10 mg/kg.day of flutamide (Fig. 4B). Since, Smac/DIABLO is exclusively detected in meiotic and post meiotic germ cells (Fig. 1E). It's not surprising not to detect Smac/DIABLO proteins in prepubertal testes from unexposed or exposed rats (data not shown).

While somatic cells (Leydig and Sertoli cells) are the direct target of androgens (since they expressed the androgen receptors), no apoptotic process was detected in these testicular cell types (Bozec et al., 2004). In this context, the expression of anti-apoptotic molecules such as IAPs in these cells is of interest. *In utero* exposure to flutamide did not affect the mRNA levels of XIAP in the adult rat testes (Fig. 5A). In contrast, XIAP protein levels were increased significantly (2-fold, P<0.0082) at 10 mg/kg/d (Fig. 5B). Similarly, XIAP proteins levels were significantly (10-fold, P<0.0001) increased in prepubertal testes (Fig. 5C). Survivin mRNA levels were not affected in adult rat testes exposed *in utero* to the different doses (0, 0.4, 2, 10 mg/kg/d) of flutamide (Fig. 6A). In contrast, survivin protein levels were increased by thefetal exposure to anti-androgen with a significant (p<0.0075) increase (about 10 fold) detected at 10 mg/kg per day of flutamide in the adult testes (Fig. 6B). Similarly, a significant (P<0.0016) increase (1.5-fold) in survivin protein levels at dose 10 mg/kg/d of flutamide (Fig. 6C) was observed in the testes form prepubertal animals.

IAPs proteins levels in Sertoli cell - germ cell co-cultures.

To go further with the mechanisms involved in the apoptotic cell death chronically observed in testicular germ cells from rats exposed *in utero* to anti-androgens, we developed a model of cellular co-cultures where Sertoli cells were isolated from prepubertal (PND 14) rats exposed or not *in utero* to flutamide and germ cells (spermatocytes or spermatids) isolated from adult rats that were not exposed to any drugs. Concerning the IAPs proteins, no changes in cIAP-2

levels were observed whether Sertoli cells are isolated from rats exposed *in utero* to flutamide or not exposed (Fig. 7A). By contrast, the cIAP-2 protein levels were decreased in the Sertoli cell - spermatocyte co-cultures (about 30%, $P<0.017$, Fig. 7B) and in the Sertoli cell - spermatid co-cultures (about 30%, $P<0.039$, Fig. 7C), when Sertoli cells were isolated from rats exposed *in utero* to flutamide.

Smac/DIABLO protein levels were not detected in Sertoli cell (alone) cultures (data not shown) confirming the immunohistochemistry experiments (Fig. 1F). The Smac/DIABLO protein levels were increased in Sertoli cell - spermatocyte co-cultures (about 30%, $p<0.0001$) when Sertoli cells were isolated from rats exposed *in utero* to flutamide (Fig. 8A). By contrast, the levels of Smac/DIABLO were not affected in Sertoli cell - spermatid co-cultures (Fig. 8B), whether Sertoli cells were isolated from non-exposed or exposed rats.

Concerning XIAP, its levels were no modified by the *in utero* exposure in the Sertoli cell (alone) cultures (Fig. 9A). However, a significant increase in the XIAP protein levels were observed in Sertoli cell - spermatocyte (about 3-fold, $p<0.0005$) (Fig. 9B) or Sertoli cell - spermatids (about 10-fold, $p<0.0001$) co-cultures, when Sertoli cells were isolated from rats exposed *in utero* to the anti-androgen (Fig. 9C).

DISCUSSION

The inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) getting increasing interest since they might be therapeutic targets. However, the regulation of their expression by hormones and cell-to-cell interactions are poorly understood. We have developped a model of androgen deprivated rats to study IAP expression in the context of cell-to-cell interactions. Adult male rats, exposed *in utero* to an anti-androgen named flutamide displayed an altered spermatogenesis, related to a chronic increase of germ cell death apoptotic process (Bozec et al., 2004). The germ cell death is linked to an increase in the expression and activation effector caspases (Omezzine et al., 2003). The aim of this study was to determine the regulatory pathways of the effector caspases i.e. IAP family proteins such as XIAP, cIAP-1, cIAP-2 and survivin and their antagonist Smac/DIABLO in terms of cellular localization and changes in mRNA and protein levels.

In previous reports, high protein levels of Smac/DIABLO were detected in the mouse testis (Tikoo et al., 2002; Vera et al., 2004). In the present report, Smac/DIABLO was localized, in the rat testes, exclusively to pachytene spermatocytes and round spermatids. Concerning the inhibitors of apoptosis, they were either immunolocalized to somatic (XIAP, survivin and

cIAP-2) or germ cells (cIAP-2, cIAP-1). Indeed, XIAP was detected in somatic Sertoli and Leydig cells, while survivin was localized mainly to Leydig cells. While XIAP remained not immunolocalized in the testis, survivin was detected either in germ cells (Wang et al., 2004) or Leydig and germ cells (Weikert et al., 2004). The reasons for these discrepancies are not known, however, they could be accounted for by the use of different antibodies and/or different technical approaches (immunohistochemistry versus *in situ* hybridization). The other IAPs tested, in the present study, were localized to all the cells of the seminiferous tubules (cIAP-2) or mainly to pachytene spermatocytes and to a lesser extend spermatids (cIAP-1). The immunolocalization of the different proteins tested was not modified in the adult rat testes exposed *in utero* to the flutamide.

A fetal androgen disruption triggers a long term apoptotic cell death process in adult testicular germ cells but not in somatic cells (Bozec et al., 2004; Omezzine et al., 2003). As we previously report, this germ cell apoptosis could be related to a long-term modification in the activation of effector caspases-3 and –6 (Omezzine et al., 2003). The present work suggest that an alteration in IAP expression is also involved in the apoptotic cell death of testicular germ cells. Indeed, germ cells from adult rats exposed *in utero* to flutamide displayed a decrease in the expression of two inhibitors of apoptosis, at the mRNA (cIAP-1) and protein (cIAP-1 and cIAP-2) levels. The decrease in cIAP-1 and cIAP-2 protein levels was observed as early as 0.4 mg/kg/d of flutamide. Furthermore, expression of the IAPs antagonist Smac/DIABLO, which was also immunolocalized to testicular germ cells, was increased at the protein levels in the adult testes from *in utero* exposed animal at the highest dose of flutamide. Similarly, cIAP-2 protein levels were decreased in prepubertal testes from fetally exposed rats to anti-androgen suggesting the chronic effects of flutamide. By contrast, cIAP-1 protein levels were not modified and Smac protein was not detected in the testes from prepubertal rats *in utero* exposed to anti-androgens. These observations could be explained by the lack (or very low levels) of meiotic and post meiotic germ cells in the testis from prepubertal (PND 14) rats. The modification in cIAP-1, 2 and Smac/DIABLO protein levels in the adult testes and in cIAP-2 protein levels in the prepubertal testes from animals exposed *in utero* to flutamide could represent an explanation for the long-term activation of effector caspase-3. Indeed, a decrease in cIAP-1 and 2 protein levels could induce both an increase in effector caspase activation and a decrease in caspase degradation (since IAPs target caspases to proteasome). In a previous report, we showed that a significant increase in the number of apoptotic germ cells was detected between 2 and 10 mg/kg•d of flutamide, whereas a steady state in cleaved caspase-3 levels was observed (Omezzine et al., 2003). These apparent

discrepancies could be explained by the present study through the increase in Smac/DIABLO proteins levels at dose 10 mg/kg/d of the anti-androgen. Indeed, an increase in Smac/DIABLO protein levels by linking the remaining IAPs could enhance the levels of free active effector caspase-3 allowing the execution of apoptosis in germ cells.

While fetal androgen disruption triggered apoptosis in testicular germ cells, these cells are devoid of androgen receptor (AR) indeed, AR are expressed by somatic cells (Leydig, Sertoli and peritubular myoïd cells (You, 1998). Testicular germ cells are known to develop in close interactions with Sertoli cells within the seminiferous tubules since Sertoli cells provide an adequat cytoarchitectural environment and are considered to be nourhising, supporting cells to germ cells. In this context, the further issue to address was: are the functions of supporting Sertoli cells altered by the fetal androgen disruption? In this context we have developed a model of Sertoli cell - germ cell co-cultures where Sertoli cells are isolated from prepubertal rats exposed *in utero* or not exposed to flutamide and germ cells (meiotic spermatocytes or post-meiotic spermatids) are isolated from adult rats never exposed to any treatment. Our results showed that cIAP-2 protein levels were decreased in germ cells co-cultured with Sertoli cells isolated from rats exposed *in utero* to flutamide. Moreover, Smac/DIABLO protein levels were increased in spermatocytes co-cultured with Sertoli cells isolated from rat exposed *in utero* to the anti-androgen. These data clearly show that Sertoli cell functions are chronically altered by an *in utero* androgen disruption. Indeed, fetal exposure to flutamide unabled Sertoli cells to protect adult germ cells against apoptosis. The mechanisms of the alterations occuring in Sertoli cells are actually not known, however, the possibility exists that the *in utero* exposure to the anti-androgen could alter the epigenetic control of some specific testicular genes expressed under androgen control, for example the methylation pattern of the androgeno-dependant target gene promoter. Indeed, McLachlan showed that neonatal exposure to estrogen-like diethylstilbestrol induced in adult rats a chronic methylation of c-fos and lactoferrin promoter which has been correlated with the formation of uterine carcinoma in adult animals (McLachlan, 2001).

While somatic Sertoli and Leydig cells are the direct target cells of testosterone action, these cells did not display apoptosis. The levels of the antiapoptotic molecule survivin, that was localized to Leydig cells were increased in the testes from adult and prepubertal rats exposed *in utero* to flutamide. This increase in survivin levels might explain the lack of apoptotic process in Leydig cells. Moreover, survivin might be a precocious marker of Leydig cell hyperplasia observed at higher flutamide doses (Benbrahim et al, J Endocrinol, in revision). The levels of the anti-apoptotic molecule XIAP, localized to testicular somatic cells were

increased in the testes from adult or prepubertal animals exposed *in utero* to flutamide, suggesting that XIAP protects somatic cells against apoptosis. The possibility exists that the levels of XIAP in Sertoli cells were driven by germ cell status and particularly germ cell death. Indeed, whereas XIAP protein levels were unmodified in Sertoli cell (alone) cultures whether isolated from exposed or unexposed animals, XIAP protein levels were increased in Sertoli cells isolated from flutamide exposed rats when co-cultured with germ cells. These data suggested that the XIAP increase in Sertoli cells is the result of an interaction between germ cells and Sertoli cells.

In summary, our results showed that IAPs protein expression is under androgen regulation through a fetal programming and is under a regulation driven by germ cell to somatic cell interactions.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Immunostaining of IAP proteins in the adult testes from rats exposed *in utero* to flutamide.

Sections were treated with antibodies raised against cIAP-1 (A, B), cIAP-2 (C, D), Smac/DIABLO (E, F), XIAP (G, H) or survivin (I, J). Testes were obtained from adult rats unexposed (A, C, E, G, I) or exposed *in utero* to 10 mg/kg.d of flutamide (B, D, F, H, J). Scale bar = 50 μm ; inset scale bar = 200 μm.

FIGURE 2: Effects of *in utero* exposure to flutamide on cIAP-1 mRNA and protein levels in the adult and prepubertal rat testes.

cIAP-1 mRNA (A) and protein (B) levels were determined in the testes from adult rats not exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg•day of flutamide. cIAP-1 protein (C) levels were determined in the testes from prepubertal rats not exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg•day of flutamide. The figure represents the values (•) and the mean (-) determined from at least ten different animals from different litters. In the upper panels are shown representative auto-radiograms. * Control versus 0.4 mg/kg•d, $p<0.0001$; ** control versus 2mg/kg•d, $p<0.0023$, and *** control versus 10mg/kg•d, $p<0.0001$.

FIGURE 3: Effects of *in utero* exposure to flutamide on cIAP-2 mRNA and protein levels in the adult and prepubertal rat testes.

cIAP-2 mRNA (A) and protein (B) levels were determined in the testes from adult rats not exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg•day of flutamide. cIAP-2 protein (C) levels were determined in the testes from prepubertal rat not exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg•day of flutamide. The figure represents the values (•) and the mean (-) determined from at least ten different animals from different litters. In the upper panels are shown representative auto-radiograms. * Control versus 0.4 mg/kg/d, $p<0.0001$; ** control versus 2mg/kg/d, $p<0.0038$, and *** control versus 10mg/kg/d, $p<0.0004$.

FIGURE 4: Effects of *in utero* exposure to flutamide on Smac/DIABLO mRNA and protein levels in the adult and prepubertal rat testes.

Smac/DIABLO mRNA (A) and protein (B) levels were determined in the testes from adult rats not exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg/day of flutamide. Smac/DIABLO protein (C) levels were determined in the testes from prepubertal rats not

exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg/day of flutamide. The figure represents the values (•) and the mean (-) determined from at least ten different animals from different litters. In the upper panels are shown representative auto-radiograms. * Control versus 10 mg/kg/d, $p<0.0001$.

FIGURE 5: Effects of *in utero* exposure to flutamide on XIAP mRNA and protein levels in the adult and prepubertal rat testes.
XIAP mRNA (A) and protein (B) levels were determined in the testes from adult rats not exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg•day of flutamide. XIAP protein (C) levels were determined in the testes from prepubertal rats not exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg/day of flutamide. The figure represents the values (•) and the mean (-) determined from at least ten different animals from different litters. In the upper panels are shown representative auto-radiograms. * Control versus 10 mg/kg•d, $p<0.0082$.

FIGURE 6: Effects of *in utero* exposure to flutamide on survivin mRNA and protein levels in the adult and prepubertal rat testes.
survivin mRNA (A) and protein (B) levels were determined in the testes from adult rats not exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg/day of flutamide. survivin protein (C) levels were determined in the testes from prepubertal rats not exposed (0) or exposed *in utero* to 0.4, 2 or 10 mg/kg/day of flutamide. The figure represents the values (•) and the mean (-) determined from at least ten different animals from different litters. In the upper panels are shown representative auto-radiograms. * Control versus 10 mg/kg/d, $p<0.0075$.

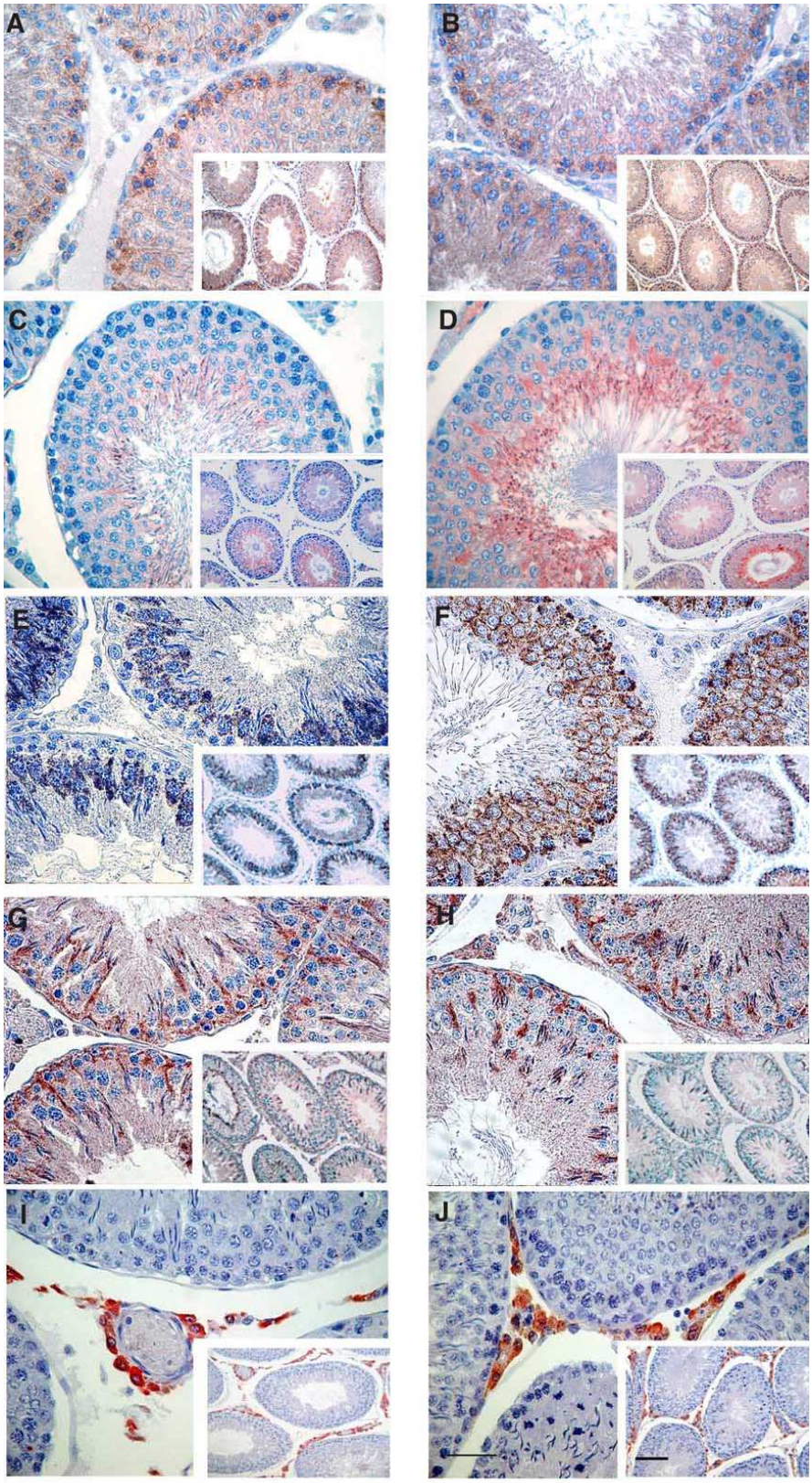
FIGURE 7: cIAP-2 protein levels in Sertoli cell - germ cell co-cultures.
CIAP-2 protein levels were determined in Sertoli cells isolated from prepubertal rats not exposed (-) or exposed (+) *in utero* to 10 mg/kg/day of flutamide. Sertoli cells were cultured alone (A) or in presence of spermatocytes (B) or in presence of spermatids (C) isolated from unexposed adult rats. The figure represents the values from non-exposed (Δ) or exposed (•) and the mean (-). In the upper panels are shown representative auto-radiograms. (*) $p<0.017$, (**) $p<0.039$.

FIGURE 8: Smac/DIABLO protein levels in Sertoli cell - germ cell co-cultures.
Spmac/DIABLO protein levels were determined in Sertoli cells isolated from prepubertal rats not exposed (-) or exposed (+) *in utero* to 10 mg/kg/day of flutamide. Sertoli cells were

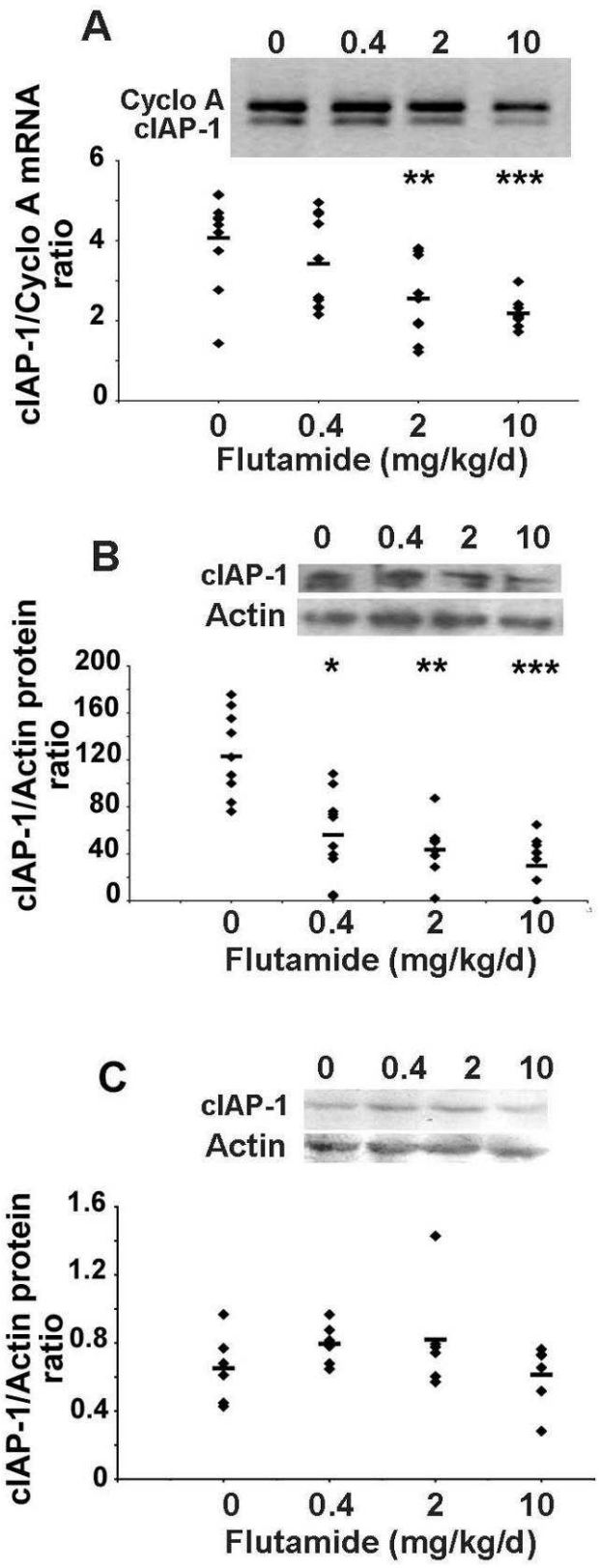
cultured alone (A) or in presence of spermatocytes (B) or in presence of spermatids (C) isolated from unexposed adult rats. The figure represents the values from non-exposed (Δ) or exposed (•) and the mean (-). In the upper panels are shown representative auto-radiograms. (*) $p<0.0001$.

FIGURE 9: XIAP protein levels in Sertoli cell - germ cell co-cultures.

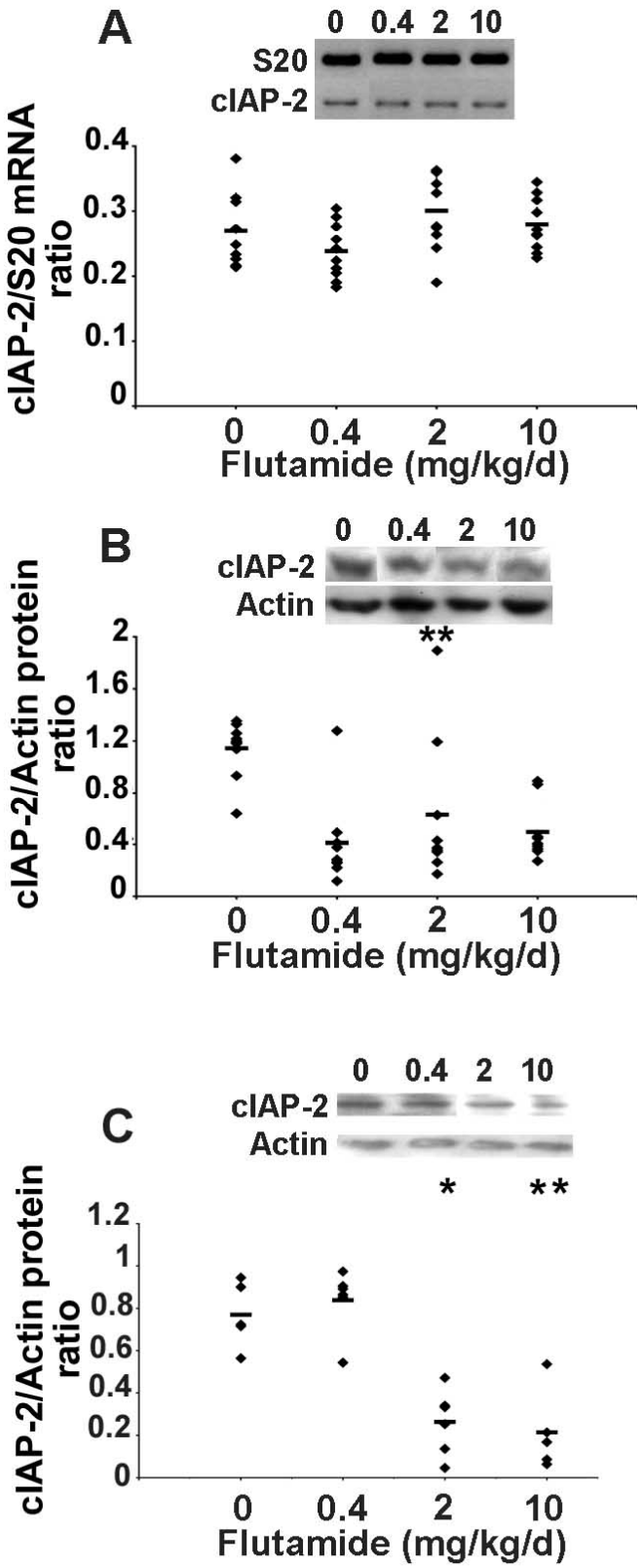
XIAP protein levels were determined in Sertoli cells isolated from prepubertal rats not exposed (-) or exposed (+) *in utero* to 10 mg/kg/day of flutamide. Sertoli cells were cultured alone (A) or in presence of spermatocytes (B) or in presence of spermatids (C) isolated from unexposed adult rats. The figure represents the values from non-exposed (Δ) or exposed (•) and the mean (-). In the upper panels are shown representative auto-radiograms. (*) $p<0.0005$, (**) $p<0.0001$.



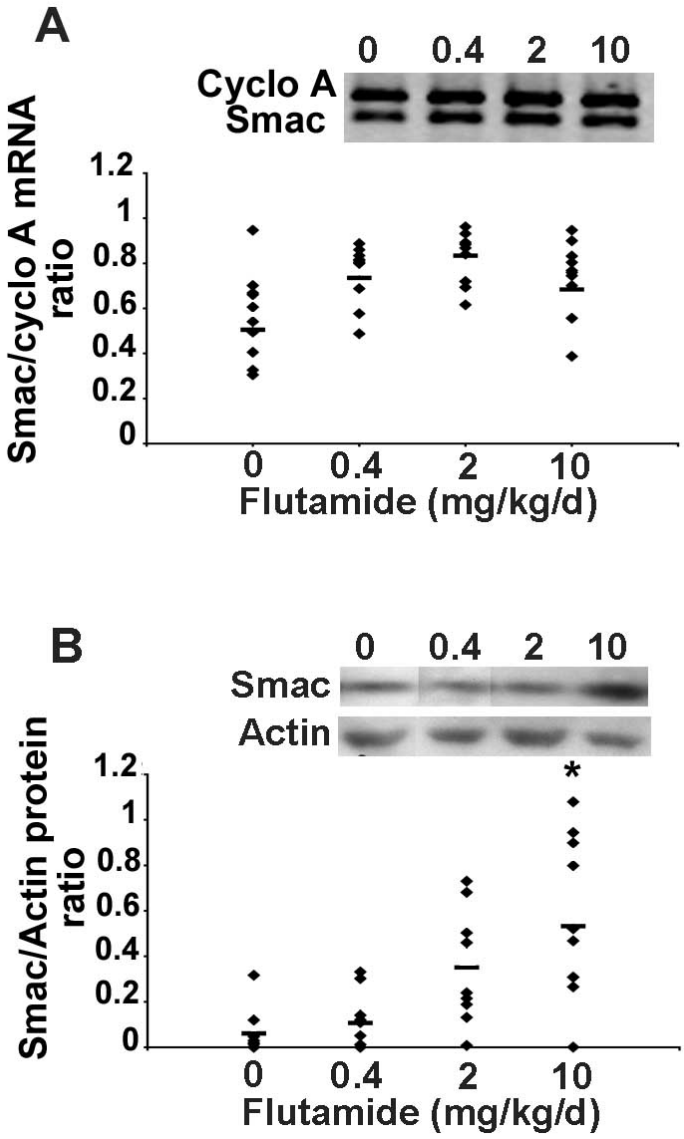
Bozec et al. Fig. 1



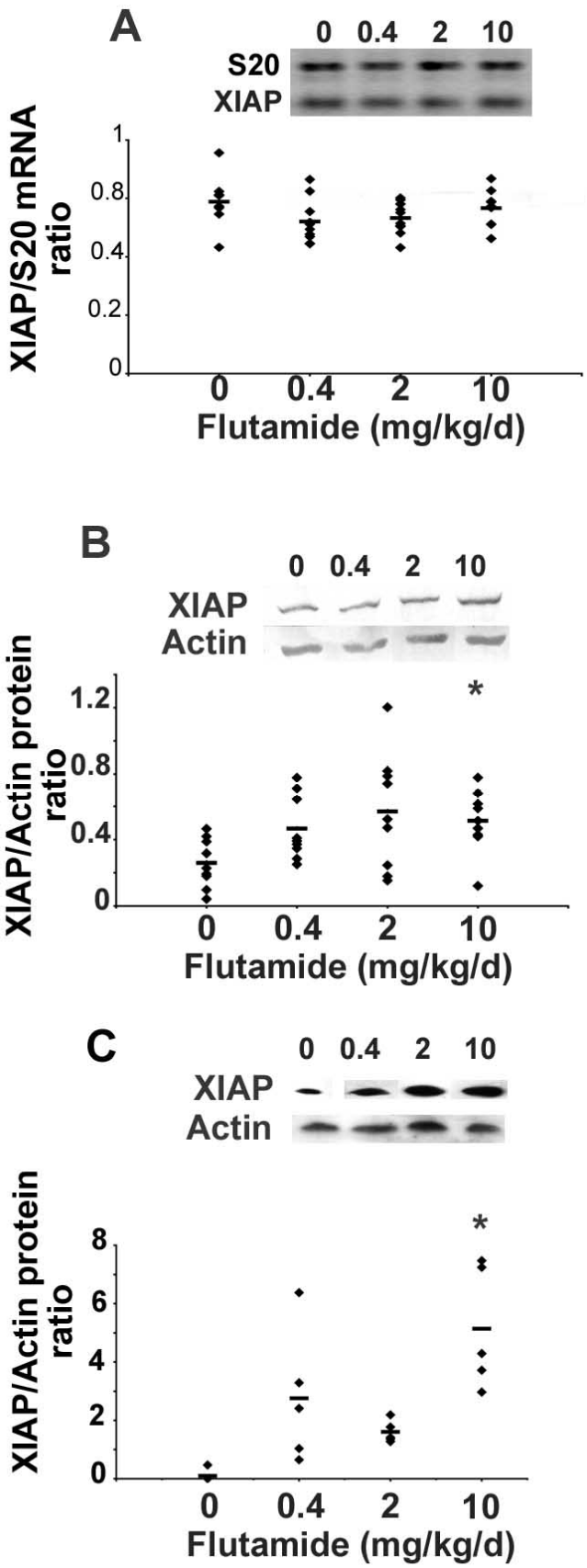
Bozec et al. Fig. 2



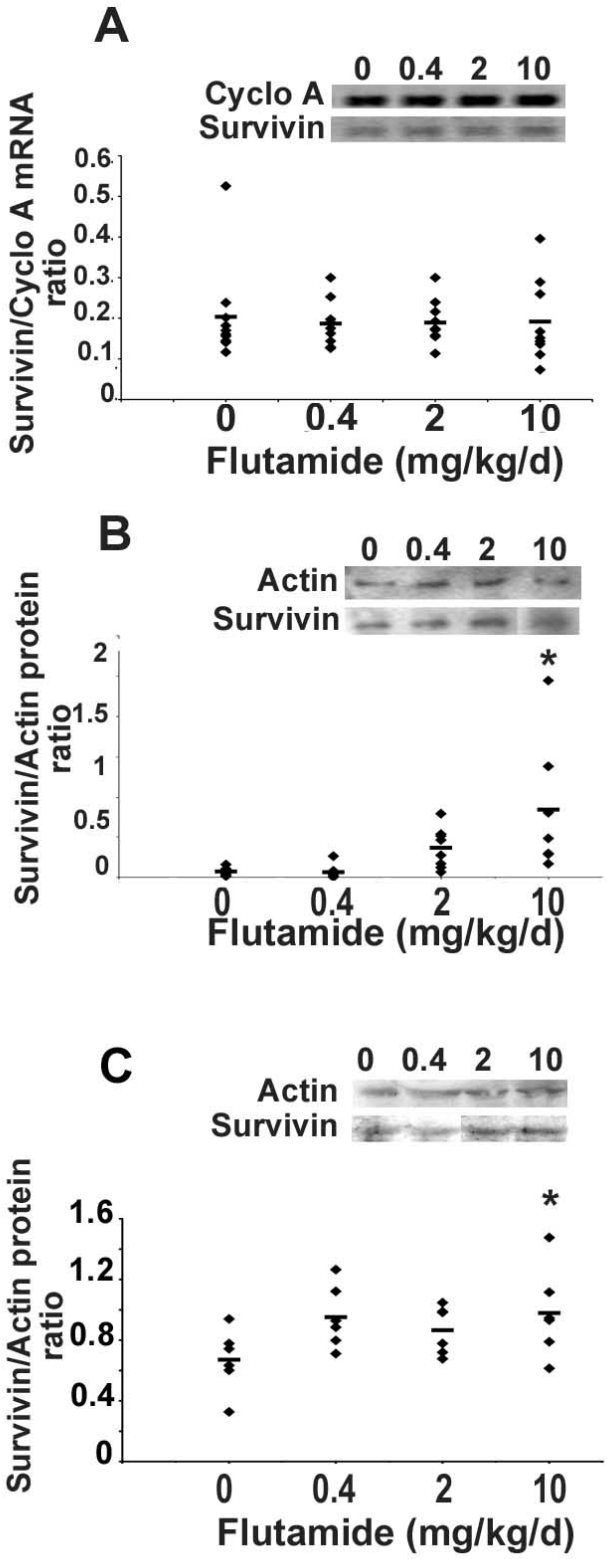
Bozec et al. Fig. 3



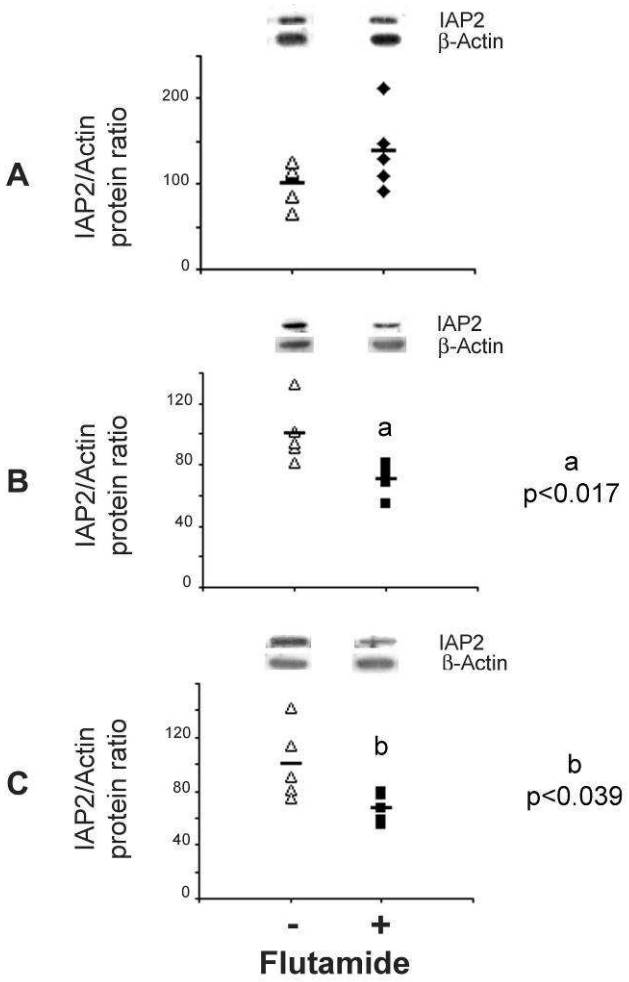
Bozec et al. Fig. 4



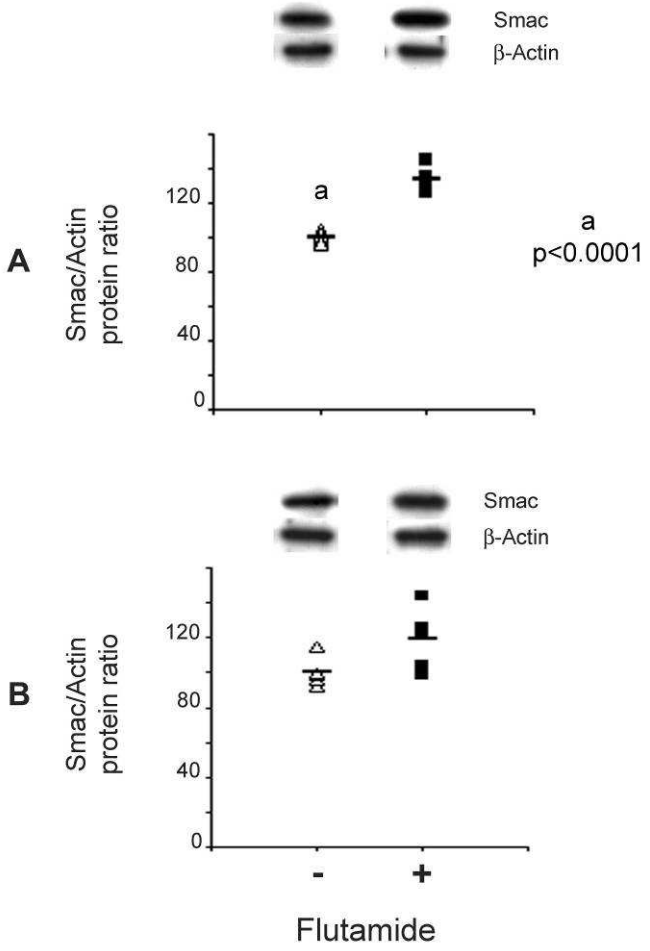
Bozec et al. Fig. 5



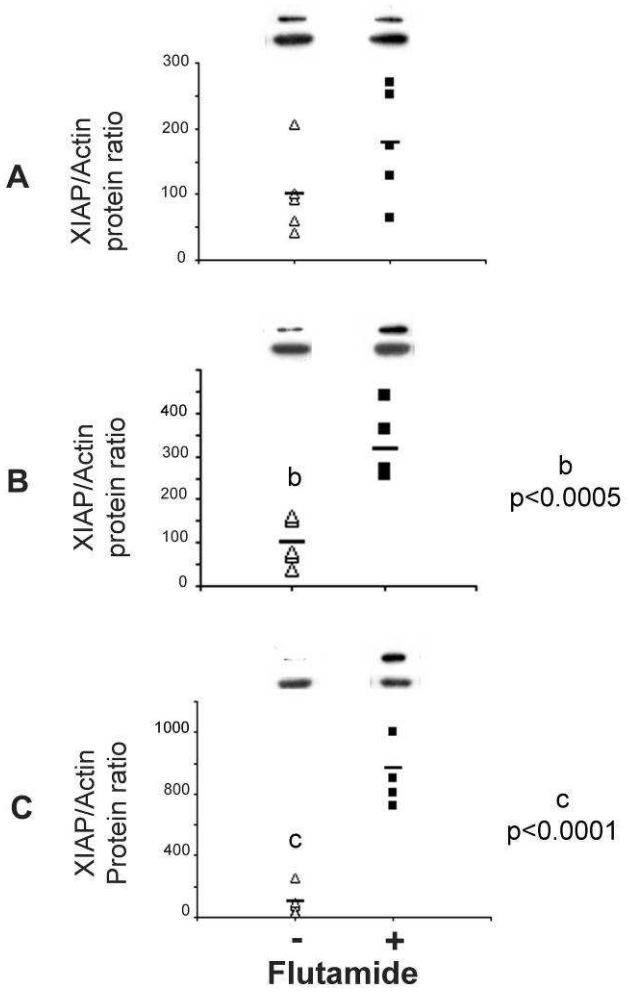
Bozec et al. Fig. 6



Bozec et al. Fig. 7



Bozec et al. Fig. 8



Bozec et al. Fig. 9

4 - Données supplémentaires : Altérations de l'expression des ADN méthyltransférases (DNMTs) au niveau du testicule de rat après exposition foetale au flutamide

---

L'exposition fœtale au flutamide induit une programmation d'un phénotype d'apoptose germinale chronique dans le testicule adulte. Des données de la littérature suggèrent que l'exposition fœtale aux PEs de types antiandrogéniques (ex. vinclozoline) affecterait l'expression de gènes testiculaires via des altérations des profils de méthylation de l'ADN. D'autre part, les ADN méthyltransférases ont été impliquées dans la maturation des cellules germinales au cours du processus physiologique de la spermatogenèse. Dans ce cadre, nous avons cherché à mettre en évidence si le phénotype observé à l'âge adulte pourrait impliquer une altération de la machinerie de méthylation de l'ADN.

Des rattes gestantes ont été gavées avec le véhicule (méthylcellulose) ou le flutamide (0 ; 0,4 ; 2 et 10 mg/kg*jour) du 10ème au 21ème jour de gestation. Après la naissance, les rats mâles ne sont plus traités jusqu'au sacrifice à 14 jpn (prépubère) ou 90 jpn (adulte).

L'exposition fœtale au flutamide affecte les taux de protéines et des transcrits de DNMTs dans le testicule prépubère

L'exposition in utero au flutamide provoque une altération de l'expression protéique des trois DNMTs dans le testicule prépubère (14 jpn). Ainsi, nous observons une diminution de l'expression de DNMT3A (30%, p=0,0104)(Fig. 62A), de DNMT1 (50%, p=0,0376)(Fig. 64A) et dans une proportion plus faible de DNMT3B (16%, p=0,042) (Fig. 63A).

Dans le but d'identifier si les altérations des taux de protéines DNMTs pouvaient provenir d'une altération de la transcription nous avons mesuré les taux de transcrits des trois DNMTs par la technique de RT-QPCR. L'exposition in utero au flutamide provoque dans le testicule prépubère une diminution significative des taux de transcrits de Dnmt3B (facteur de diminution 1,7; p=0,005)(Fig. 63B) et Dnmt1 (facteur de diminution 1,9; p=0,0017)(Fig. 64B). En revanche nous n'avons pas mis en évidence d'altération significative au niveau des taux de transcrit Dnmt3A (Fig. 62B).

L'exposition fœtale au flutamide affecte les taux de protéines de DNMTs dans le testicule adulte mature

Afin d'identifier si les altérations d'expression DNMTs identifiées au niveau du testicule immature étaient maintenues à long terme, nous avons mesuré les taux des protéines DNMT3A, 3B et 1 au niveau du testicule adulte d'animaux exposés in utero au flutamide. Ainsi, nous avons détecté une diminution significative de l'expression de DNMT3A (80%, $p<0,001$) (Fig. 62C) et DNMT1 (70%, $p=0,002$)(Fig. 64C) chez les animaux exposés au flutamide à la dose de 10 mg/kg*jour. En revanche, aucune modification n'est observée pour DNMT3B dans le testicule adulte (Fig. 63C).

En somme, ces données indiquent que : (1) une diminution d'expression des DNMT3A et 1 est associée au phénotype d'apoptose chronique au niveau du testicule adulte, (2) cette altération est un évènement précoce déjà présent au niveau du testicule immature et que, (3) cette diminution ferait intervenir un mécanisme de régulation transcriptionnelle dans le cas de Dnmt3B et Dnmt1.

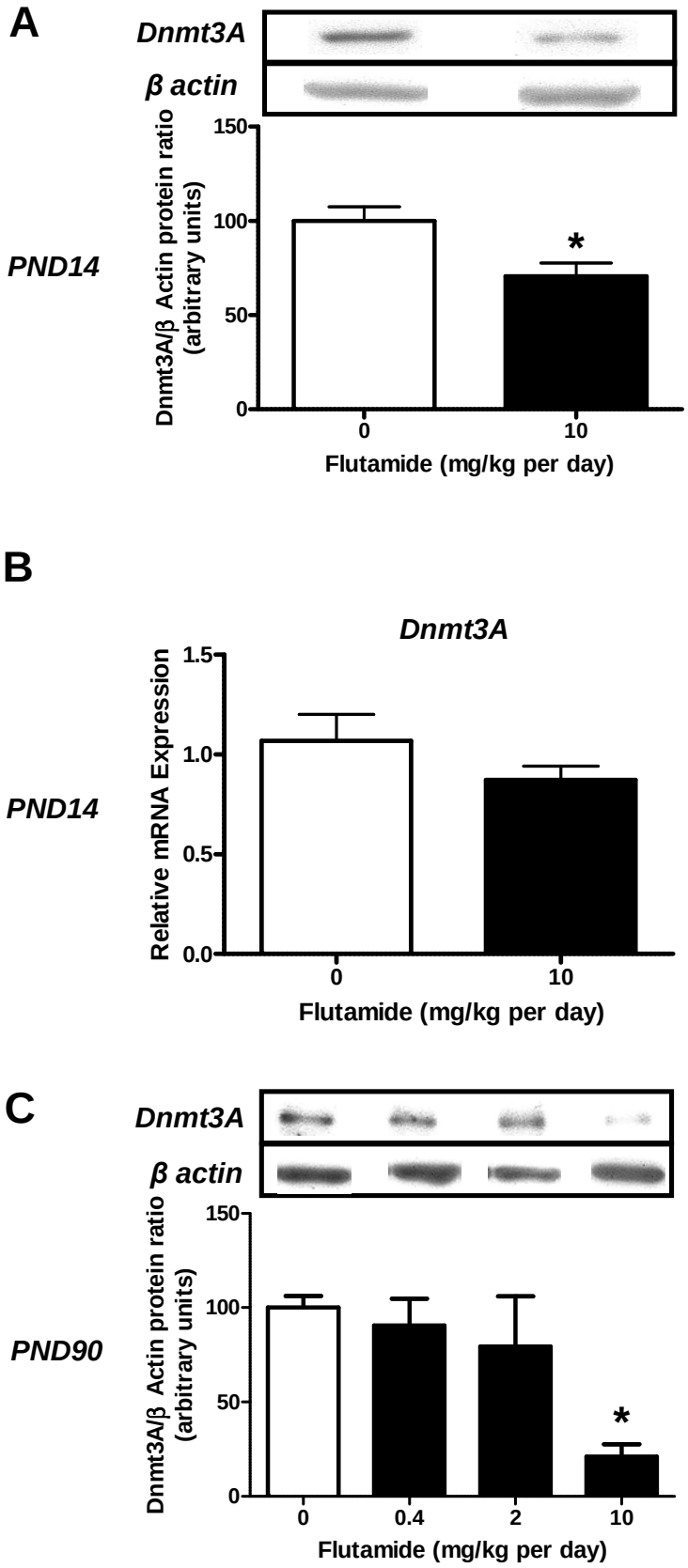


Figure 61. Effet de l'exposition in utero au flutamide sur le taux d'ARNm et de protéine DNMT3A
(A et B) *Taux de protéine et d'ARNm DNMT3A au niveau du testicule immature de 14 jpn,* ***(C)*** *taux de protéine DNMT3A au niveau du testicule adulte. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM à partir de 7 animaux (*, p<0,05).*

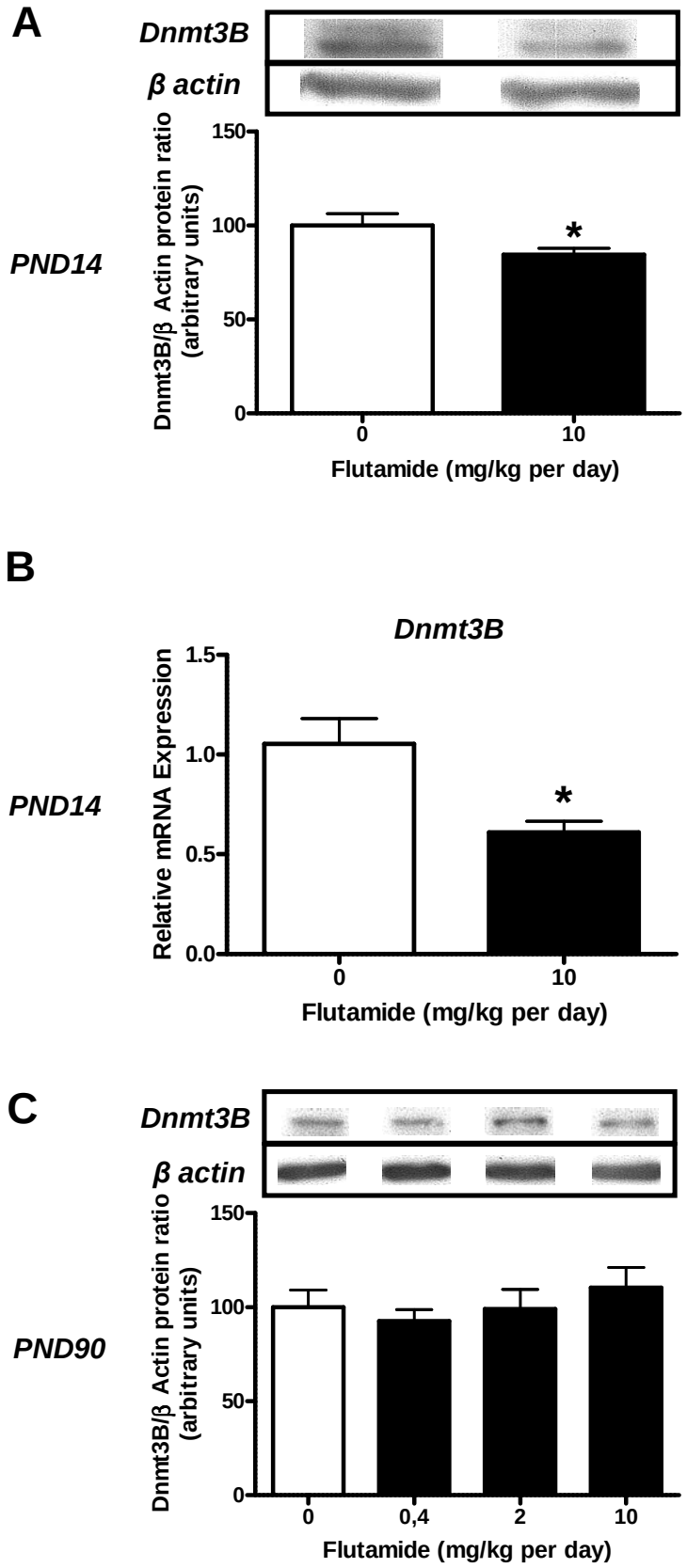


Figure 62. Effet de l'exposition in utero au flutamide sur le taux d'ARNm et de protéine DNMT3B
(A et B) *Taux de protéine et d'ARNm DNMT3B au niveau du testicule immature de 14 jpn,* ***(C)*** *taux de protéine DNMT3B au niveau du testicule adulte. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM à partir de 7 animaux (*, p<0,05).*

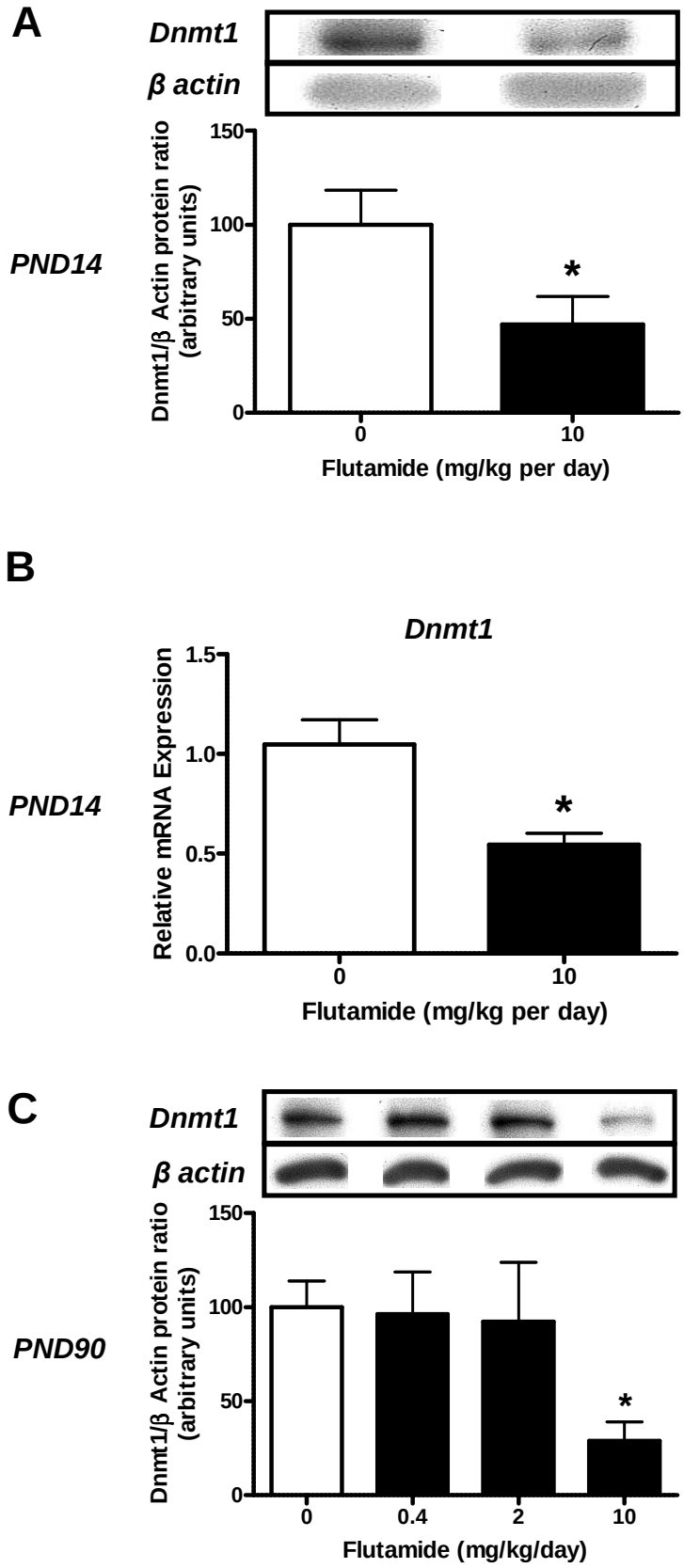


Figure 63. Effet de l'exposition in utero au flutamide sur le taux d'ARNm et de protéine DNMT1
(A et B) *Taux de protéine et d'ARNm DNMT1 au niveau du testicule immature de 14 jpn,* ***(C)*** *taux de protéine DNMT1 au niveau du testicule adulte. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM à partir de 7 animaux (*, p<0,05).*

Discussion

VI - Discussion

Dans ce travail de thèse nous avons : (1) établi un modèle expérimental d'exposition néonatale à un analogue d'estrogènes (estradiol benzoate, EB) capable d'induire des altérations du tractus génital mâle et un phénotype d'hypospermatogenèse caractérisé par une apoptose des cellules germinales testiculaires, (2) approfondi le décryptage du processus apoptotique mis en jeu après une exposition fœtale à un antiandrogène (flutamide, FLU), (3) identifié une implication de certains effecteurs épigénétiques dans les altérations testiculaires induites après exposition durant les périodes critiques du développement aux perturbateurs endocriniens.

Effet de l'exposition néonatale aux estrogènes/fœtale au flutamide sur le tractus génital mâle à l'âge adulte

Afin d'identifier l'effet à long terme sur le tractus génital mâle d'une exposition développementale à des molécules ayant une activité estrogénique, nous avons développé un modèle d'exposition néonatale à l'estradiol benzoate (EB). L'EB est un estrogène pur qui en tant que tel, sert de composé modèle pour les PE ayant une activité estrogénique. Le modèle utilisé reposait sur l'exposition de rats de 1 à 5 jpn à l'EB, ce qui correspond chez l'homme à la période développementale entre le second et le troisième trimestre de grossesse (Marty et al. 2003). Nous avons testé deux gammes de doses afin de pouvoir identifier un phénotype macroscopique, histologique et moléculaire au niveau du tractus génital mâle. Ainsi, l'exposition aux fortes doses d'EB (12,5 et 25 µg/jour soit environ 1250 et 2500 µg/kg*jour) perturbe le développement et altère à long terme le testicule, les différents lobes prostatiques et les vésicules séminales puisque le poids de ces organes est fortement diminué chez les animaux adultes. L'ensemble de ces observations sont en accord avec la littérature puisque 2000 µg/kg*jour d'EB diminuent le poids du testicule et de l'épididyme (Nagao et al. 1999) ou 1500 et 15000 µg/kg*jour diminuent le poids des différents lobes prostatiques (Putz, Schwartz, Kim, et al. 2001). Dans notre EXP2 avec de plus faibles doses d'EB, nous n'identifions pas de modifications du poids des organes même à la dose de 2,5 µg/j, excepté pour les vésicules séminales dont le poids est altéré dès la dose de 1,25 µg/j. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Putz qui ont montré une absence

d'effet de l'EB sur le poids prostatique à des doses inférieures ou égales à 150 µg/kg*jour (1,5 µg/j). A la dose de 2,5 µg/j (250 µg/kg*jour), nous obtenons une diminution significative du poids des différents organes dans l'EXP1, alors que dans l'EXP2, nous n'observons de diminution significative que pour les vésicules séminales. Il faut noter que la diminution de poids des vésicules séminales est semblable (30%) dans les deux expérimentations. La dose de 2,5 µg/j pourrait représenter une dose charnière au delà de laquelle les composantes cellulaires du testicule et de la prostate sont considérablement affectées. En effet, Putz et al. n'observent plus d'effet sur le poids des organes à la dose de 1,5 µg/j (Putz, Schwartz, LeBlanc, et al. 2001), (Putz, Schwartz, Kim, et al. 2001). Les fortes doses d'EB, et plus généralement des PEs environnementaux, sont pertinentes pour identifier un phénotype clair mais provoquent des pertes cellulaires massives qui engendrent des modifications importantes dans les proportions relatives entre les différents types cellulaires. Ceci est particulièrement vrai dans le testicule (support de notre étude mécanistique), où la perte massive principalement des cellules germinales peut provoquer des interprétations fausses car résultant d'une perte cellulaire et non d'une régulation génique. Dans ce contexte, nous avons réalisé l'EXP2 dans laquelle nous avons utilisé des doses plus faibles (0,75-2,5 µg/j) ne modifiant pas le poids de l'organe.

Concernant les antiandrogènes, l'exposition fœtale au FLU provoque chez l'animal une diminution du poids des organes hormonodépendants comme le testicule, les prostates et vésicules séminales à partir de la dose de 12,5 mg/kg*jour (McIntyre et al. 2001). Les doses que nous avons utilisées dans cette étude ne provoquent pas de perte des cellules germinales (Benbrahim-Tallaa et al. 2008, Omezzine et al. 2003).

En somme, même si les fenêtres d'exposition et les composés utilisés sont différents, le phénotype général obtenu au niveau du tractus génital mâle est assez similaire après exposition néonatale à l'EB ou in utero au FLU.

Ceci peut en partie être éclairé par les travaux récents de McLeod et al. qui ont démontré : (1) que la taille des organes reproducteurs mâles est programmée par l'action des androgènes durant la période de masculinisation (entre 15,5-18,5 jpc), (2) mais également que la croissance normale de ces organes est fortement influencée par l'action des androgènes en postnatal (Macleod et al. 2009). Ainsi, l'exposition fœtale au flutamide

empêchant l'action des androgènes altèrerait la programmation de la taille des organes, tandis que l'exposition néonatale à l'estradiol benzoate qui perturbe la balance androgènes/estrogènes affecterait plutôt la croissance de ces tissus durant la vie postnatale.

Hypospermatogenèse après exposition néonatale à l'estradiol benzoate ou in utero au flutamide

Lorsque l'on se focalise sur le testicule, comme attendu la forte diminution du poids testiculaire à 12,5 et 25 µg/jour résulte d'une hypospermatogenèse avec perte massive des cellules germinales, comme nous le montrons ici ou comme le montrent d'autres équipes pour des doses supérieures à 10 µg/jour (Atanassova et al. 1999, Nagao et al. 1999, (Putz, Schwartz, LeBlanc, et al. 2001), Walczak-Jedrzejowska et al. 2007). Les doses 0,75-2,5 µg/j ne modifient pas la morphologie testiculaire (EXP2) ou provoquent de discrètes altérations des tubules séminifères (dose 2,5 µg/j de l'EXP1). En revanche, nous montrons que la perte des cellules germinales observée à 12,5 et 25 µg/j proviendrait d'une apoptose de cellules germinales (TUNEL), liée à une augmentation du taux de caspase-3 effectrice (caspase 3 activée) et se traduisant par l'augmentation de 50% de cellules germinales en apoptose dont l'ADN nucléaire est fragmenté, mais également par la diminution du facteur antiapoptotique MCL-1 appartenant à la famille Bcl2. A notre connaissance, notre travail est un des premiers à relier les altérations de la spermatogenèse après exposition néonatale à un composé estrogénique, avec une activation chronique de l'apoptose au sein des cellules germinales via un déséquilibre de la balance facteurs proapoptotique (caspase-3 activée)/antiapoptotique (MCL-1).

Pour ce qui est de l'exposition *in utero* au flutamide, les données publiées par notre laboratoire depuis quelques années permettent une description plus détaillée du phénotype d'hypospermatogenèse. Il a notamment été démontré que l'apoptose des cellules germinales est due à l'altération de l'étape effectrice avec l'activation des caspases-3 et -6 (Omezzine et al. 2003). En amont des caspases, il semble que ce sont les facteurs mitochondriaux contrôlant l'apoptose qui sont altérés. Une diminution de facteurs antiapoptotiques (BCL2, BCLW) et une augmentation du facteur proapoptotique BAX sont observées après exposition au FLU durant la vie fœtale (Bozec et al. 2004). Dans ce contexte, une partie de notre travail de thèse a consisté à décrypter d'avantage les mécanismes d'apoptose à travers l'étude des facteurs régulant l'étape effectrice : les IAPs inhibiteurs de

caspases (cIAP1, cIAP2, XIAP et SURVIVIN) et leur propre inhibiteur SMAC/DIABLO. Au niveau testiculaire cIAP1 et cIAP2 sont détectés dans les cellules germinales, XIAP est localisé au niveau des cellules somatiques (Sertoli et Leydig), la SURVIVIN exclusivement dans les cellules de Leydig et l'inhibiteur des IAPs SMAC/DIABLO principalement dans les spermatocytes pachytènes. Nos résultats sont en accord avec les données d'Omezzine et al. (2003) suggérant une altération des facteurs de la phase effectrice de l'apoptose. Ainsi, après exposition au FLU il a été mis en évidence la diminution des protéines cIAP1, cIAP2 et SMAC/DIABLO en faveur d'une apoptose des cellules germinales, tandis que l'augmentation de XIAP et SURVIVINE confirme la résistance à l'apoptose des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig. En somme l'apoptose des cellules germinales à l'âge adulte est due à deux types d'évènements, (1) l'augmentation du taux de caspases effectrices au niveau des cellules germinales n'est pas compensée par l'action des IAPs qui sont inhibés et, (2) les taux de protéines IAPs restant sont eux-mêmes inhibés par l'augmentation de SMAC/DIABLO. Ces mécanismes semblent précoces puisque les modifications de cIAP2, XIAP et survivine sont détectées au niveau de testicules immatures de 14 jpn. Même si les composés utilisés et les fenêtres d'exposition sont différentes, il est fort probable que les mécanismes de dérégulation de la phase effectrice de l'apoptose mis en jeu dans le modèle d'exposition à l'estradiol benzoate soient comparables voire identiques.

En conclusion, l'exposition néonatale à l'estradiol benzoate ou in utero au flutamide induisent une programmation développementale du phénotype d'apoptose chronique (hypospermatogenèse) observé au niveau du testicule adulte (figure 64).

D'après les données de la littérature et les travaux publiés par notre équipe, il semble que les mécanismes impliqués après exposition néonatale aux estrogènes ou fœtale aux antiandrogènes soient sensiblement différents. Ainsi, dans le cas d'une exposition néonatale, les estrogènes pourraient agir de trois manières : (1) au niveau des cellules germinales (les spermatogonies) via le récepteur aux estrogènes ERβ qui a un effet antiprolifératif et proapoptotique sur la maturation des cellules germinales (Delbès et al. 2006), (2) sur les cellules de Leydig en régulant négativement la synthèse de testostérone (Delbès et al. 2006), (3) éventuellement en contrôlant la prolifération des cellules de Sertoli via ERβ (Delbès et al. 2004). Compte-tenu de l'apoptose qui est observée à l'âge adulte, l'action des estrogènes

néonataux pourraient programmer donc le devenir et la fonction des cellules germinales mais également des cellules somatiques du testicule. Une première explication serait que l'effet de l'EB perturberait la différenciation des spermatogonies souches comme suggéré dans le travail de Kula et al. (2001) qui se traduirait par une apoptose de cellules germinales (Kula et al. 2001). Une autre explication peut provenir des données générées sur les gènes marqueurs des cellules de Leydig (diminution de *Cyp1B1*) et impliqués dans la stéroidéogenèse (diminution de *Star*) sur le testicule adulte. Ainsi, la diminution d'expression de *Star* pourrait potentiellement avoir un impact sur la production d'androgènes chez les animaux matures exposés à l'EB, comme cela a été rapporté dans une étude menée chez la souris dans notre laboratoire (Volle et al. 2009). Compte-tenu de l'importance des androgènes dans la régulation du processus apoptotique au cours de la spermatogenèse, une altération des taux de testostérone pourrait expliquer l'apoptose des cellules germinales à l'âge adulte. Les données de la littérature ne sont pas très claires sur l'impact de l'exposition néonatale aux estrogènes sur les taux de testostérone à l'âge adulte chez le rat. Dans l'étude de Putz et al. (2001) la seule dose d'EB qui induit à l'âge adulte une diminution significative de testostérone (15 000 µg/kg*jour) est très largement au dessus des doses que nous avons utilisées, et certaines études utilisant des protocoles d'exposition néonatale différents à des composés analogues des estrogènes ont identifié une diminution du taux de testostérone plasmatique chez les animaux matures (Atanassova et al. 1999, Tena-Sempere et al. 2000). Ces seules données ne permettent pas de conclure, car pour corréler l'apoptose des cellules germinales à une éventuelle diminution du taux de testostérone, il conviendrait aussi de mesurer les taux de testostérone intratesticulaire chez nos animaux exposés durant la vie néonatale à l'EB. En outre, l'absence de modification d'expression de gènes Sertolien (*Tubuline beta 3, AmhR2, Scf, Shbg, Gstα2, Rhox5* et *Gpd1*) suggèrent qu'aux faibles doses d'EB que nous avons utilisées, la fonction des cellules de Sertoli adultes aux androgènes ne soit pas affectée de manière drastique. Il est fort probable qu'aux doses plus élevées (supérieures à 2,5 µg/jour) le nombre et la fonction des cellules de Sertoli soit affecté comme indiqué dans un travail où les animaux ont été exposés à 12,5 µg/jour d'EB entre 5-15 jpn (Walczak-Jedrzejowska et al. 2007).

Dans le cas de l'exposition in utero au flutamide les mécanismes impliqués sont un peu mieux compris. Au cours de la période foetale, les cellules exprimant le récepteur AR sont les cellules de Leydig et les cellules péritubulaires myoïdes (You & Sar 1998). De plus, il n'est pas

très bien défini si les gonocytes expriment le AR étant donné que seul un groupe à mis en évidence son expression dans ces cellules (Merlet et al. 2007). Ainsi, l'action à long terme du FLU sur l'apoptose des cellules germinales, impliquerait probablement les cellules péritubulaires myoïdes ou les cellules de Leydig comme cible primaire. A l'âge adulte, les cellules germinales qui entrent en apoptose sont majoritairement détectées au niveau des tubes séminifères aux stades androgénodépendants VII-VIII (Bozec et al. 2004), ce qui impliquerait une perturbation du signal androgénique. Chez les animaux adultes exposés au flutamide *in utero* ni le taux de testostérone (plasmatique et intratesticulaire), ni les taux d'estradiol, de FSH et LH, ni le taux de AR, ni le nombre de cellules de Sertoli (cibles des androgènes dans le testicule adulte) ne sont altérés (Kassim et al. 1997, Benbrahim-Tallaa et al. 2008). En revanche, il a été mis en évidence au sein du laboratoire que ce sont la fonction des cellules de Sertoli (ex. altération d'expression de AMHR2, Cox-I, Cyclin D2, Cathepsin L, GSTα), de même que la signalisation en aval du récepteur des androgènes (ex. cofacteurs de l'AR comme P-C-JUN et SMAD3) qui sont touchés (Maire et al. 2005, Benbrahim-Tallaa et al. 2008).

Implication de l'altération des ADN méthyltransférases (DNMTs) dans la l'apoptose chronique à l'âge adulte

Un certain nombre d'études ont impliqué la méthylation de l'ADN dans l'effet des perturbateurs endocriniens sur l'appareil reproducteur mâle ou femelle (Li et al. 1997, Anway et al. 2005). De plus, les travaux du groupe de Trasler ont démontré l'implication de DNMT3A, 3B et 1 tout au long de la maturation de cellules germinales au cours du processus de spermatogenèse (La Salle et al. 2004, La Salle & Trasler 2006). Dans ce contexte, est-ce qu'une altération des DNMTs pouvait être mise en jeu dans le phénotype d'hypospermatogenèse adulte après exposition néonatale à l'EB ou après une exposition fœtale au FLU ?

Nos résultats indiquent que l'exposition postnatale à l'EB induit une altération à long terme (uniquement chez l'adulte) des trois DNMTs principales mais sans modifications de leur transcrits exclusivement chez l'adulte. Dans le testicule adulte, pour DNMT3A et 3B la chute du taux de protéine était observée dès la plus faible doses testée (0,75 µg/jour) avec une diminution supérieure à 50% et pour DNMT1 une diminution de 60% (1,25 µg/jour).

Dans le contexte du modèle d'exposition in utero à l'antiandrogène flutamide, nos résultats indiquent également que la diminution d'expression des protéines DNMTs (3A et 1) pourrait être impliquée dans l'apoptose chronique qui est observée à l'âge adulte. Cependant, à la différence du modèle d'exposition à l'EB, il semble que l'altération des DNMTs par le flutamide soit un évènement précoce car la diminution est déjà observée sur le testicule immature de 14 jpn.

L'implication d'une diminution de l'expression des DNMTs dans l'hypospermatogenèse induite par une exposition fœtale ou néonatale aux PEs est étayée par plusieurs arguments forts : (1) les souris invalidées pour les gènes *Dnmt3A* ou *Dnmt3L* présentent un phénotype d'altération de la spermatogenèse qui se traduit par une diminution du poids testiculaire et une azoospermie (Bourc'his et al. 2001, Yaman & Grandjean 2006, Kaneda et al. 2004), (2) les rats ou souris exposés à l'âge adulte aux inhibiteurs de DNMTs (5'-azacytidine, 5-aza-2'-deoxycytidine) présentent une diminution de la fertilité caractérisée par une réduction du poids du testicule et l'augmentation d'apoptose des cellules germinales (Doerksen et al. 2000, Kelly et al. 2003), (3) l'invalidation de *Dnmt3A/3B* au niveau de cellules souches germinales fait que ces cellules ne sont plus capables de réinitier une spermatogenèse normale (diminution du nombre de spermatides et de spermatozoïdes) lorsqu'elles sont transplantées dans un testicule receveur (Takashima et al. 2009), (4) l'invalidation transitoire de *Dnmt1* dans les cellules souches germinales induit une apoptose massive de ces cellules (Takashima et al. 2009).

Cette diminution de l'expression des DNMTs semble avoir des répercussions fonctionnelles, puisque nous avons détecté l'augmentation d'expression de séquences (*Ibtk*, *LINE-1*) qui sont normalement contrôlées par le processus de méthylation de l'ADN (Oakes et al. 2007a, 2007b ; Liang et al. 2002). Certes, l'approche de quantification des transcrits que nous avons utilisé est indirecte et devrait être complétée par la mesure des taux de méthylation via des techniques de séquençage bisulfite ou de QPCR HRM (High Resolution Melting).

Bien que les travaux pour identifier précisément le mécanisme d'apoptose ou d'hypospermatogenèse après la chute d'expression de DNMTs doivent être encore approfondis, une des pistes serait que l'altération d'expression des éléments transposables (ex. *LINE-1*) entraine une instabilité génomique qui induirait l'apoptose des cellules germinales (Kazazian & Goodier 2002). Dans ce contexte, une étude récente a démontré que chez des animaux déficients pour le gène *Mael*, les éléments *LINE-1* ne sont plus réprimés

par méthylation de l'ADN, ce qui induit une augmentation de leur taux de transcrits associée avec des altérations de la spermatogenèse (Soper et al. 2008). Enfin, après exposition fœtale au flutamide Omezzine et al. (2003) ont démontré l'augmentation des taux de transcrit caspase 3 (Omezzine et al. 2003). Une étude récente a suggéré l'implication de la méthylation dans la régulation du gène caspase 3 (Yakovlev et al. 2010). Il serait donc intéressant d'identifier si dans ce modèle le promoteur de la caspase 3 est hypométhylé.

En résumé, nos résultats indiquent que l'hypospermatogenèse (apoptose chronique des cellules germinales) observée au niveau testiculaire après exposition pourrait mettre en jeu une diminution d'expression des effecteurs épigénétiques clés les DNMTs, ce qui pourrait avoir des répercussions sur la stabilité du génome et l'expression de gènes important au cours du processus de spermatogenèse.

Exposition aux perturbateurs endocriniens et altération des DNMTs

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que l'exposition développementale à des composés perturbateurs endocriniens induit des altérations (diminution) des effecteurs épigénétiques clés, les DNMTs, qui pourraient être impliquées dans le phénotype d'apoptose mis en évidence à long terme.

Dans leurs études Anway et al. (2005, 2008) ont montré un effet comparable de l'exposition à la vinclozoline (composé antiandrogénique) pendant la période fœtale. Ainsi, la vinclozoline entraine une diminution de l'expression de *Dnmt3A*, *Dnmt1* et *Dnmt3L* dans le testicule fœtal (16 jpc) de rat (à la génération F1 mais également F2 et F3), qui se traduirait à l'âge adulte par une modification des profils de méthylation au niveau du sperme ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose des cellules germinales testiculaires (Anway et al. 2005, 2008). Plus récemment, Cowin et al. (2010) en utilisant le même type de protocole d'exposition à la vinclozoline ont démontré que dans le testicule adulte le taux d'ARNm et de protéines DNMT1 et 3L étaient toujours diminués au niveau du testicule mature (Cowin et al. 2010). Cependant, à la différence de ce qui a été observé pour le testicule embryonnaire par Anway et al., il était détecté au sein du testicule adulte une stimulation de l'expression de DNMT3B mais pas de variation de DNMT3A en comparaison (Cowin et al. 2010).

Les variations d'expression des DNMTs dans le testicule immature et adulte que nous observons après exposition au FLU (possédant une action antiandrogénique comme la

vinclozoline) sont comparables aux variations observées par Anway et al. sur le testicule de 16 jpc (Anway et al. 2008a) : l'expression des DNMTs (3A, 3B, 1) est diminuée de façon précoce et passerait notamment par un mécanisme de régulation transcriptionnelle du moins pour *Dnmt3B* et *1*. A la différence des données obtenues par Cowin et al. (2010) sur le testicule mature, nos données montrent que l'altération de DNMT3A observée à 14 jpn est maintenue et que le taux de DNMT3B ne semble plus modifié dans le testicule adulte après exposition au FLU.

L'altération d'expression des DNMTs (diminution) mise en évidence dans notre travail au niveau testiculaire après exposition néonatale à EB souligne, de nouveau, le rôle majeur d'une dérégulation de ces enzymes et de la méthylation de l'ADN après exposition aux PEs. En outre, des modifications comparables de l'expression des DNMTs et de la méthylation de l'ADN sont associées aux phénotypes de pathologies adultes observés au niveau de l'utérus, de l'ovaire, l'épididyme ou encore la prostate après exposition développementale aux estrogènes (tableau 9) (Ho et al. 2006, Li et al. 1997, Zama & Uzumcu 2009). Cependant, dans notre travail à la différence de ce qui est observé sur l'utérus ou encore l'ovaire après exposition aux PEs estrogéniques, nous ne mettons pas en évidence d'altération transcriptionnelle des gènes DNMTs ni juste après l'arrêt du traitement ni sur l'organe adulte. Ceci suggère dans notre cas l'intervention d'un autre mécanisme de régulation à long terme de l'expression des DNMTs sur lequel nous reviendrons plus loin.

Au regard de nos données et de la littérature (tableau 9), trois paramètres semblent essentiels dans les altérations d'expression des DNMTs et de la méthylation globale de l'ADN après exposition aux PEs : (1) le type de composé perturbateur endocrinien utilisé (estrogénique, antiandrogénique), (2) la fenêtre d'exposition (néonatale, fœtale), et le type d'organe qui est analysé (testicule, prostate, ovaires, utérus).

Finalement, nos données sont les premières à indiquer l'implication d'une modification d'expression des DNMTs dans l'hypospermatogenèse induite par un composé à activité estrogénique (figure 64).

Une question demeure pour l'instant sans réponse : comment expliquer que dans la plupart des études, les auteurs observent une altération des DNMTs dans un sens (diminution ou augmentation) mais que le profil de méthylation global et ciblé indique que des gènes se

retrouvent hyperméthylés et d'autres hypométhylés (tableau 9)? Dans ce contexte, il serait donc intéressant d'identifier les altérations des régulateurs et des cofacteurs de méthylation de l'ADN (ex. DNMT3L, MBD2, CTCF, ZFP54) après exposition aux perturbateurs endocriniens. En effet, ces régulateurs peuvent cibler ou exclure les DNMTs de manière spécifique au niveau de certaines régions du génome ou gènes, ce qui pourrait expliquer l'association d'hypo- et hyperméthylations qui sont observées.

Molécule	*Dose, Exposition*	*Espèce, tissu(s) analysés*	*Altération des DNMTs, âge*	*Altération de la méthylation de l'ADN, âge*	*Références bibliographiques*
FLU (Antiandrogénique)	**0,4-10 mg/kg par jour (10-21 jpc)**	**Rat, testis**	**↘ DNMT3A, 3B, 1 (mRNA et protéines, J14), ↘ DNMT3A, 1 (protéines, J90)**	**n. d.**	**Notre travail**
EB (Estrogénique)	**0,75-2,5 µg/j (1-5 jpn)**	**Rat, testis**	**↘ DNMT3A, 3B, 1 (protéines, 90 jpn uniquement)**	**n. d.**	**Notre travail**
DES (Estrogénique)	10 µg/kg par jour, In utero (9-16 Jpc)	Souris, utérus	↗ *Dnmt1, 3B* (J14)	↗ méthylation promoteur et intron *HoxA10* (J14)	(Bromer et al. 2009)
DES (Estrogénique)	2 µg/jour, Néonatal (J1-J5)	Souris, utérus	n. d.	↘ méthylation promoteur lactoférrine (J21, J30 et J180)	(Li et al. 1997) (Li et al. 2003)
DES (Estrogénique)	3 µg/jour, Néonatal (J1-J5)	Souris, utérus	↘ *Dnmt1* (J5 et J14), *3A* (J14) et *3B* (J5)	Loci hypo et hyperméthylés (J30)	(Sato et al. 2009)
DES ou Génistéine (Estrogéniques)	DES : 0,01-1000 µg/kg par jour ou Génistéine 50 mg/kg par jour, Néonatal (J1-J5)	Souris, utérus	n. d.	Nsbp1 hypométhylé (J180 et J540), autres loci hyperméthylés (ex. *Gadd45g, Rad9b, Vps29) et* hypométhylés (ex. *Pip5k2a, Ptprr, Acox1)*	(Tang et al. 2008)
DES (Estrogénique)	3 µg/jour, Néonatal (J1-J5)	Souris, épididyme	↗ *Dnmt1* (J30), *3A* (J30), *3B* (J5, J14)	Loci hypo et hyperméthylés (J30)	(Sato et al. 2006)
Vinclozoline (Antiandrogénique)	100 et 200 mg/kg par jour, In utero (8-15 Jpc)	Rat, testis et sperme	↘ *Dnmt1, 3A et L* (16 Jpc)	Loci hypo et hyperméthylés : testis (J6) et sperme (J60)	(Anway et al. 2005, 2008)

Tableau 9. Exposition aux perturbateurs endocriniens et leur impact sur l'expression des DNMTs ou sur la méthylation de l'ADN

(Jpc : jours post-coïtum, J : jours postnatals, n. d. : non déterminé)

Molécule	***Dose, Exposition***	***Espèce, tissu(s) analysés***	***Altération des DNMTs, âge***	***Altération de la méthylation de l'ADN***	***Références bibliographiques***
Vinclozoline (Antiandrogénique)	100 mg/kg par jour, In utero (14-19 jpc)	Rat, testis et prostate	Testis (J56) : ↘ DNMT1, DNMT3L et ↗ DNMT3B Prostate (J56) : ↗ DNMT3B et DNMT3A	n. d.	(Cowin et al. 2010)
Vinclozoline (Antiandrogénique)	?, foetale	Souris, sperme	n. d.	Hypométhylation : *H19* et *Gtl2* Hperméthylation : *Peg1*, *Peg3* et *Snrpn*	(Stouder et al. 2010)
Méthoxychlore (Estrogénique, Antiandrogénique)	20 µg/kg et 100 mg/kg par jour, In utero + néonatal (19 Jpc à J7)	Rat, ovaire	↗ *Dnmt3B et* ↘ *Dnmt3L (20 µg/kg par jour)* (J50-J60)	Hyperméthylation : *ERβ*, *Plxdc2*, *Zfp212*, *Rpl29*, *PAPP-A*, *Pou4f2*, *FoxP4*, *DBh*, *Egr2*, *Rplp1* et *Foxb2* (100 mg/kg par jour) (J50-J60)	(Zama et al. 2009)
DEHP (Antiandrogénique)	500 mg/kg par jour, In utero (12,5-19 Jpc)	Souris, testis	↗ *Dnmt1* , *3A* et *3B* (19 Jpc)	Hyperméthylation globale (19 Jpc)	(Martinez-Arguelles et al. 2009)
DEHP (Antiandrogénique)	100-950 mg/kg par jour, In utero + néonatal (14-19 Jpc ou 14 Jpc-naissance)	Rat, testis	n. d.	Hyperméthylation récepteur minéralocorticoïdes (J3, J21, J60)	(Martinez-Arguelles et al. 2009)
EB ou BPA (Estrogénique)	EB : 0,001 µg/jour et 25 µg/jour ou BPA : 0,1 µg/jour, Néonatal (J1, J3, J5)	Rat, prostate	n. d.	Hypométhylation PDED4 à J90 et J200, autres loci hyperméthylés (ex. *Car-XI*, *PLCβ3*, *Slc12a2, HPCAI1, CARK, GPCR14,*) et hypométhylés (ex. *PdgfRα*)	(Ho et al. 2006)

Tableau 9 (suite). Exposition aux perturbateurs endocriniens et leur impact sur l'expression des DNMTs ou sur la méthylation de l'ADN

(Jpc : jours post-coïtum, J : jours postnatals, n. d. : non déterminé)

Les microRNAs : nouveaux acteurs dans la programmation développementale des altérations de la spermatogenèse par les perturbateurs endocriniens

Compte-tenu de l'altération du taux des protéines DNMTs sans altération transcriptionnelle après exposition néonatale à EB, nous avons posé la question d'une potentielle implication d'une régulation post-transcriptionnelle médiée par des microRNAs de la famille miR-29s. En effet, des travaux récents ont suggéré que les microRNAs de la famille miR-29 pouvaient être des facteurs de régulation de l'expression des DNMTs sur des tissus humains et murins (Fabbri et al. 2007, Garzon et al. 2009, Takada et al. 2009). Ainsi, nous avons mis en évidence que l'exposition néonatale à l'EB entraine une augmentation dose-dépendante de l'expression de miR-29a, b et c uniquement dans le testicule adulte. De plus, nous montrons, que le miR-29b qui est le miRNA le plus stimulé après exposition à l'EB (augmentation d'un facteur 2,6), est celui qui a la plus grande capacité à diminuer le taux des protéines DNMTs *in vitro*. A partir de nos données, plusieurs arguments indiquent que la diminution des protéines DNMTs est liée à l'augmentation d'expression des miR-29s. Tout d'abord, la diminution des taux de protéines et l'augmentation des miR-29s sont observées : aux mêmes doses d'EB, mais également à la même période de développement postnatal (à 90 jpn mais pas à 6 jpn). Ensuite, la transfection d'analogues synthétiques de miR-29s dans des lignées de cellules germinales murines GC-1 diminue de manière drastique les taux de DNMT3A, DNMT3B et DNMT1. Plus récemment, des auteurs ont publié sur d'autres modèles des données allant dans le même sens que nos résultats. Ainsi, l'irradiation de souris mâles induit une stimulation des taux testiculaires de miR-29a et b qui est associée à une diminution des taux de protéine DNMT3A, ce qui provoque une hypométhylation des séquences *LINE-1* et SINE B2 transmissible à la descendance (Filkowski et al. 2009).

Le transcrit *Dnmt1* n'est pas une cible directe des miR-29s (Garzon, Liu, et al. 2009). Dans notre modèle l'expression de *Dnmt1* est également diminuée à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel ce qui suggère un mécanisme de régulation différent. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que la dérégulation de DNMT1 ferait intervenir : (1) un mécanisme d'inhibition indirect via les miR-29s modulant des régulateurs transcriptionnels de *Dnmt1*, et/ou (2) un mécanisme d'inhibition direct via la stimulation d'autres microRNAs qui ciblent le transcrit de *Dnmt1* comme miR-148b-3p, miR-148a et miR-152 (prédictions chez le rat par la base de données Targetscan, Braconi et al. 2010).

D'une manière intéressante, Takada et al. (2009) ont montré que durant le développement des cellules germinales, miR-29b est deux fois plus exprimé dans la gonade femelle que dans la gonade mâle suggérant que miR-29b serait plus spécifiquement impliqué dans la maturation des cellules germinales femelles. Alors que, dans notre modèle, miR-29b n'est pas détectable dans le testicule immature, il apparait dans le testicule mature. Ces résultats suggèrent que l'exposition néonatale à l'estradiol benzoate a induit de manière inappropriée un programme de « maturation femelle » via une stimulation de l'expression de miR-29b au sein des cellules germinales mâles qui, a long terme, se traduit par une mort des cellules germinales mâles.

L'augmentation des miR-29s a pour conséquence fonctionnelle la chute des DNMTs (voir ci-dessus) mais aussi la diminution d'expression du facteur antiapoptotique MCL-1. D'autres études ont déjà impliqué les miR-29s dans le phénomène apoptotique soit en régulant MCL-1 (Garzon, Heaphy, et al. 2009) , soit en régulant la voie P53 (Park et al. 2009). Dans notre modèle d'exposition à l'EB, l'apoptose à long terme des cellules germinales testiculaires adultes pourrait s'expliquer par l'augmentation des miR-29s qui inhibent les DNMTs (voir plus haut) et le facteur antiapoptotique MCL-1.

Après exposition *in utero* au FLU, même s'il semble que des mécanismes transcriptionnels soient aussi impliqués dans la dérégulation des DNMTs (diminution des protéines et transcrits), il n'est pas exclu que les miR-29s soient également altérés au niveau du testicule dans ce modèle d'exposition (figure 64). De même, nous avons détecté une diminution de cIAP2 et une augmentation de SMAC/DIABLO, d'XIAP et de la survivine sans altération de leurs transcrits. Il est donc envisageable qu'une altération de miRNAs contrôlant la traduction de ces protéines soit impliquée après une exposition fœtale au flutamide. Ces questions restent à être testées expérimentalement.

En somme, nos données indiquent (figure 64) : (1) que l'exposition néonatale à un estrogène durant la vie néonatale stimule à long terme l'expression de microRNAs, (2) un mode de contrôle original de la machinerie épigénétique via la régulation des DNMTs par les miRNA miR-29s. Finalement, notre travail démontre pour la première fois l'implication des microRNAs dans la programmation développementale d'une pathologie adulte après exposition à un composé perturbateur endocrinien.

Hypothèses sur la dérégulation des microRNAs et les pathologies développementales

Des données de la littérature ont déjà suggéré que l'altération des miRNAs peut être impliquée dans l'effet à long terme des perturbations pendant le développement précoce. A titre d'exemple, il a été mis en évidence que l'administration d'un régime riche en graisses à des souris gestantes entrainait une altération de profil d'expression des miRNAs au niveau du foie de la descendance (Wang, Zhang, et al. 2009). Par ailleurs, l'exposition in utero de souris à l'éthanol induit à long terme une altération de l'expression de certains miRNAs au niveau du cerveau de ces animaux (Wang, Zhang, et al. 2009).

Actuellement, les mécanismes pouvant contribuer à une altération à long terme des miRNAs ne sont pas bien connus. Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués comme des altérations épigénétiques au niveau des gènes de miRNA ou encore une altération des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de ces miRNAs, ou finalement des altérations de la biogenèse ou de la dégradation des miRNAs. Parmi les mécanismes que nous suspectons, le remodelage de la chromatine au niveau des régions régulatrices de l'expression des miRNAs pourrait être modifié après un traitement aux estrogènes (figure 64). Dans ce contexte il a été mis en évidence, in vitro, que l'exposition de cellules épithéliales mammaires au DES peut modifier la méthylation des histones (H3K27me3 et H3K9me2) au niveau du gène miR-9-3 conduisant à son inactivation (Hsu et al. 2009). Dans le cas des miR-29s, une étude a également montré que l'expression de miR-29b et -29c pouvait être modulée par le facteur YY1 qui recrute certains facteurs pouvant modifier les histones (histones déacétylases, protéines polycomb) (Wang, Garzon, et al. 2008). De plus, il semble que les gènes de miR-29s ne possèdent pas d'ilôts CpG dans leur séquence (base de données miRGen), de ce fait une altération de la méthylation de l'ADN n'est vraisemblablement pas impliquée dans la surexpression de ces miRNAs. Dans notre modèle d'exposition néonatale à l'EB, la modification de la chromatine au niveau des histones située dans le promoteur des miR-29s est une des pistes de travail. En outre, il a été mis en évidence dans le laboratoire que l'exposition néonatale à l'EB ou au DES pouvait induire une altération d'expression, juste après le traitement, de l'ARNm et de la protéine G9a, une histone méthyltransférase qui dépose les marques H3K9me1 et H3K9me2 (Volle et al. 2009). Il serait donc intéressant dans notre modèle d'identifier si la dérégulation des miR-29s pourraient être liée à des modifications d'expression de certaines histones méthyltransférases (ex. G9a, EZH2) et les marques épigénétiques qu'elles mettent en place (H3K27me3, H3K9me1 et H3K9me2).

Conclusion

Notre travail a donc permis de montrer que l'exposition à des composés possédant une activité de perturbateur endocrinien (PEs), durant les périodes critiques de développement (fœtale, néonatale), induit un phénotype d'hypospermatogenèse mettant en jeu le processus apoptotique au niveau des cellules germinales. Nos données indiquent également que lors de l'exposition développementale, se produit une programmation à long terme de l'hypospermatogenèse qui pourrait mettre en jeu les effecteurs épigénétiques de type ADN méthyltransférases (DNMTs). Ainsi, nos résultats permettent d'apporter un nouveau regard sur l'implication des DNMTs dans la problématique des PEs. Dans le cas particulier de l'exposition aux estrogènes nous avons identifié l'implication de nouveaux effecteurs, les microRNAs, qui semblent avoir un rôle clé en amont dans les mécanismes de programmation à long terme de la pathologie adulte. Compte-tenu de leur action pléiotropique dans l'inhibition d'expression des gènes/protéines impliqué dans des processus biologiques communs, les microRNAs pourraient représenter des biomarqueurs très pertinents de l'action des perturbateurs endocriniens. En effet, leurs niveaux d'expression sont modulés dès les faibles doses alors que les altérations histologiques ne sont pas visibles.

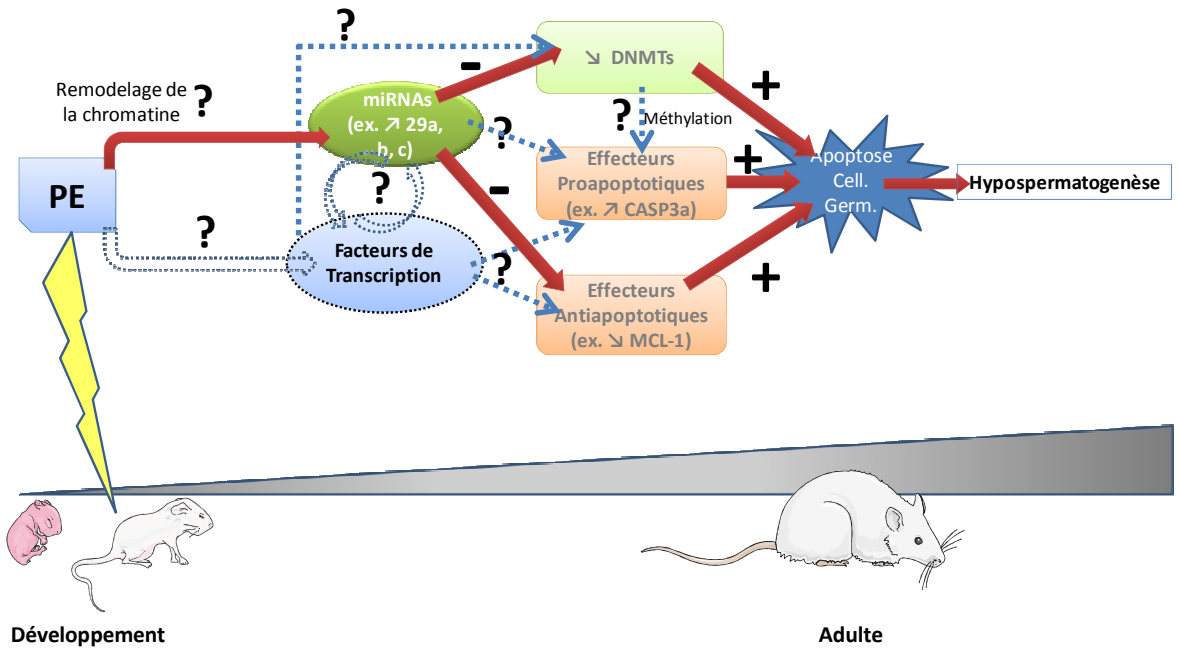


Figure 64. Représentation schématique des effets d'une exposition développementale aux PEs sur les microRNAs, les DNMTs et les effecteurs apoptotiques.

Perspectives

VII - Perspectives

Notre travail a permis, dans le cadre du concept de programmation développementale des pathologies adultes, initialement suggéré par le syndrome métabolique, d'impliquer d'autres pathologies comme les pathologies testiculaires. Ce travail devrait se poursuivre par :

- La mise en évidence, de manière globale, dans nos modèles expérimentaux animaux des séquences (ex. gènes, éléments transposables) dont la méthylation est altérée. Ceci mettra en jeu des techniques d'immunoprécipitation de l'ADN (MeDIP) couplée au microarray.
- L'analyse de l'expression des régulateurs et cofacteurs de méthylation de l'ADN.
- La recherche des mécanismes ayant conduit à l'altération d'expression des microRNAs en étudiant la machinerie de biogenèse des miRNAs (approches in vitro de siRNA) ou encore la méthylation des histones au niveau des gènes de miRNA (approche d'immunoprécipitation de chromatine, ChIP).
- L'identification du profil d'expression de l'ensemble des microRNAs altérés après exposition aux perturbateurs endocriniens par l'utilisation de la QPCR Low Density Array ou le microarray.
- A partir des biomarqueurs générés (ex. séquences hypométhylées comme les *LINE-1*, miRNAs comme les miR-29s), identifier au niveau de banques de tissus humains (biopsies, sang) issues de patients infertiles ou atteints de cancers testiculaires l'éventuelle signature d'une exposition aux perturbateurs endocriniens. Ceci pourra être mis en oeuvre par des approches simples de QPCR HRM (pour la méthylation) ou de QPCR Taqman sur les microRNAs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdalla, H., Yoshizawa, Y. & Hochi, S., 2009. Active demethylation of paternal genome in mammalian zygotes. *The Journal of reproduction and development*, 55(4), 356-60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19721335.

Aceitero, J. et al., 1998. Neonatal exposure of male rats to estradiol benzoate causes rete testis dilation and backflow impairment of spermatogenesis. *The Anatomical record*, 252(1), 17-33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9737741.

Aguirre-Arteta, A.M. et al., 2000. Expression of an alternative Dnmt1 isoform during muscle differentiation. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 11(10), 551-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063128.

Anway, M.D. & Skinner, M.K., 2008. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the prostate transcriptome and adult onset disease. *The Prostate*, 68(5), 517-29. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220299.

Anway, M.D. et al., 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5727), 1466-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15933200.

Anway, M.D., Leathers, C. & Skinner, M.K., 2006. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology*, 147(12), 5515-23. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973726.

Anway, M.D., Rekow, S.S. & Skinner, M.K., 2008. Comparative anti-androgenic actions of vinclozolin and flutamide on transgenerational adult onset disease and spermatogenesis. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 26(2), 100-6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762243.

Anway, M.D., Rekow, S.S. & Skinner, M.K., 2008. Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome. *Genomics*, 91(1), 30-40. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042343.

Ariel, M., Cedar, H. & McCarrey, J., 1994. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nature genetics*, 7(1), 59-63. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8075642.

Assinder, S. et al., 2006. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction*.

Atanassova, N. et al., 1999. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology*, 140(11), 5364-73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10537168.

Azhar, S. & Reaven, E., 2007. The Leydig Cell in Health and Disease. *The Leydig Cell in Health and Disease*, 135-148. Available at: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-59745-453-7.

Bachman, K.E., Rountree, M.R. & Baylin, S.B., 2001. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *The Journal of biological chemistry*, 276(34), 32282-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427539.

Ballestar, E. & Esteller, M., 2008. Epigenetic gene regulation in cancer. *Advances in genetics*, 61(07), 247-67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282509.

Barad, O. et al., 2004. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome research*, 14(12), 2486-94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15574827.

Barbato, C., Ruberti, F. & Cogoni, C., 2009. Searching for MIND: microRNAs in neurodegenerative diseases. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2009, 871313. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707536.

Barker, D.J. et al., 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2(8663), 577-80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570282.

Barker, D.J., 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 311(6998), 171-4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7613432.

Barker, D.J., 1995. Intrauterine programming of adult disease. *Molecular medicine today*, 1(9), 418-23. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9415190.

Barker, D.J., 2007. The origins of the developmental origins theory. *Journal of internal medicine*, 261(5), 412-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17444880.

Barsoum, I.B. & Yao, H.H., 2010. Fetal leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *Journal of andrology*, 31(1), 11-5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875489.

Bartolomei, M.S., 2009. Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes & development*, 23(18), 2124-33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759261.

Bellido, C. et al., 1990. Possible role of changes in post-natal gonadotrophin concentrations on permanent impairment of the reproductive system in neonatally oestrogenized male rats. *Journal of reproduction and fertility*, 90(2), 369-74. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2123500.

Bellvé, a.R. et al., 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *The Journal of cell biology*, 74(1), 68-85. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/874003.

Belmont, A.S., 2002. Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 15855-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461163.

Benahmed, M. et al., 1981. Specific low density lipoprotein receptors in pig Leydig cells. Role of this lipoprotein in cultured Leydig cells steroidogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 99(4), 1123-30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6266412.

Benbrahim-Tallaa, L. et al., 2008. Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. *The Journal of endocrinology*, 196(1), 21-31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18180314.

Benetti, R. et al., 2008. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nature structural & molecular biology*, 15(3), 268-79. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311151.

Bernstein, E. et al., 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics*, 35(3), 215-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528307.

Bestor, T.H., 1988. Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene*, 74(1), 9-12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3248734.

Biermann, K. et al., 2007. Genome-wide expression profiling reveals new insights into pathogenesis and progression of testicular germ cell tumors. *Cancer genomics & proteomics*, 4(5), 359-67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993720.

Boissonnas, C.C. et al., 2009. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *European journal of human genetics : EJHG*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584898.

Bourc'his, D. & Bestor, T.H., 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 431(7004), 96-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15318244.

Bourc'his, D. et al., 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5551), 2536-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719692.

Bouskine, A. et al., 2009. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environmental health perspectives*, 117(7), 1053-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19654912.

Boussouar, F. & Benahmed, M., 2004. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 15(7), 345-50. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350607.

Bozec, A. et al., 2004. The mitochondrial-dependent pathway is chronically affected in testicular germ cell death in adult rats exposed in utero to anti-androgens. *The Journal of endocrinology*, 183(1), 79-90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525576.

Braconi, C., Huang, N. & Patel, T., 2010. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(3), 881-90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20146264.

Breving, K. & Esquela-Kerscher, A., 2009. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800023.

Brock, B.J. & Waterman, M.R., 1999. Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species. *Biochemistry*, 38(5), 1598-606. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931027.

Bromer, J.G. et al., 2009. Hypermethylation of homeobox A10 by in utero diethylstilbestrol exposure: an epigenetic mechanism for altered developmental programming. *Endocrinology*, 150(7), 3376-82. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299448.

Cai, B., Pan, Z. & Lu, Y., 2009. The Roles of MicroRNAs in Heart Diseases: A Novel Important Regulator. *Current medicinal chemistry*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015039.

Caione, P., 2009. Prevalence of hypospadias in European countries: is it increasing? *European urology*, 55(5), 1027-9; discussion 1029-30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19203828.

Calin, G.A. et al., 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434020.

Calin, G.A., Garzon, R. & Croce, C.M., 2009. MicroRNAs in Cancer. *Annual review of medicine*, 60, 167-79. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630570.

Carreau, S. & Hess, R.a., 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1546), 1517-35. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403867.

Carreau, S. et al., 2007. Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 45 Suppl 1, S5-10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292817.

Carreau, S., Delalande, C. & Galeraud-Denis, I., 2009. Mammalian sperm quality and aromatase expression. *Microscopy research and technique*, 72(8), 552-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19263495.

Carreau, S., de Vienne, C. & Galeraud-Denis, I., 2008. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Advances in medical sciences*, 53(2), 139-44. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18614433.

Cederroth, C.R. et al., 2007. Estrogen receptor alpha is a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism. *Endocrinology*, 148(11), 5507-19. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17673513.

Chekulaeva, M. & Filipowicz, W., 2009. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current opinion in cell biology*, 21(3), 452-60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19450959.

Chen, T. & Li, E., 2006. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Current topics in microbiology and immunology*, 301, 179-201. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16570848.

Chen, T. et al., 2002. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *The Journal of biological chemistry*, 277(41), 38746-54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12138111.

Cheung, H. et al., 2009. DNA methylation of cancer genome. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 87(4), 335-50. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19960550.

Chimento, A. et al., 2010. 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. *Molecular and cellular endocrinology*, 320(1-2), 136-44. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132863.

Christensen, A.K., 2007. The Leydig Cell in Health and Disease. *The Leydig Cell in Health and Disease*, 3-30. Available at: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-59745-453-7.

Christensen, M. & Schratt, G.M., 2009. microRNA involvement in developmental and functional aspects of the nervous system and in neurological diseases. *Neuroscience letters*, 466(2), 55-62. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393715.

Clermont, Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews*, 52(1), 198-236. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4621362.

Cohen, A. et al., 2008. Alterations in micro-ribonucleic acid expression profiles reveal a novel pathway for estrogen regulation. *Endocrinology*, 149(4), 1687-96. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096665.

Cooke, P.S. & Eroschenko, V.P., 1990. Inhibitory effects of technical grade methoxychlor on development of neonatal male mouse reproductive organs. *Biology of reproduction*, 42(3), 585-96. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2340338.

Cowin, P.a. et al., 2010. Vinclozolin Exposure in Utero Induces Postpubertal Prostatitis and Reduces Sperm Production via a Reversible Hormone-Regulated Mechanism. *Endocrinology*, 151(February), 783-792. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056826.

Cowland, J.B., Hother, C. & Grønbaek, K., 2007. MicroRNAs and cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 115(10), 1090-106. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042145.

Cowland, J.B., Hother, C. & Grønbaek, K., 2007. MicroRNAs and cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 115(10), 1090-106. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042145.

Croce, C.M., 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 10(10), 704-14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19763153.

Cupp, A.S. & Skinner, M.K., 2001. Actions of the endocrine disruptor methoxychlor and its estrogenic metabolite on in vitro embryonic rat seminiferous cord formation and perinatal testis growth. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 15(3), 317-26. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390175.

Cupp, A.S. et al., 2003. Effect of transient embryonic in vivo exposure to the endocrine disruptor methoxychlor on embryonic and postnatal testis development. *Journal of andrology*, 24(5), 736-45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954667.

Damgaard, I.N. et al., 2007. Cryptorchidism and maternal alcohol consumption during pregnancy. *Environmental health perspectives*, 115(2), 272-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384777.

Davis, B.N. & Hata, A., 2009. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell communication and signaling : CCS*, 7, 18. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664273.

Davis, B.N. & Hata, A., 2009. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell communication and signaling : CCS*, 7, 18. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664273.

Davis, T.L. et al., 1999. Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics*, 58(1), 18-28. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331941.

Davis, T.L. et al., 2000. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Human molecular genetics*, 9(19), 2885-94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092765.

Dean, W., Lucifero, D. & Santos, F., 2005. DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 75(2), 98-111. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16035040.

Delbès, G. et al., 2004. Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology*, 145(7), 3395-403. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044378.

Delbès, G., Levacher, C. & Habert, R., 2006. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction (Cambridge, England)*, 132(4), 527-38. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008464.

Delclos, K.B. et al., 2001. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reproductive Toxicology*, 15, 647-663.

Deroo, B.J. & Korach, K.S., 2006. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation*, 116(3), 561-70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16511588.

Detich, N., Theberge, J. & Szyf, M., 2002. Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *The Journal of biological chemistry*, 277(39), 35791-4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12177048.

Diamanti-Kandarakis, E. et al., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4), 293-342. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502515.

Doerksen, T., Benoit, G. & Trasler, J., 2000. Deoxyribonucleic acid hypomethylation of male germ cells by mitotic and meiotic exposure to 5-azacytidine is associated with altered testicular histology. *Endocrinology*, 141(9), 3235-44. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10965894.

Dohle, G.R., Smit, M. & Weber, R.F., 2003. Androgens and male fertility. *World journal of urology*, 21(5), 341-5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14566423.

Duursma, A.M. et al., 2008. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(5), 872-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367714.

Eddy, E.M. et al., 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*, 137(11), 4796-805. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895349.

Elzeinova, F. et al., 2008. Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 26(3-4), 231-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18940246.

Eustache, F. et al., 2009. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environmental health perspectives*, 117(8), 1272-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672408.

Ewen, K.A. & Koopman, P., 2009. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. *Molecular and cellular endocrinology*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036311.

Fabbri, M. et al., 2007. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15805-10.

Fabbri, M. et al., 2007. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15805-10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890317.

Faqi, A.S. et al., 2004. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *European Journal of Cancer*, 18, 605-611.

Fatemi, M. et al., 2002. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *European Journal of Biochemistry*, 269(20), 4981-4984. Available at: http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046%2Fj.1432-1033.2002.03198.x.

Fatemi, M. et al., 2001. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *Journal of molecular biology*, 309(5), 1189-99. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11399088.

Feinberg, A.P. & Vogelstein, B., 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301(5895), 89-92. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6185846.

Filipiak, E. et al., 2009. Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 47(5), S113-20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067881.

Filipponi, D. & Feil, R., 2009. Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 4(1), 27-30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106644.

Filkowski, J. et al., 2009. Hypomethylation and genome instability in the germline of exposed parents and their progeny is associated with altered miRNA expression. *Carcinogenesis*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19959559.

Foster, P.M., 2006. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *International journal of andrology*, 29(1), 140-7; discussion 181-5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102138.

Fraser, L.R. et al., 2006. Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(5), 1184-93. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16459350.

Fuks, F. et al., 2001. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *The EMBO journal*, 20(10), 2536-44. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350943.

Galetzka, D. et al., 2006. Expression ofDNMT3A transcripts and nucleolar localization of DNMT3A protein in human testicular and fibroblast cells suggest a role for de novo DNA methylation in nucleolar inactivation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(4), 885-894. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.20798.

Galetzka, D. et al., 2007. Sex-specific windows for high mRNA expression of DNA methyltransferases 1 and 3A and methyl-CpG-binding domain proteins 2 and 4 in human fetal gonads. *Molecular reproduction and development*, 74(2), 233-41. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998846.

Gama-Sosa, M.A. et al., 1983. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic acids research*, 11(19), 6883-94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6314264.

Garzon, R. et al., 2009. MicroRNA -29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene re-expression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*, 6411-6418.

Garzon, R. et al., 2009. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood*, 114(26), 5331-41. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850741.

Gillis, A.J. et al., 2007. High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours. *The Journal of pathology*, 213(3), 319-28. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17893849.

Gluckman, P.D. et al., 2008. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England journal of medicine*, 359(1), 61-73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18596274.

Godfrey, K.M. & Barker, D.J., 2001. Fetal programming and adult health. *Public health nutrition*, 4(2B), 611-24. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683554.

Godmann, M., Lambrot, R. & Kimmins, S., 2009. The dynamic epigenetic program in male germ cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. *Microscopy Research and Technique*, 000, NA-NA.

Gokul, G. et al., 2007. DNA methylation profile at the DNMT3L promoter: a potential biomarker for cervical cancer. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 2(2), 80-5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965599.

Gold, M. & Hurwitz, J., 1964. The enzymatic methylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. VI. Further studies on the properties of the deoxyribonucleic acid methylation reaction. *The Journal of biological chemistry*, 239(11), 3866-74. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14257621.

Goldberg, A.D., Allis, C.D. & Bernstein, E., 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128(4), 635-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320500.

Goldberg, J.M. & Falcone, T., 1999. Effect of diethylstilbestrol on reproductive function. *Fertility and sterility*, 72(1), 1-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428139.

Goll, M.G. & Bestor, T.H., 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry*, 74, 481-514. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952895.

Goll, M.G. & Bestor, T.H., 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry*, 74, 481-514. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952895.

Goll, M.G. et al., 2006. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5759), 395-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424344.

González-González, E., López-Casas, P.P. & del Mazo, J., 2008. The expression patterns of genes involved in the RNAi pathways are tissue-dependent and differ in the germ and somatic cells of mouse testis. *Biochimica et biophysica acta*, 1779(5), 306-11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316047.

Gowher, H. et al., 2005. De novo methylation of nucleosomal DNA by the mammalian Dnmt1 and Dnmt3A DNA methyltransferases. *Biochemistry*, 44(29), 9899-904. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16026162.

Gowher, H., Stuhlmann, H. & Felsenfeld, G., 2008. Vezf1 regulates genomic DNA methylation through its effects on expression of DNA methyltransferase Dnmt3b. *Genes & development*, 22(15), 2075-84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18676812.

Goyal, H.O. et al., 2003. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biology of reproduction*, 68(6), 2081-91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606459.

Gray, L.E. et al., 1999. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicology and industrial health*, 15(1-2), 48-64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10188191.

Griffiths, E.A. & Gore, S.D., 2009. MicroRNA: mIR-ly regulators of DNMT? *Blood*, 113(25), 6269-70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541832.

Griswold, S.L. & Behringer, R.R., 2009. Fetal Leydig cell origin and development. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 3(1), 1-15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339813.

Gruenbaum, Y., Cedar, H. & Razin, A., 1982. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature*, 295(5850), 620-2.

Gu, Y. et al., 2009. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development (Cambridge, England)*, 136(8), 1295-303. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279135.

Habert, R. et al., 2009. Adverse effects of endocrine disruptors on the foetal testis development: focus on the phthalates. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 47(5), S67-74. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067897.

Hagenäs, L. et al., 1975. Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP). *Molecular and cellular endocrinology*, 2(5), 339-50. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1126559.

Haider, S.G., Servos, G. & Tran, N., 2007. *The Leydig Cell in Health and Disease*, Totowa, NJ: Humana Press. Available at: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-59745-453-7.

Haider, S.G., 2004. *International Review of Cytology Volume 233*, Elsevier. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037365.

Hales, C.N. & Barker, D.J., 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35(7), 595-601. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644236.

Hales, D.B., 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of reproductive immunology*, 57(1-2), 3-18. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385830.

Hammoud, S.S. et al., 2009. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertility and sterility*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880108.

Hanson, M.A. & Gluckman, P.D., 2008. Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 102(2), 90-3. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226060.

Hata, K. et al., 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development (Cambridge, England)*, 129(8), 1983-93. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11934864.

Hauser, R. & Sokol, R., 2008. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertility and sterility*, 89(2 Suppl), e59-65. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308066.

Hauser, R. et al., 2006. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 17(6), 682-91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17003688.

Hayashi, K. et al., 2008. MicroRNA Biogenesis Is Required for Mouse Primordial Germ Cell Development and Spermatogenesis. *PLoS ONE*, 3(3), e1738.

He, L. et al., 2007. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nature reviews. Cancer*, 7(11), 819-22. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914404.

Hedelin, G. & Remontet, L., 2002. Évolution du cancer du testicule en France. *Andrologie*, 12(3), 269-273. Available at: http://www.springerlink.com/content/t3278pul262v4571.

Heijmans, B.T. et al., 2009. The epigenome: archive of the prenatal environment. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 4(8), 526-31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923908.

Hermann, A., Gowher, H. & Jeltsch, A., 2004. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61(19-20), 2571-87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15526163.

Hess, R.A. & França, L.R., 2005. *Sertoli Cell Biology*, Elsevier. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/B978-012647751-1/50004-0.

Hess, R.A. et al., 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 390(6659), 509-12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393999.

Ho, S. et al., 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer research*, 66(11), 5624-32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16740699.

Hoivik, E.A. et al., 2008. Deoxyribonucleic acid methylation controls cell type-specific expression of steroidogenic factor 1. *Endocrinology*, 149(11), 5599-609. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18653709.

Holdcraft, R.W. & Braun, R.E., 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. *International journal of andrology*, 27(6), 335-42. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15595952.

Holstein, A., Schulze, W. & Davidoff, M., 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 1, 107. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617369.

Hossaini, A. et al., 2003. Male reproductive effects of octylphenol and estradiol in Fischer and Wistar rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 17(5), 607-15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555199.

Hotchkiss, R.D., 1948. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *The Journal of biological chemistry*, 175(1), 315-32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18873306.

Hou, J.W., Collins, D.C. & Schleicher, R.L., 1990. Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in murine Leydig cells. *Endocrinology*, 127(5), 2047-55. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2226298.

Houshdaran, S. et al., 2007. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PloS one*, 2(12), e1289. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18074014.

Howdeshell, K.L. et al., 2008. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environmental research*, 108(2), 168-76. Available at: fhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949836.

Hsieh, C., 2005. The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. *BMC biochemistry*, 6, 6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15799776.

Hsu, P. et al., 2009. Xenoestrogen-induced epigenetic repression of microRNA-9-3 in breast epithelial cells. *Cancer research*, 69(14), 5936-45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19549897.

Hu, J. et al., 2008. Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development. *Human molecular genetics*, 17(17), 2654-64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18544626.

Illingworth, R.S. & Bird, A.P., 2009. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS letters*, 583(11), 1713-20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376112.

Inawaka, K. et al., 2009. Maternal exposure to anti-androgenic compounds, vinclozolin, flutamide and procymidone, has no effects on spermatogenesis and DNA methylation in male rats of subsequent generations. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X09001161.

Iorio, M.V. & Croce, C.M., 2009. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(34), 5848-56. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19884536.

Ishii, T. et al., 2007. Up-regulation of DNA-methyltransferase 3A expression is associated with hypomethylation of intron 25 in human testicular germ cell tumors. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 212(2), 177-90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548962.

Ivell, R. & Hartung, S., 2003. The molecular basis of cryptorchidism. *Molecular human reproduction*, 9(4), 175-81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651898.

Jeltsch, A., 2006. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Current topics in microbiology and immunology*, 301, 203-25. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16570849.

Jin, Y. & Penning, T.M., 2001. Steroid 5alpha-reductases and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 15(1), 79-94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469812.

Jinawath, A. et al., 2005. Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase 3A and 3B genes by Sp3 and Sp1 zinc finger proteins. *The Biochemical journal*, 385(Pt 2), 557-64.

Johnson, K.J. et al., 2009. Developmental origins of cancer. *Cancer research*, 69(16), 6375-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19654290.

Johnson, L. et al., 2002. The pesticide methoxychlor given orally during the perinatal/juvenile period, reduced the spermatogenic potential of males as adults by reducing their Sertoli cell number. *Reproduction, nutrition, development*, 42(6), 573-80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12625421.

Johnson, L., Thompson, D.L. & Varner, D.D., 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal reproduction science*, 105(1-2), 23-51. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242891.

Jones, P.A. & Liang, G., 2009. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature reviews. Genetics*, (September), 1-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789556.

Jönsson, B.A. et al., 2005. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in young men. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 16(4), 487-93. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951666.

Jørgensen, N. et al., 2010. Testicular dysgenesis syndrome comprises some but not all cases of hypospadias and impaired spermatogenesis. *International journal of andrology*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132348.

KINCL, F.A., FOLCH PI, A. & HERRERA LASSO, L., 1963. Effect of estradiol benzoate treatment in the newborn male rat. *Endocrinology*, 72, 966-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14032798.

Kai, Z.S. & Pasquinelli, A.E., 2010. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 17(1), 5-10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051982.

Kaneda, M. et al., 2004. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, 429(24), 1-4.

Kassim, N.M. et al., 1997. The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *Journal of anatomy*, 190 (Pt 4, 577-88. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9183680.

Kato, H. et al., 2006. Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 22(1), 20-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16311018.

Kato, Y. et al., 2007. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Human molecular genetics*, 16(19), 2272-80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616512.

Kavlock, R. & Cummings, A., 2005. Mode of Action: Inhibition of Androgen Receptor Function—Vinclozolin-Induced Malformations in Reproductive Development. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(8-9), 721-726. Available at: http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.1080/10408440591007377.

Kazazian, H.H. & Goodier, J.L., 2002. LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell*, 110(3), 277-80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176313.

Kelly, T.L., Li, E. & Trasler, J., 2003. 5-aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome. *Journal of andrology*, 24(6), 822-30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581508.

Kim, I. et al., 2003. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicology letters*, 138(3), 185-92. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12565195.

Kim, J.K., Samaranayake, M. & Pradhan, S., 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(4), 596-612. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18985277.

Kim, V.N., Han, J. & Siomi, M.C., 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(2), 126-39.

Kishikawa, S. et al., 2002. Regulation of transcription of the Dnmt1 gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins. *European journal of biochemistry / FEBS*, 269(12), 2961-70.

Klip, H. et al., 2002. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *The Lancet*, 359(9312), 1102-1107. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943257.

Klose, R.J. & Bird, A.P., 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences*, 31(2), 89-97. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403636.

Kobayashi, H. et al., 2007. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human molecular genetics*, 16(21), 2542-51. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17636251.

Koopman, P. et al., 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348(6300), 450-2. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2247150.

Kotaja, N. & Sassone-Corsi, P., 2007. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(1), 85-90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183363.

Kotaja, N. et al., 2006. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2647-52. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16477042.

Kovalchuk, O. et al., 2007. Estrogen-induced rat breast carcinogenesis is characterized by alterations in DNA methylation, histone modifications and aberrant microRNA expression. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(16), 2010-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17700064.

Krege, J.H. et al., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15677-82. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861029.

Krishnamoorthy, G. et al., 2005. Effect of Aroclor 1254 on Sertoli cellular antioxidant system, androgen binding protein and lactate in adult rat in vitro. *Toxicology*, 212(2-3), 195-205. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955608.

Kuiper, G.G. et al., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 4252-63. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751507.

Kula, K. et al., 2001. Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 178(1-2), 89-97. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403898.

Kumar, M.S. et al., 2007. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature genetics*, 39(5), 673-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17401365.

La Salle, S. & Trasler, J., 2006. Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Developmental biology*, 296(1), 71-82. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725135.

La Salle, S. et al., 2007. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC developmental biology*, 7(1), 104. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875220.

La Salle, S. et al., 2007. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC developmental biology*, 7(1), 104. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875220.

La Salle, S. et al., 2004. Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. *Developmental biology*, 268(2), 403-15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063176.

Lau, P. & MacRae, I.J., 2009. The molecular machines that mediate microRNA maturation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(1), 54-60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19175700.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V., 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), 843-54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621.

Lees-Murdock, D. & Walsh, C., 2008. DNA methylation reprogramming in the germ line. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 626(February), 1. Available at: http://www.springerlink.com/index/g228558425055061.pdf.

Leung, A.K. & Robson, W.L., 2007. Hypospadias: an update. *Asian journal of andrology*, 9(1), 16-22. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17187155.

Li, E., Bestor, T.H. & Jaenisch, R., 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915-26. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1606615.

Li, L., 2007. Polychlorinated biphenyl exposure and CYP19 gene regulation in testicular and adrenocortical cell lines. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 21(6), 1087-94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512696.

Li, S. et al., 1997. Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus. *Cancer research*, 57(19), 4356-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331098.

Li, S. et al., 2003. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation. *Ann NY Acad Sci*, 983, 161–169. Available at: http://www3.interscience.wiley.com/journal/120778798/abstract.

Li, Y. et al., 2009. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 108(2), 427-36. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193734.

Lian, J. et al., 2009. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 7, 13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210773.

Liang, G. et al., 2002. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Molecular and cellular biology*, 22(2), 480-91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756544.

Lie, P.P., Cheng, C.Y. & Mruk, D.D., 2009. Coordinating cellular events during spermatogenesis: a biochemical model. *Trends in biochemical sciences*, 34(7), 366-73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535250.

Lind, G.E., Skotheim, R.I. & Lothe, R.a., 2007. The epigenome of testicular germ cell tumors. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 115(10), 1147-60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042148.

Liu, C. et al., 2004. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9740-4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15210942.

Liu, J., 2008. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Current opinion in cell biology*, 20(2), 214-21. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329869.

Lopez, J. et al., 2009. The context and potential of epigenetics in oncology. *British journal of cancer*, 100(4), 571-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223907.

Luczak, M.W. & Jagodziński, P.P., 2006. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 44(3), 143-54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16977793.

Maatouk, D.M. et al., 2008. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. *Biology of reproduction*, 79(4), 696-703. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633141.

Macias, S., Michlewski, G. & Cáceres, J.F., 2009. Hormonal regulation of microRNA biogenesis. *Molecular cell*, 36(2), 172-3. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854126.

Macleod, D.J. et al., 2009. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *International journal of andrology*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002220.

Maekawa, M., Kamimura, K. & Nagano, T., 1996. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology*, 59(1), 1-13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8727359.

Maire, M. et al., 2005. Alteration of transforming growth factor-beta signaling system expression in adult rat germ cells with a chronic apoptotic cell death process after fetal androgen disruption. *Endocrinology*, 146(12), 5135-43. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166221.

Maksakova, I.A., Mager, D.L. & Reiss, D., 2008. Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(21), 3329-47. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818875.

Marques, C.J. et al., 2009. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertility and sterility*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19338988.

Marsee, K. et al., 2006. Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environmental health perspectives*, 114(6), 805-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16759976.

Martinez-Arguelles, D.B. et al., 2009. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases mineralocorticoid receptor expression in the adult testis. *Endocrinology*, 150(12), 5575-85. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819939.

Marty, M.S. et al., 2003. Development and maturation of the male reproductive system. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 68(2), 125-36. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12866704.

Masutomi, N., 2003. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology*, 192(2-3), 149-170. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X03002695.

Mathews, E. et al., 2009. Mal-development of the penis and loss of fertility in male rats treated neonatally with female contraceptive 17alpha-ethinyl estradiol: a dose-response study and a comparative study with a known estrogenic teratogen diethylstilbestrol. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 112(2), 331-43. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729556.

Mauduit, C. et al., 2006. [Long-term effects of environmental endocrine disruptors on male fertility]. *Gynécologie, obstétrique & fertilité*, 34(10), 978-84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16996771.

McCabe, M.T., Davis, J.N. & Day, M.L., 2005. Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer research*, 65(9), 3624-32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15867357.

McCarrey, J.R., Geyer, C.B. & Yoshioka, H., 2005. Epigenetic regulation of testis-specific gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061, 226-42. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467272.

McIntyre, B.S., Barlow, N.J. & Foster, P.M., 2001. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 62(2), 236-49.

McLaren, A., 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Developmental biology*, 262(1), 1-15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512014.

Merlet, J. et al., 2007. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

the United States of America, 104(9), 3615-20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360691.

Mertineit, C. et al., 1998. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development (Cambridge, England)*, 125(5), 889-97. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9449671.

Merzenich, H., Zeeb, H. & Blettner, M., 2010. Decreasing sperm quality: a global problem? *BMC public health*, 10, 24. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085639.

Michlewski, G. et al., 2008. Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Molecular cell*, 32(3), 383-93. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995836.

Migliore, C. & Giordano, S., 2009. MiRNAs as new master players. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(14), 2185-6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19617713.

Mikkilä, T.F., Toppari, J. & Paranko, J., 2006. Effects of neonatal exposure to 4-tert-octylphenol, diethylstilbestrol, and flutamide on steroidogenesis in infantile rat testis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 91(2), 456-66. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537657.

Montani, C. et al., 2009. Estrogen receptor-mediated transcriptional activity of genistein in the mouse testis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163, 475-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19456391.

Montani, C. et al., 2008. Genistein is an efficient estrogen in the whole-body throughout mouse development. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 103(1), 57-67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281260.

Mruk, D.D. & Cheng, C.Y., 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine reviews*, 25(5), 747-806. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466940.

Murono, E.P., Derk, R.C. & Akgul, Y., 2006. In vivo exposure of young adult male rats to methoxychlor reduces serum testosterone levels and ex vivo Leydig cell testosterone formation and cholesterol side-chain cleavage activity. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 21(2), 148-53. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226009.

Murugesan, P. et al., 2008. Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) inhibits testosterone biosynthesis and antioxidant enzymes in cultured rat Leydig cells. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 25(4), 447-54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502095.

Nagao, T. et al., 1999. Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 13(4), 303-11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453915.

Nef, S., Shipman, T. & Parada, L.F., 2000. A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Developmental biology*, 224(2), 354-61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10926772.

Nellemann, C. et al., 2003. The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 71(2), 251-62. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563111.

Netto, G.J. et al., 2008. Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21(11), 1337-44. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18622385.

Newbold, R.R., Padilla-Banks, E. & Jefferson, W.N., 2006. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*, 147(6 Suppl), S11-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690809.

Ng, E.K. et al., 2009. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *British journal of cancer*, 101(4), 699-706. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19638978.

Nishino, K. et al., 2004. DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *The Journal of biological chemistry*, 279(21), 22306-13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978045.

Nitta, H. et al., 1993. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*, 132(3), 1396-401. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440194.

O'Donnell, L. et al., 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine reviews*, 22(3), 289-318. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20126351.

O'Shaughnessy, P.J. et al., 2009. Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Molecular and cellular endocrinology*, 306(1-2), 2-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059463.

O'Shaughnessy, P.J., Baker, P.J. & Johnston, H., 2006. The foetal Leydig cell--differentiation, function and regulation. *International journal of andrology*, 29(1), 90-5; discussion 105-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16466528.

Oakes, C.C. et al., 2007. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), 228-33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190809.

Oakes, C.C. et al., 2007. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental biology*, 307(2), 368-79. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559830.

Okano, M. et al., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-57. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555141.

Okano, M., Xie, S. & Li, E., 1998. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic acids research*, 26(11), 2536-40. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9592134.

Olena, A.F. & Patton, J.G., 2010. Genomic organization of microRNAs. *Journal of cellular physiology*, 222(3), 540-5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020507.

Omezzine, A. et al., 2003. Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. *Endocrinology*, 144(2), 648-61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538628.

Omisanjo, O.A. et al., 2007. DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochemistry and cell biology*, 127(2), 175-81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960727.

Ooi, S.K. et al., 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, 448(7154), 714-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17687327.

Palakurthy, R.K. et al., 2009. Epigenetic silencing of the RASSF1A tumor suppressor gene through HOXB3-mediated induction of DNMT3B expression. *Molecular cell*, 36(2), 219-30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854132.

Palmer, J.R. et al., 2009. Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Environmental health : a global access science source*, 8, 37. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19689815.

Pandey, A.K. et al., 2009. MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 23(4-6), 221-32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19471090.

Papaioannou, M.D. et al., 2009. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Developmental biology*, 326(1), 250-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19071104.

Park, S. et al., 2009. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nature structural & molecular biology*, 16(1), 23-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079265.

Parker, R. & Sheth, U., 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular cell*, 25(5), 635-46. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349952.

Parks, L.G. et al., 2000. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 58(2), 339-49. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099646.

Parveen, M., Zhu, Y. & Kiyama, R., 2009. Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes. *FEBS letters*, 583(14), 2377-84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19555691.

Payne, A.H., 2007. *The Leydig Cell in Health and Disease*, Totowa, NJ: Humana Press. Available at: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-59745-453-7.

Peng, X. et al., 2009. The association risk of male subfertility and testicular cancer: a systematic review. *PloS one*, 4(5), e5591. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19440348.

Petersen, C. & Soder, O., 2006. The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone research*, 66(4), 153-61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16804315.

Pratt, A.J. & MacRae, I.J., 2009. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *The Journal of biological chemistry*, 284(27), 17897-901. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342379.

Pulizzi, N. et al., 2009. Interaction between prenatal growth and high-risk genotypes in the development of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 52(5), 825-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225753.

Putz, O. et al., 2001. Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: I. Effects on the prostate gland. *Biology of reproduction*, 65(5), 1496-505. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673267.

Putz, O. et al., 2001. Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: II. Effects on male puberty and the reproductive tract. *Biology of reproduction*, 65(5), 1506-17. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673268.

Raghupathy, P. et al., 2010. Glucose tolerance, insulin resistance and insulin secretion in young south Indian adults: Relationships to parental size, neonatal size and childhood body mass index. *Diabetes research and clinical practice*, 87(2), 283-92. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20115937.

Ramlau-Hansen, C.H. et al., 2007. Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *American journal of epidemiology*, 165(12), 1372-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369608.

Reik, W., Kelsey, G. & Walter, J., 1999. Dissecting de novo methylation. *Nature genetics*, 23(4), 380-2. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10581015.

Richardson, B.E. & Lehmann, R., 2010. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(1), 37-49. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027186.

Richiardi, L. et al., 2004. Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 13(12), 2157-66. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15598775.

Rivas, F.V. et al., 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature structural & molecular biology*, 12(4), 340-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800637.

Ro, S. et al., 2007. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental biology*, 311(2), 592–602. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160607013450.

Robertson, K.M. et al., 2001. Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. *Journal of andrology*, 22(5), 825-30.

Robertson, K.M. et al., 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 7986-91.

Rodriguez, I. et al., 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO journal*, 16(9), 2262-70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9171341.

Ross, A.J. & Capel, B., 2005. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 16(1), 19-25. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620545.

Rottach, A., Leonhardt, H. & Spada, F., 2009. DNA methylation-mediated epigenetic control. *Journal of cellular biochemistry*, 108(1), 43-51. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19565567.

Ruzsás, C. et al., 1979. Effect of the fungal toxin (zearalenone) on the reproductive system and fertility of male and female rats. *Acta biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 30(4), 335-45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/162329.

Safe, S., Wormke, M. & Samudio, I., 2000. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 5(3), 295-306. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973392.

Sakai, Y. et al., 2004. Co-expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a2 and Dnmt3L in gonocytes of mouse embryos. *Gene Expression Patterns*, 5(2), 231-237.

Sakai, Y. et al., 2001. Expression of DNA methyltransferase (Dnmt1) in testicular germ cells during development of mouse embryo. *Cell structure and function*, 26(6), 685-91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11942627.

Salian, S., Doshi, T. & Vanage, G., 2009. Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A. *Life sciences*, 85(1-2), 11-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379760.

Salian, S., Doshi, T. & Vanage, G., 2009. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*, 265(1-2), 56-67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782717.

Sato, K. et al., 2009. Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the mouse uterus. *Endocrine journal*, 56(1), 131-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997445.

Sato, K. et al., 2006. Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters the expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the epididymis of mice. *Endocrine journal*, 53(3), 331-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16714842.

Schaefer, C.B. et al., 2007. Epigenetic Decisions in Mammalian Germ Cells. *Science*, 316(5823), 398-399.

Schaefer, M. & Lyko, F., 2009. Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19730874.

Schneider, S. et al., 2008. Vinclozolin--the lack of a transgenerational effect after oral maternal exposure during organogenesis. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 25(3), 352-60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485663.

Sekido, R. & Lovell-Badge, R., 2009. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends in genetics : TIG*, 25(1), 19-29. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027189.

Sharpe, R.M. et al., 1998. Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: a possible role for estrogens in Sertoli cell development. *Biology of reproduction*, 59(5), 1084-94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9780313.

Sharpe, R.M., 2010. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1546), 1697-712. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2871918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Sharpe, R.M., 2010. Is It Time to End Concerns over the Estrogenic Effects of Bisphenol A? *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 114(1), 1-4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147444.

Shen, O. et al., 2009. Comparison of in vitro hormone activities of selected phthalates using reporter gene assays. *Toxicology letters*, 191(1), 9-14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19643168.

Shin, S. et al., 2009. MicroRNAs that respond to histone deacetylase inhibitor SAHA and p53 in HCT116 human colon carcinoma cells. *International journal of oncology*, 35(6), 1343-52. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885557.

Siedlecki, P. & Zielenkiewicz, P., 2006. Mammalian DNA methyltransferases. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION-*, 53(2), 245. Available at: http://www.actabp.pl/pdf/2_2006/245.pdf.

Sierens, J.E. et al., 2005. Estrogens in testis biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061(Testicular Cell Dynamics and Endocrine Signaling), 65-76.

Simpson, E. et al., 2000. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 11(5), 184-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856920.

Sinkkonen, L. et al., 2008. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nature structural & molecular biology*, 15(3), 259-67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311153.

Skakkebæk, N.E., Rajpert-De Meyts, E. & Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(5), 972-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331648.

Skinner, M.K. & Anway, M.D., 2005. Seminiferous cord formation and germ-cell programming: epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061, 18-32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467254.

Skinner, M.K., 2005. *Sertoli Cell Biology*, Elsevier. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/B978-012647751-1/50009-X.

Skotheim, R.I. et al., 2002. New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling. *Cancer research*, 62(8), 2359-64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956097.

Sofikitis, N. et al., 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(3-5), 323-30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400489.

Soler, C., Yeung, C.H. & Cooper, T.G., 1994. Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *International journal of andrology*, 17(5), 271-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7698853.

Soper, S.F. et al., 2008. Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis. *Developmental cell*, 15(2), 285-97. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694567.

Stebler, J. et al., 2004. Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Developmental biology*, 272(2), 351-61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15282153.

Stocco, D.M., 2007. *The Leydig Cell in Health and Disease*, Totowa, NJ: Humana Press. Available at: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-59745-453-7.

Su, X. et al., 2010. Expression pattern and clinical significance of DNA methyltransferase 3B variants in gastric carcinoma. *Oncology reports*, 23(3), 819-26. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20127025.

Suetake, I. et al., 2004. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *The Journal of biological chemistry*, 279(26), 27816-23. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15105426.

Sulewska, A. et al., 2007. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 45(3), 149-58. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951162.

Swales, a.K. & Spears, N., 2005. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction (Cambridge, England)*, 130(4), 389-99. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183857.

Swedenborg, E. et al., 2009. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal of molecular endocrinology*, 43(1), 1-10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211731.

Takada, S. et al., 2009. Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(8), 1507-14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509302.

Takashima, S. et al., 2009. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biology of reproduction*, 81(1), 155-64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228594.

Tang, W. et al., 2008. Persistent hypomethylation in the promoter of nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology*, 149(12), 5922-31.

Tena-Sempere, M. et al., 2000. Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor alpha and beta mRNA expression in rat testis during postnatal development. *The Journal of endocrinology*, 165(2), 345-57. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810299.

Thomson, J.M. et al., 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & development*, 20(16), 2202-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882971.

Toppari, J. & Kaleva, M., 1999. Maldescendus testis. *Hormone research*, 51(6), 261-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640886.

Toppari, J., 2008. Environmental endocrine disrupters. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 2(4-5), 260-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18987500.

Tostain, J., Rossi, D. & Martin, P.M., 2004. [Physiology of androgens in adult men]. *Progrès en urologie : journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie*, 14(5), 639-60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15747614.

Toyama, Y. & Yuasa, S., 2004. Effects of neonatal administration of 17beta-estradiol, beta-estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 19(2), 181-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501383.

Toyama, Y. et al., 2004. Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Archives of histology and cytology*, 67(4), 373-81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15700544.

Toyama, Y. et al., 2001. beta-estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse. *Molecular and cellular endocrinology*, 178(1-2), 161-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403906.

Trasler, J., 2009. Epigenetics in spermatogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 306(1-2), 33-6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481683.

Tsai, C. et al., 2006. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 Involves c-Jun NH(2)-terminal kinase signaling. *Cancer research*, 66(24), 11668-76. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17178861.

Turek-Plewa, J. & Jagodziński, P.P., 2005. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular & molecular biology letters*, 10(4), 631-47. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341272.

Vandenberg, L.N. et al., 2009. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews*, 30(1), 75-95. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074586.

Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J.A., 2008. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(11), 1545-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18469529.

Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), 1931-4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048652.

Vergouwen, R.P. et al., 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of reproduction and fertility*, 93(1), 233-43. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1920294.

Virtanen, H.E. & Toppari, J., 2008. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Human reproduction update*, 14(1), 49-58. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032558.

Volle, D.H. et al., 2009. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(12), 3752-64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19884658.

Voorhoeve, P.M. et al., 2006. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 124(6), 1169-81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16564011.

Vrba, L. et al., 2010. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PloS one*, 5(1), e8697. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20084174.

Wakui, S. et al., 2007. Spermatogenesis in aged rats after prenatal 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure. *Toxicology*, 238(2-3), 186-91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681414.

Walczak-Jedrzejowska, R. et al., 2007. During seminiferous tubule maturation testosterone and synergistic action of FSH with estradiol support germ cell survival while estradiol alone has pro-apoptotic effect. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 45 Suppl 1, S59-64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292837.

Walschaerts, M. et al., 2008. Doubling of testicular cancer incidence rate over the last 20 years in southern France. *Cancer causes & control : CCC*, 19(2), 155-61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18236173.

Wang, H. et al., 2008. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer cell*, 14(5), 369-81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18977326.

Wang, L. et al., 2009. Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 24(3), 562-79. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19091803.

Wang, R. et al., 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocrine reviews*, 30(2), 119-32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176467.

Wang, S. et al., 2008. Critical role of deltaDNMT3B4/2 in regulating RASSF1A promoter-specific DNA methylation in non-small cell lung cancer. *Chinese medical journal*, 121(17), 1712-21. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19024105.

Watanabe, D. et al., 2004. Expression of Dnmt3b in mouse hematopoietic progenitor cells and spermatogonia at specific stages. *Gene expression patterns : GEP*, 5(1), 43-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15533817.

Webster, K.E. et al., 2005. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(11), 4068-73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753313.

Weisenberger, D.J. et al., 2002. Identification and characterization of alternatively spliced variants of DNA methyltransferase 3a in mammalian cells. *Gene*, 298(1), 91-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406579.

Weisenberger, D.J. et al., 2004. Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Molecular cancer research : MCR*, 2(1), 62-72. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757847.

Williams, K. et al., 2001. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Human reproduction update*, 7(3), 236-47. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11392370.

Winter, J. et al., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11(3), 228-34. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255566.

Wirth, J.J. et al., 2008. A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality. *Systems biology in reproductive medicine*, 54(3), 143-54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18570050.

Wisniewski, A.B. et al., 2003. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *The Journal of urology*, 169(4), 1582-6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629420.

Wohlfahrt-Veje, C., Main, K.M. & Skakkebæk, N.E., 2009. Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. *Clinical endocrinology*, 71(4), 459-65. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19222487.

Wolf, C.J. et al., 2000. Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 55(1), 152-61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10788570.

Wood, H.M. & Elder, J.S., 2009. Cryptorchidism and testicular cancer: separating fact from fiction. *The Journal of urology*, 181(2), 452-61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084853.

Wylie, C., 1999. Germ cells. *Cell*, 96(2), 165-74. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988212.

Xu, B. et al., 2009. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *The Prostate*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19902466.

Xu, R., 2009. Molecular epigenetics: dawn of a new era of biomedical research. *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences*, 52(4), 309-10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19381456.

Yakovlev, A. et al., 2010. Epigenetic regulation of caspase-3 gene expression in rat brain development. *Gene*, 450(1-2), 103-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909801.

Yamada, S. et al., 2004. Gene expression profiling identifies a set of transcripts that are up-regulated inhuman testicular seminoma. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 11(5), 335-44. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15747581.

Yamagata, K. et al., 2009. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Molecular cell*, 36(2), 340-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854141.

Yamamoto, M. et al., 2007. Effects of maternal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) or 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB169) on testicular steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring rats. *Journal of andrology*, 26(2), 205-14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713826.

Yaman, R. & Grandjean, V., 2006. Timing of entry of meiosis depends on a mark generated by DNA methyltransferase 3a in testis. *Molecular reproduction and development*, 73(3), 390-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16362968.

Yan, N. et al., 2007. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction (Cambridge, England)*, 134(1), 73-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641090.

Yanagisawa, Y. et al., 2002. The human DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B have two types of promoters with different CpG contents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1577(3), 457-465. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167478102004827.

Yang, J. et al., 2007. Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 21(4), 558-65. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17161578.

Yang, J.Y. et al., 2007. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 24(3-4), 381-7.

Yasuda, Y. et al., 1985. Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice. *Teratology*, 32(2), 219-27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4049280.

Yasuda, Y., Kihara, T. & Tanimura, T., 1985. Effect of ethinyl estradiol on the differentiation of mouse fetal testis. *Teratology*, 32(1), 113-8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4035583.

You, L. & Sar, M., 1998. Androgen Receptor Expression in the Testes and Epididymides of Prenatal and Postnatal Sprague-Dawley Rats. *Endocrine*, 9(3), 253-262. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221590.

Yu, W.J. et al., 2004. Reproductive disorders in pubertal and adult phase of the male rats exposed to vinclozolin during puberty. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 66(7), 847-53. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15297758.

Zama, A.M. & Uzumcu, M., 2009. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology*, 150(10), 4681-91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589859.

Zhang, Q. et al., 2006. STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. *Blood*, 108(3), 1058-64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16861352.

Zhu, J., 2009. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual review of genetics*, 43, 143-66. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659441.

Zinedine, A. et al., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(1), 1-18. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045381.

de Rooij, D.G., 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(3), 347-54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226060.

van der Heijden, G.W. & Bortvin, A., 2009. Transient relaxation of transposon silencing at the onset of mammalian meiosis. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 4(2), 76-9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19252417.

Annexes

Oncogene (2007), 1–10
© 2007 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/07 $30.00
www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE

Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell

L Léotoing[1], L Meunier[2], M Manin[1], C Mauduit[2], M Decaussin[2], G Verrijdt[3], F Claessens[3], M Benahmed[2], G Veyssière[1], L Morel[1] and C Beaudoin[1]

[1]*UMR 6547 CNRS—Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II, Aubière cedex, France;* [2]*U 407 INSERM—Faculté de Médecine Lyon Sud, Oullins cedex, France and* [3]*Molecular Endocrinology Laboratory, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium*

The promotion and progression of prostate cancer (PCa) are associated with androgen receptor (AR) signalling. AR functions are modulated by a variety of co-factors amongst which we identified the nucleophosmin (NPM/B23), a member of the histone chaperone family. Here, we show that NPM is overexpressed in PCa compared to normal adjacent tissues. AR and NPM interact *in vitro* and *in vivo*, and NPM is critical for androgen-dependent transcriptional activation in LNCaP cells as an anti-NPM siRNA downregulates transcription of a transfected androgen response element (ARE)-containing reporter promoter as well as expression of the endogenous androgen responsive *prostate-specific antigen (PSA)* gene. By investigating the effect of NPM on AR, we have also observed that NPM enhances AR binding to an ARE *in vitro* in electrophoretic gel mobility-shift assay experiments. Chromatin immunoprecipitation studies further demonstrated that both AR and NPM associate with AREs of the *PSA* gene *in vivo*. Altogether, our data suggest that the molecular histone chaperone NPM could regulate AR functions by promoting assembly of AR-containing regulatory complexes and that high levels of NPM might alter AR functions in PCa.
Oncogene advance online publication, 26 November 2007; doi:10.1038/sj.onc.1210942

Keywords: nucleophosmin/B23; androgen receptor; transcription and prostate cancer

Introduction

The development and progression of prostate cancer (PCa) is mainly promoted by a deregulation in androgen signalling (Hsing *et al.*, 2000). The effects of androgens are mediated by the androgen receptor (AR) and when PCa progresses to metastatic carcinomas, patients are treated in order to decrease the circulating level of androgens and to inhibit the transcriptional activities of AR. Nevertheless, the disease often escapes from hormonal treatment and gains an androgen-independent growth phase where paradoxically, the AR signalling pathway can still remain active and promote tumour growth through molecular mechanisms that have yet to be clarified. Upon binding to DNA regions containing the androgen response element (ARE), the AR either up- or down-regulates gene expression in response to androgens. This ability of the AR to affect transcription relies on its interaction with co-activators and co-repressors depending on whether they enhance or inhibit AR transcriptional activities (Heinlein and Chang, 2002; Wang *et al.*, 2005). Type I co-regulators function primarily by facilitating AR binding to DNA, remodelling chromatin and/or recruiting general transcription factors associated with the RNA polymerase II holocomplex (Lemon and Tjian, 2000), whereas type II co-regulators enable the proper folding of AR, control its trafficking and/or influence its ligand-binding activity (Hu *et al.*, 2004). Interestingly, molecular chaperones were also shown to interact physically and functionally with steroid receptors and thus to contribute to hormone binding. Recent studies revealed supplementary functions of molecular chaperones through which they may promote association of steroid receptors with hormone response element along with co-activators within the promoter region of target genes (reviewed in Morimoto, 2002).

Molecular chaperones are thought to function by dual mechanism by targeting chromatin remodelling through histone modifications and by acting as transcriptional intermediaries between the activation domains of steroid receptors and general transcription factors. Our laboratory has recently identified the molecular chaperone nucleophosmin (NPM/B23/NO38/numatrin) as a novel AR-interacting protein (Léotoing *et al.*, unpublished data). NPM is a nuclear protein that shuttles between the nucleolus and the cytoplasm (Szebeni *et al.*, 1995). Firstly reported to play a role in ribosome assembly (Savkur and Olson, 1998), it has also been shown to bind to histones, to mediate nucleosome formation and to relax chromatin (Okuwaki *et al.*, 2001). Furthermore, NPM is known to interact with the tumour suppressor proteins p53, Rb and p19^{ARF} (Takemura *et al.*, 1999; Colombo *et al.*, 2002; Bertwistle *et al.*, 2004) and to bind to several cellular and viral proteins as well as

Correspondence: Professor L Morel, UMR 6547 CNRS—Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II, 24 Avenue des Landais, Aubière Cedex 63177, France.
E-mail: laurent.morel@univ-bpclermont.fr
Received 29 August 2007; revised 12 October 2007; accepted 17 October 2007

transcription factors including YY1, NFκB and AP2α (Inouye and Seto, 1994; Dhar *et al*., 2004; Liu *et al*., 2007). NPM appears to be much more abundant in tumour cells and in proliferating cells compared to normal cells and is proposed to play a crucial role in transcriptional regulation (Bertwistle *et al*., 2004).

In this communication, we show that NPM is highly co-expressed with the AR in secretory epithelial cells of localized PCas. Using co-immunoprecipitation, we clearly demonstrated that NPM and AR interact *in vivo* in PCa lymph node carcinoma of the prostate (LNCaP) cells and knocking-down of NPM by RNA interference markedly reduced transcription from the androgen-responsive *prostate-specific antigen (PSA)* gene. We also showed that NPM strongly binds to the DNA-binding domain (DBD)/hinge domain of AR *in vitro* and that the NPM protein facilitates AR binding to its consensus ARE. Chromatin immunoprecipitation studies indicate that NPM is delocalized from the genomic AREs in a hormone-dependent manner *in vivo* while the AR is targeted to the same response elements. This suggests that NPM might participate in the assembly of transcriptional regulatory complexes by making way for AR and its co-activators to be recruited to the nucleus and to interact with the AREs. Taken together, our findings suggest that NPM might function to enhance the action of the AR and play an important co-regulatory role in PCa.

Results

NPM is overexpressed in PCa tissue

To evaluate NPM expression in PCa, several tumours and adjacent normal tissues from prostate were analysed by western blotting. Micro-biopsies from six human patients undergoing radical prostatectomy revealed that NPM is overexpressed in tumours, the mean value of NPM quantification being fivefold higher in the tumour tissue compared with the normal adjacent tissue (Figure 1a). Of great interest, this observation is found in conjunction with an eightfold overaccumulation for AR in neoplastic prostate tissue sections (Figure 1a, right graph). No such change was observed for β-3-tubulin, which is preferentially expressed in the epithelial compartment (Ranganathan *et al*., 1997) indicating thus that the increased levels of both NPM and AR in tumour samples are not due to a higher epithelial content. To determine which specific types of prostate cells express NPM, immunohistochemistry using an anti-NPM antibody was carried out on 50 paraffin embedded sections of clinically characterized human PCas treated or not with hormonal therapy. NPM was found predominantly confined to the nucleus of both prostate stromal and epithelial cells (Figure 1b) and for all the patients studied, the intensity of the staining only varied in epithelial tumour cells where it was found higher than in the surrounding normal

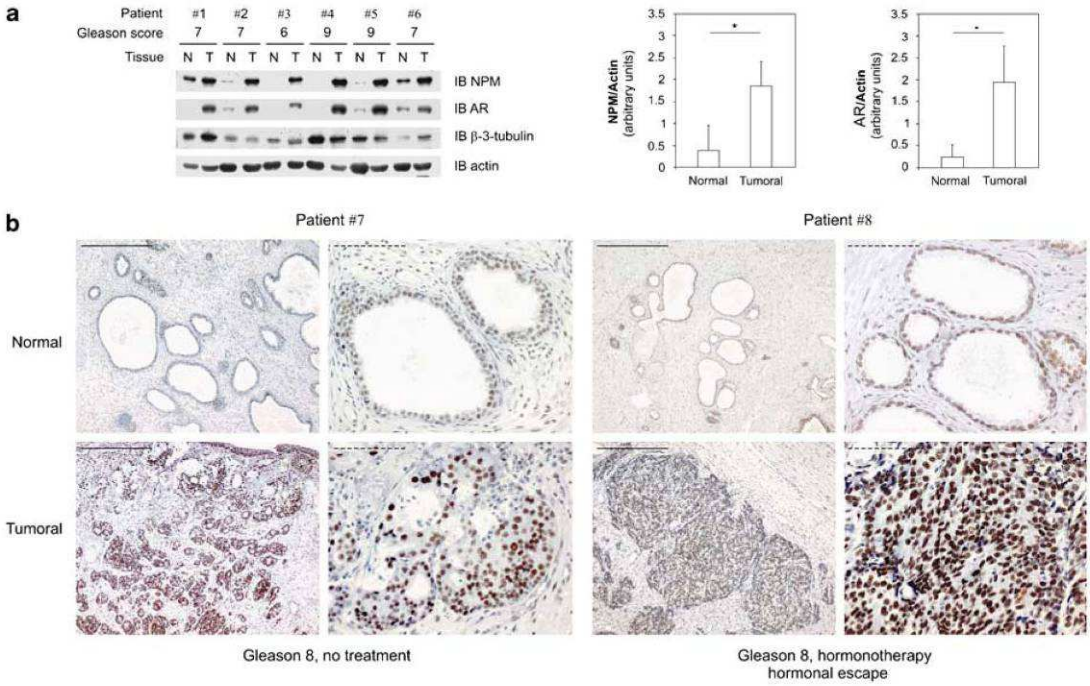


Figure 1 Nucleophosmin (NPM) is overexpressed in prostate cancer (PCa) biopsies. (**a**) Androgen receptor (AR) and NPM are overexpressed in PCa tissues. Micro-biopsies from normal (N, all the tissue is non-tumoral) and adjacent tumoral (T, all the tissue is tumoral) tissues were realized on six different patients after radical prostatectomy and then AR and NPM levels were analysed using western blotting. Histograms show the band quantification reported to the actin level ($*P<0.01$). The β-3-tubulin is used as a marker of the epithelial compartment. (**b**) *NPM immunostaining in normal and adjacent tumour tissues*. Paraffin-embedded sections of prostate tumours were immunostained with NPM. Full scale bars correspond to 400 μm and hatched scale bars to 100 μm.

epithelium (Figure 1b). Indeed, all of the adenocarcinoma examined exhibited strong and extensive staining for NPM with no evident differences between high compared to low Gleason patterns. Moreover, we also found that prostate carcinoma with a high proportion of NPM overexpressing cells also present a higher level of AR immunostaining in the nuclear compartment of the secretory epithelial cells (Supplementary Figure 1).

AR and NPM interact in PCa cells in vivo *and* in vitro
Our finding that NPM and AR are co-expressed at high levels in the nuclear compartment of the human prostate gland tumours suggests that NPM could interact and regulate the transcriptional activity of AR in PCa. To determine whether NPM associates with AR *in vivo*, whole cell lysates (CL) prepared from LNCaP PCa cells were immunoprecipitated with normal rabbit IgG or an anti-NPM polyclonal antibody. As shown in Figure 2a, the AR protein was detected only when the anti-NPM antibody was used, in the presence or in the absence of androgens. As expected, an anti-AR antibody also co-immunoprecipitates NPM (Figure 2b). This finding was corroborated using PC3 cells transfected for AR (Supplementary Figure 2). These data indicate that both AR and NPM can reside within a same protein complex.

To test whether AR and NPM interact physically and to further localize their binding domains, we generated glutathione *S*-transferase (GST)-AR and GST–NPM fusion proteins. Using *in vitro*-synthesized (IVS) hemagglutinin (HA)-tagged NPM, we found that the DBD/

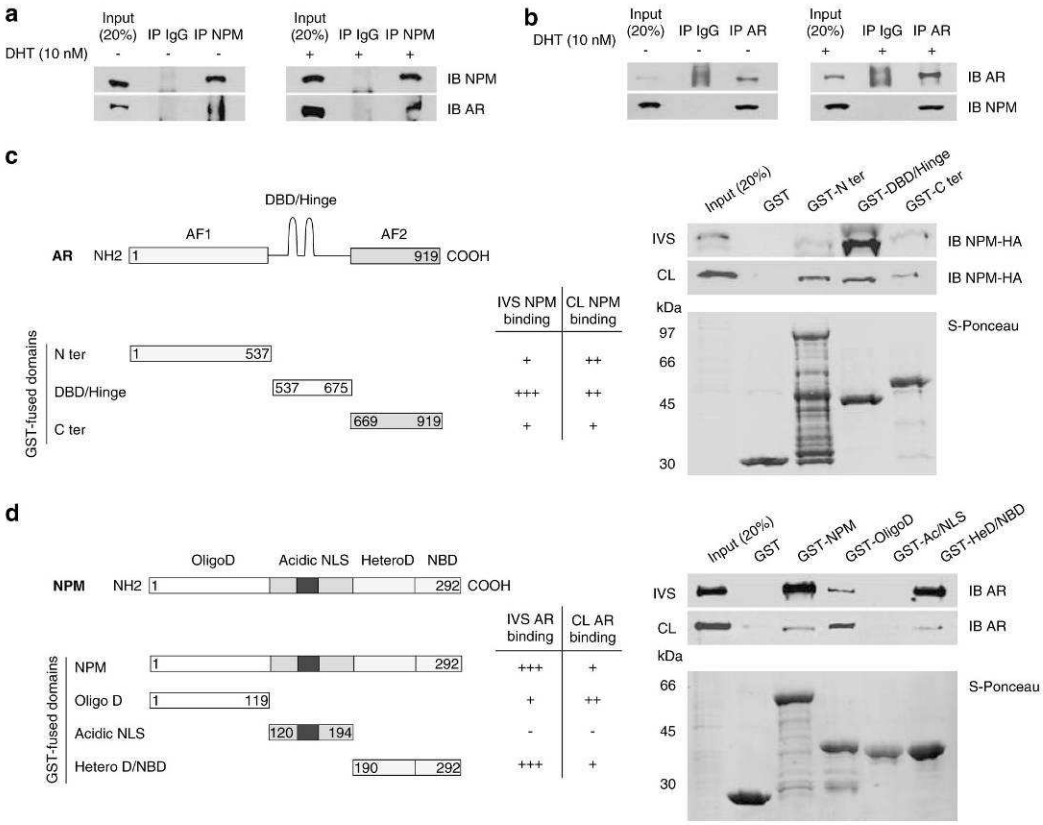


Figure 2 The androgen receptor (AR) interacts with nucleophosmin in prostate cancer cells. (**a**) AR immunoprecipitation. Lymph node carcinoma of the prostate (LNCaP) cells were cultured for 36 h in the absence or in the presence of 10 nM dihydrotestosterone. Cell lysates were immunoprecipitated using anti-AR (IP AR) or IgG (IP IgG) as a control and the immune complexes were analysed by western blotting with anti-AR and anti-nucleophosmin (NPM) antibodies. (**b**) Nucleophosmin immunoprecipitation. Using the same LNCaP cell lysates, proteins were immunoprecipitated with anti-NPM (IP NPM) or IgG (IP IgG) and analysed as described above. (**c** and **d**) Mapping of the AR and NPM interaction domains. HA-tagged NPM and AR were obtained either by *in vitro* synthesis (IVS) or from transfected PC3 cells (CL). In (**c**) HA-tagged NPM was subjected to *in vitro* pull-down assay against N-terminal (N ter), DNA-binding domain/Hinge region (DBD/Hinge) and C-terminal (C ter) domains of AR fused to glutathione *S*-transferase (GST). In (**d**) AR was subjected to *in vitro* pull-down assay against full length (NPM), oligomerization-domain (OligoD), acidic/nuclear localisation signal (Ac/NLS) domain and heterodimerization-domain/nuclear-binding domain (HeteroD/NBD) of NPM fused to GST. The bound NPM–HA or AR complexes were analysed by western blotting with an anti-hemagglutinin (HA) or anti-AR antibodies. In (**a–d**) a fraction (1/5) of the proteins used in the binding reactions was loaded as input and GST alone was used as a negative control (**c** and **d**). The equal loading of GST fusion proteins was controlled with S-Ponceau.

Hinge domain of AR was strongly associated with NPM while the binding capacities for NPM of both N- and C-terminal domains of AR are lower in the same conditions (Figure 2c). Interestingly, the three domains of the AR bind equally well to NPM in GST pull-down assays when total CL prepared from PC3 cells expressing the HA-tagged NPM protein were used. The latter result suggests that other proteins are probably involved in this AR–NPM interaction. In addition, Figure 2d showed that AR binds to full-length NPM as well as to both the oligomerization-domain (OligoD) and the heterodimerization-domain/nuclear-binding domain (HeteroD/NBD). Deletion of these two regions abolished the interaction of NPM with AR indicating that the acidic/nuclear localisation signal (Ac/NLS) domain of NPM is not sufficient for binding to AR. Altogether, these data indicate that AR and NPM interact *in vitro* through multiple domains and that other proteins seem to modulate this interaction *in vivo*.

NPM is important for androgen-dependent gene expression in PCa cells

NPM has already been shown to modulate transcription following protein–protein interactions with several transcription factors (Colombo *et al*., 2002; Maiguel *et al*., 2004; Weng and Yung, 2005). Using RNA interference, we therefore investigated the role of NPM in regulating transcription of the endogenous androgen-responsive *PSA* gene. NPM siRNA was transfected in LNCaP cells cultured with or without dihydrotestosterone (DHT) and *PSA* mRNA levels were measured via reverse transcription real-time PCR following normalization to β-actin expression. NPM knockdown resulted in a 30% decrease in the *PSA* mRNA level and in a 50% decrease in the PSA protein after a 48 h exposure to DHT when compared to a control siRNA (Figure 3a). Similar to the findings in Figure 3a, loss of NPM reduced DHT-stimulated transcription of the PSA-luciferase reporter gene by about fivefold (Figure 3b). Although NPM was described as a key factor in rRNA processing (Savkur and Olson, 1998), the decreased DHT-dependent transcription we observed is unlikely the result of a general effect on transcription since expression of a CMV-driven luciferase reporter gene was unaffected by the reduction of NPM (Supplementary Figure 3). To investigate the role of NPM in the function of other nuclear hormone receptors, we performed similar studies with the class II nuclear receptor LXR. In contrast with AR, NPM knockdown had no effect on the transcriptional activity of LXR using an AKR1B7-luciferase reporter gene (Volle *et al*., 2004) indicating that NPM cannot influence the activity of all members of the nuclear receptor gene family. To elucidate the mechanisms by which NPM controls AR transcription activity, we further tested the ability of Gal4–DBD chimera proteins containing either the N- or C-terminal domains of AR to activate a reporter gene driven by an UAS containing promoter. Notably, the Gal4–DBD/AR N-term increased the activity of the UAS promoter in control cells (Figure 3c, left panel) and transfection of NPM siRNA did not alter this activity. Moreover, NPM siRNA transfection did not modify the UAS-luciferase activity of Gal4–DBD/AR C-term in response to DHT either (Figure 3c, middle panel). We next investigated whether NPM could regulate AR DNA binding as NPM interacts mainly with the DNA-binding and hinge domains of AR. To do so, we analysed the effect of a NPM knockdown on the ability of the AR–DBD/Hinge chimera protein fused to the VP16 transactivation domain to activate a PSA-luciferase reporter gene. As shown in Figure 3c (right panel), the transfection of the AR–DBD/hinge/VP16 resulted in an increase of the PSA-luciferase reporter gene in control cells. Of interest, transfection of NPM siRNA significantly reduced luciferase activity in these conditions, suggesting that NPM could control AR transcriptional activity by enhancing its DNA-binding capacity rather than its transactivation functions.

NPM protein increases AR-binding activity for AREs in vitro

To test our hypothesis that NPM could modulate androgen-dependent transcription through enhanced AR DNA binding, we performed electrophoretic gel mobility-shift assays (EMSA) using the distal ARE of the AKR1B7 promoter (Fabre *et al*., 1994). Our data showed that AR–DBD/Hinge fused to GST was capable to bind to an ARE while either GST or GST-fused to NPM did not (Figure 4a). Interestingly, addition of NPM increases in a dose-dependent manner the AR–DBD/Hinge-binding affinity by approximately three- to fourfold. NPM did not seem to be retained as a stable component of the complexes as the addition of NPM did not result in a shift and the complexes are not efficiently super-shifted by an anti-NPM antibody (Figure 4b). Similar results were obtained when purified His_6-tagged NPM proteins were used (Supplementary Figure 4). To supply further evidences that NPM enhances AR binding to its response element, we tested the capacity of the Ac/NLS domain of NPM, which is unable to interact with AR *in vitro* (Figure 2c), to influence DNA binding of the AR. As observed, the full length NPM increased the AR DNA-binding activity by about twofold (Figure 4d, lanes 5, 6) but, neither the GST alone (lanes 2, 3), and more importantly nor the Ac/NLS domain of NPM fused to GST (lanes 7, 8) were able to improve AR binding. Altogether, these results clearly demonstrate the ability of NPM to mediate a stronger binding affinity of the AR for its cognate sites. This could represent a way by which NPM controls AR activity.

NPM and AR interact with AREs of the PSA promoter in vivo

In real-time PCR analyses, we showed that the DHT-induced accumulation of PSA mRNA is significantly reduced in PCa LNCaP cells when NPM is knocked-down. These cells were therefore used to determine the DHT-induced occupancy of the AREs at the promoter-proximal region (ARE I and ARE II) and at the

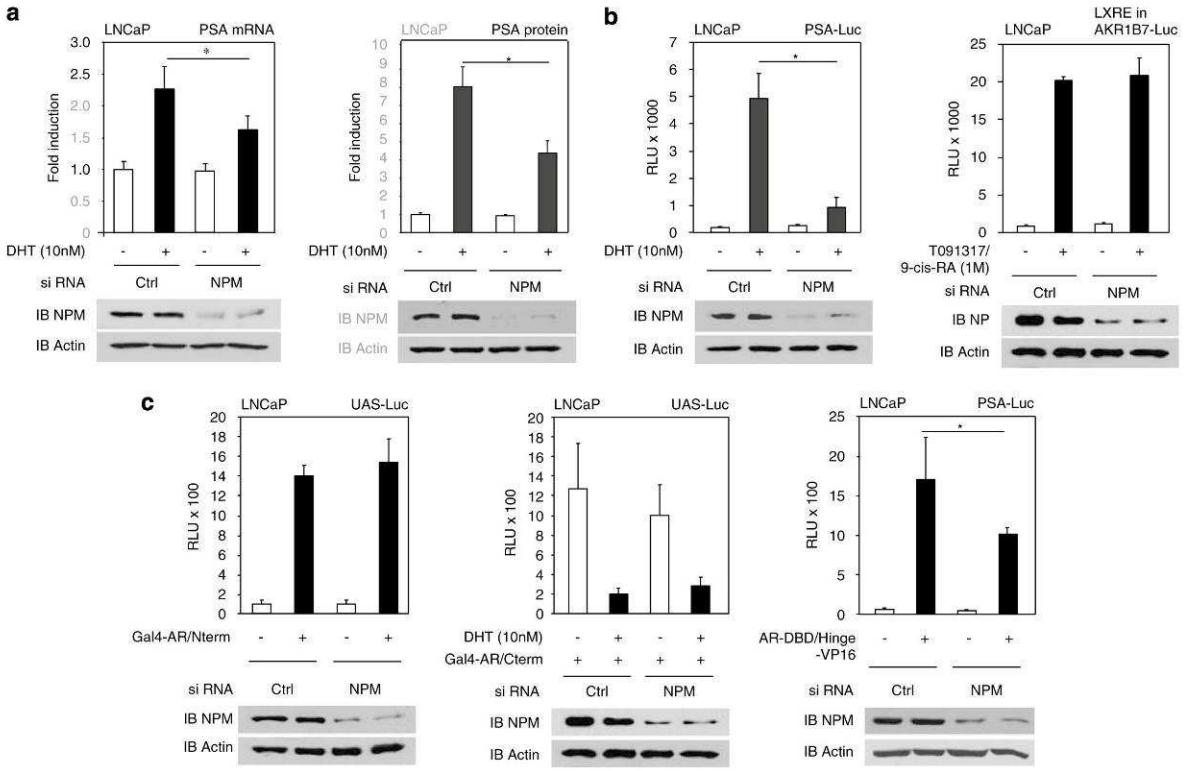


Figure 3 Nucleophosmin regulates AR transcriptional activity. (**a**) NPM siRNA downregulates androgens-induced prostate-specific antigen (PSA) levels. Lymph node carcinoma of the prostate (LNCaP) cells were transfected with 100 nM control siRNA or specific NPM siRNA. Twelve hours after transfection, cells were incubated for additional 36 h with or without 10 nM dihydrotestosterone (DHT). mRNAs for NPM and β-actin were analysed using quantitative PCR. The histograms show the densitometric analysis of PSA mRNA levels normalized using β-actin mRNA levels (*$P<0.01$). Cell lysates were analysed by western blotting with indicated antibodies. Actin was used as a loading control. The histograms show the densitometric analysis of PSA protein expression levels (*$P<0.01$). (**b**) Nucleophosmin regulates AR transcriptional activities. LNCaP cells were co-transfected with 100 nM control siRNA or specific NPM siRNA and with a *PSA*–Luc reporter plasmid (left panel). After 12 h, the cells were treated for 36 h with or without 10 nM DHT. NPM knockdown effect on androgen-regulated promoter activity was evaluated by measuring the luciferase activity (*$P<0.01$). As a control of nuclear receptor specificity (right panel), LNCaP cells were co-transfected with 100 nM control siRNA or specific NPM siRNA, with LXRα, RXR expression vectors and the AKR1B7/LXRE–Luc reporter plasmid, then after 12 h, treated for 36 h with or without 1 μM T091317 and 9-cis-retinoic acid. The data shown are representative of at least three independent triplicate experiments. (**c**) NPM regulates AR DNA-binding activity. LNCaP cells were transfected with Gal4–DBD fused to AR amino (N-term., left panel) or carboxyl (C-term., middle panel) terminal domains constructions and a reporter driven by an UAS containing promoter, or with a AR DBD/hinge/VP16 and a PSA–Luc reporter (right panel), in the presence of 100 nM control siRNA or 100 nM specific NPM siRNA. After 12 h, cells were treated for 36 h with or without 10 nM DHT. NPM knockdown effect on androgen-regulated promoter activity was evaluated by measuring the luciferase activity (*$P<0.01$). The data shown are representative of at least three independent triplicate experiments.

enhancer region (ARE III) of the *PSA* gene. In the absence of DHT, low levels of AR were bound to chromatin. After 2 h of hormone treatment, we observed an increased occupancy of AR at the enhancer region containing ARE III and to a lesser degree at both AREs of the proximal promoter region (Figure 5b); the extent of these increases was, respectively, 15- and 8-fold greater than the average changes measured at the two control segments that lack functional AREs, namely, the 3′-untranslated region of the *PSA* gene (3′NT) and the β-actin promoter as already reported (Kim *et al.*, 2003). Interestingly, NPM was associated with all three AREs in the absence of hormone with a higher level of recruitment on the ARE I located within the proximal promoter region (Figure 5c). This agrees with the recent reports on NPM DNA-binding affinity and its histone chaperone activity (Hingorani *et al.*, 2000; Okuwaki *et al.*, 2001). Unexpectedly, the signal representing the level of NPM at the response elements was reduced specifically by more than twofold after hormone treatment as already reported for another molecular chaperone namely Bag-1L (Shatkina *et al.*, 2003). As proposed by Shatkina *et al.* for Bag-1L, NPM might act by making a way for AR and other co-activators that are recruited to the nucleus by the hormone to interact.

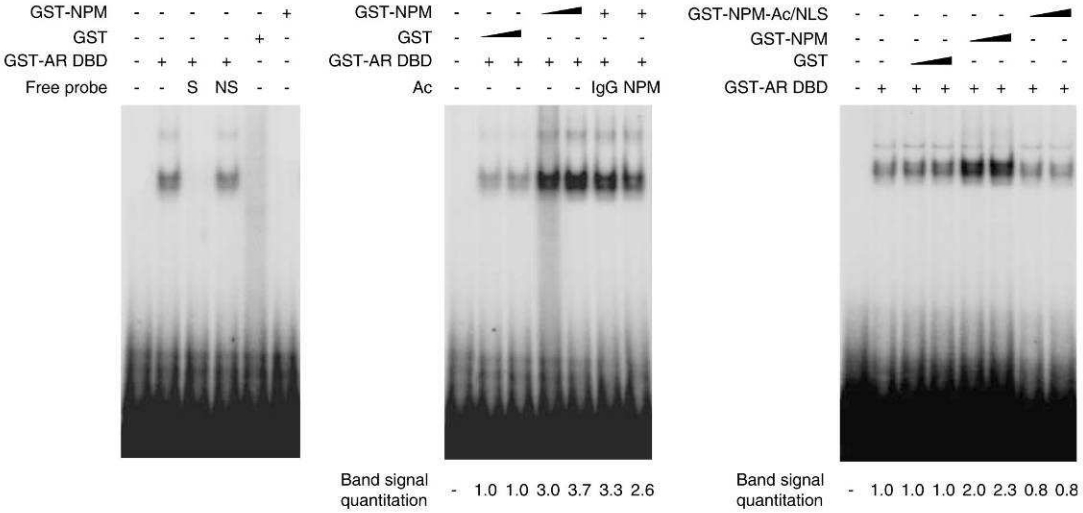


Figure 4 Nucleophosmin increases the DBD activity of AR. The effect of NPM or NPM domains on the binding properties of GST–AR DBD/hinge was evaluated by gel-shift experiments. The ^{32}P labelled double stranded oligonucleotide probe corresponding to the AREd of AKR1B7 promoter was incubated with 200 ng of GST–AR DBD/hinge fusion protein alone or with 100–250 ng GST or with 100–250 ng GST–NPM fusion protein. Specificity was checked by adding cold specific (S) or non-specific (NS) oligonucleotide competitors as a 100-fold molar excess (left panel). When indicated, unspecific antibody (IgG) or specific NPM antibody (NPM) was added to the binding reaction (middle panel). The GST–NPM Ac/NLS fusion protein (right panel) only contains the central acidic domain of NPM that was shown unable to bind to AR (see Figure 2). The Coomassie blue staining of all the proteins used in gel-shift assays is presented in Supplementary Figure 4.

Discussion

The assembly of macromolecular complexes represents a key step in the regulation of gene expression and different combinations of molecular chaperones were shown to govern steroid receptor functions in response to hormone. Recent studies have shown that molecular chaperones may modulate the transactivation functions of nuclear receptors at the level of their interaction with DNA, in addition to their role in providing the ligand-binding pocket with the correct conformation (Morimoto, 2002). In this communication, we show that the molecular chaperone NPM is overexpressed together with AR in the localized human PCas biopsies we examined, that both proteins interact *in vitro* and *in vivo*, and that NPM modulates the activity of the AR by regulating its binding to AREs. Our data indicate that NPM is a potential factor involved in tumour progression through AR signalling pathway.

Mapping of AR-interacting domains with NPM revealed that the interaction is mainly supported by the DBD/hinge region of the receptor. Concomitant with this observation, analyses of AR DNA binding by EMSA show that NPM elicits a several fold increase in AR binding to its response element. Moreover, our results also demonstrate that the Ac/NLS fragment of NPM, which does not interact with AR, has no effect on the receptor binding to DNA, further indicating that the NPM–AR interaction could be important for androgen-enhanced transcriptional activation. Nevertheless, it is interesting to notice that the presence of NPM did not affect the mobility of the complexes and that the use of an anti-NPM antibody did not result in the supershift of the retarded protein–DNA complex as would have been expected if NPM was present in the complex. Similar findings have already been reported for the high-mobility group box 1 (HMGB1) protein which facilitates the DNA binding of several steroid receptors, including AR, without being present in the DNA/receptor complex in EMSA experiments (Boonyaratanakornkit *et al*., 1998; Verrijdt *et al*., 2002). In a general hit-and-run mechanism, the authors have suggested that the HMGB1 protein might be a transient and unstable component of the steroid receptor/steroid response element complex that does not take part in the interactions within the final transcription activation complex. This hit-and-run mechanism is consistent with our chromatin immunoprecipitation studies where occupancy of the AREs on an androgen-responsive gene by NPM is disrupted *in vivo* by hormone whereas AR is selectively recruited to its response elements. We thus hypothesize that NPM might act to recruit AR to its response elements in a suitable conformation to activate androgen-dependent transcription along with a variety of co-regulatory proteins.

Regulation of chromatin transcription is a complex phenomenon that involves the sequential remodelling of chromatin followed by the recruitment of the general transcription machinery to the promoter. Ligand-induced AR activity is enhanced by p300 and mutation of the AR acetylated motif abrogates p300 and DHT-stimulated activity (Fu *et al*., 2000). Knowing that the

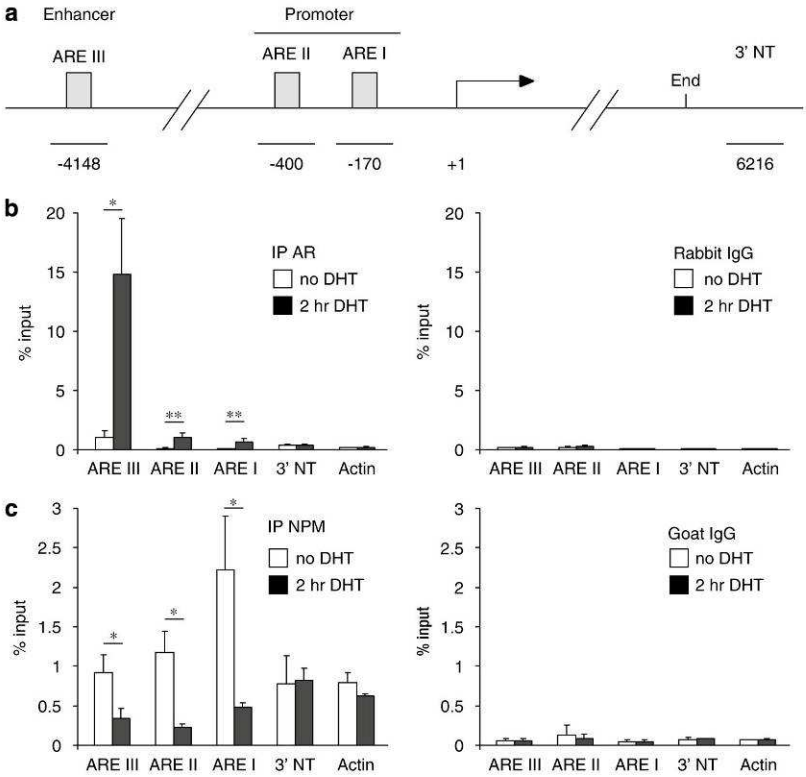


Figure 5 *In vivo* recruitment of NPM and AR on the androgen response elements (AREs) of the *prostate-specific antigen (PSA)* promoter. (**a**) Schematic representation of the three *PSA* promoter AREs and location of the 3′ non-transcribed region (3′NT) used as a control of AR interaction specificity. (**b** and **c**) DNA ChIP experiments showing AR and NPM occupancies on *PSA* promoter AREs. Lymph node carcinoma of the prostate (LNCaP) cells were cultured in phenol red-free RPMI medium supplemented with 5% charcoal-stripped fetal bovine serum for 72 h, then treated with or without 10 nM dihydrotestosterone (DHT) for two additional hours. After cross-linking and sonication, AR (**b**) and NPM (**c**) were immunoprecipitated and their occupancy on the different *PSA* promoter AREs were analysed by amplifying the corresponding regions using quantitative real-time PCR (left panels). The 3′NT and a fragment on the actin promoter were used to check the specificity of AR and NPM bindings. For each antibody, the corresponding IgG was used as a negative control of immunoprecipitation (right panels). (*$P<0.01$, **$P<0.05$). Data are representative of at least two independent IP and three independent PCR amplifications.

co-regulatory protein p300 is recruited *in vivo* on both the *PSA* promoter and enhancer in response to DHT (Kang *et al.*, 2004), acetylation appears to be an essential step in ligand-dependant activation of AR. Interestingly, p300 was recently shown to play a significant role in the acetylation of NPM that resulted in its association with histones, in the nucleosome disruption and in the subsequent activation of transcription (Swaminathan *et al.*, 2005). We can assume that p300 together with NPM might participate in the control of androgen-dependent transcription although the existence of a ternary complex of AR, NPM and p300 remains to be established.

It is noteworthy that NPM is not observed to influence the activity of class II nuclear receptor LXR, while it specifically influences the activities of the steroid hormone receptors AR, PR, ER and GR (our unpublished data). These two classes of receptors differ both in the structure of their DNA-binding domain and in the mechanism of DNA binding (Melvin and Edwards, 1999). Indeed, class II nuclear receptors are described bound to even in the absence of cognate ligand, while steroid receptors need hormone for nuclear translocation and subsequent DNA binding. The latter might involve steps that depend upon histone chaperones like NPM. Further studies will be required to analyse and link the effect of NPM on the DNA-binding capacity of the nuclear hormone receptor family and the enhancement of the receptors transcription activity.

In the light of our results, it therefore appears that the NPM–AR interaction may be linked to the regulation of gene expression by androgens during prostate carcinogenesis. Although there are controversial reports on NPM level in PCa (Bocker *et al.*, 1995; Subong *et al.*, 1999), our work brings clear data assessing NPM and AR overexpression in PCa compared to normal adjacent tissues. Immunohistochemistry studies demonstrated that a strong and extensive staining for NPM was found in neoplastic prostate tissues while it is present at lower levels in the basal and luminal epithelial cells. Interestingly, AR is also higher expressed in the same sections of adenocarcinomas. Considering the effect of NPM on

AR signalling demonstrated in our study, we propose that this deregulation could be a reason of aberrant activity of AR in such cells, taking part in prostate tumorigenesis. NPM exhibits the highest affinity for the AR–DBD/hinge region. The hinge region contains the NLS, and a short sequence that modulates the AR transactivation abilities by controlling the intramolecular N/C folding and the binding of co-activators of the p160 family (Haelens *et al*., 2007). NPM might then drive AR into the nucleus to ensure the receptor in a transcriptional competent state (Szebeni *et al*., 1995). Since this histone chaperone has such a nucleus-cytoplasm shuttling property that could regulate AR trafficking and cellular sublocalization, and that it could control AR transcription capacities, this alternative mechanism should be explored too.

In summary, our findings indicate that NPM is overexpressed in PCas and that this histone chaperone is important for androgen-dependent gene expression in PCa cells. We show that NPM facilitates AR DNA binding to its response elements and we suggest that the inter-relationship between AR and NPM and their effect on androgen-responsive genes may play a crucial role in PCa.

Materials and methods

Plasmid constructs and western blot antibodies are available as Supplementary Materials.

Cell culture, transient transfections and luciferase assays
PC3 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and gentamycin (50 μg ml^{-1}). LNCaP cells were maintained in phenol red-free RPMI 1640 medium containing FBS and gentamycin (50 μg ml^{-1}). 3×10^5 LNCaP cells per well were plated in six-well plates, and the next day transient transfections were performed in OPTI-MEM using Lipofectin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). For depletion of NPM, we used a combination of two siRNA duplexes: 5′-CCACAGAAAAAAGUAAAACTT-3′ and 5′-UGAUGA AAAUGAGCACCAGTT-3′. GFP siRNA duplex (5′-ACTA CCAGCAGAACACCCCTT-3′) was used as a control for the siRNA reactions. RNA duplexes (final concentration 100 pmol) were transfected into LNCaP cells (3×10^5 cells per well) in six-well plates using Metafecten (Biontex Laboratories, Martinariea/Planegg, Germany) or with Lipofectin when siRNA duplexes were co-transfected with other plasmids. After 12 h, the medium was replaced, and cells were treated with androgens, 9-cis-retinoic acid and T091317, or ethanol vehicle for 36 h. Cells were lysed and the luciferase activity was measured with the assay system from Yelen.

Subjects
For western-blotting studies, prostate tissue samples were obtained from six patients with a mean age of 64.1 years (range 53–73) who underwent radical prostatectomy from January 2002 to June 2005 at the Centre Hospitalier Lyon Sud. Immediately after prostate removal (delay <10 min) small pieces of tissues (at least six samples of tissues of 0.5–1 cc) were gross dissected by the pathologist, in the left, the right peripheral zone and in the transitional area. All fragments were snap-frozen and stored in liquid nitrogen until analysis. To determine whether the tissue was malignant or non-tumoural and to confirm the Gleason score, histological analysis of a frozen section was performed for each sample by the same pathologist before any extraction. The fragments fully constituted of tumoural glands were selected and named 'tumoural tissues'; samples that do not contain tumoural tissue were selected and named 'non-tumoural tissues'. Patients were included in the study when tumoural and non-tumoural tissue was found in the same biopsy. For immunohistochemical studies, the paraffin-embedded tissue sections were obtained from 50 cases of radical prostatectomy or endo-urethral resection. The fragments were either fixed in Bouin's liquid or neutral formol. All the cases were reviewed by a pathologist to confirm the malignancy and the Gleason Score. Tumours were classified as high grade when the Gleason score was 7 or higher and as low grade when the score was 6 or lower. The ethics committee of the medical faculty and the state medical board agreed to these investigations and an informed consent was obtained from all patients.

Western blot analysis
Human tissues were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen) and extracted according to the manufacturer's instructions. Whole-cell proteins were obtained by resuspending cells in high salt buffer (0.42 M NaCl, 20 mM Hepes (pH 8.0), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 1 μg ml^{-1} apoprotinin, 1 μg ml^{-1} leupeptin)) as described elsewhere (Léotoing *et al*., 2007). Proteins were analysed by western blotting using the indicated antibodies.

Immunohistochemistry
Paraffin blocks of fixed prostate tissues were sectioned at 5 μm. The sections were mounted on Superfrost plus glass slides, deparaffinized, hydrated and heated 20 min at 93–98 °C in citric buffer (10 mM, pH 6.0). Then, the Envision kit (Dako, Trappes, France) was used according to the manufacturer's recommendations. The sections were then incubated overnight at 4 °C with a rabbit polyclonal NPM antibody (1:50) (3542, Cell signalling, Ozymo, Saint Quentin en Yvelines, France). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, mounted in Faramount and evaluated by two independent pathologists.

GST pull-down experiments
Full-length NPM cDNA, the oligoD domain (1–120), the Ac/NLS domain (120–194) and the HeD/NBD domain (190–292) were subcloned into pGEX4T1 (Pharmacia Biotech, Orsay, France) in frame with the GST. The expression vectors containing the N-terminus, the DBD/hinge, the C-terminus part of AR fused with GST and the GST pull-down assay methodology were described elsewhere (Baron *et al*., 2004). The bound complexes were analysed by western blot and fusion proteins were stained with S-Ponceau.

Immunoprecipitation
LNCaP cells were harvested, washed in ice-cold PBS buffer and lysed in IP buffer (150 mM NaCl, 0.1% Triton, 50 mM Tris–HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA). Cell lysates were precleared with Protein–A/G Sepharose beads and then incubated with rabbit IgG or specific anti-AR (PG21) or anti-NPM (C19) antibodies conjugated with pre-equilibrated Protein–A/G Sepharose beads rotating 3 h at 4 °C. The beads were collected, washed with IP buffer and proteins were eluted by boiling in SDS-sample buffer, resolved on polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting.

Preparation of RNA and real-time quantitative PCR
Total cellular RNA was extracted using TRIzol reagent and reverse transcribed with random hexamers. Each sample was amplified using QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) in a Roche thermocycler. For PSA, the primers were 5′-GCATCAGGAACAAAAGCGTGA-3′ and 5′-CCTGAGGAATCGATTCTTCAG-3′ and for β-actin: 5′-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3′ and 5′-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3′.

Gel-shift assay electrophoretic mobility shift assay (EMSA in text)
Electrophoretic mobility-shift assays were performed as described (Darne *et al*., 1997). Radiolabelled probe was incubated with recombinant GST-tagged AR–DBD/hinge in binding buffer for 30 min on ice in the presence of increasing amount of GST or GST–NPM recombinants proteins. The motif used is the mouse AKR1B7 ARE (5′-TTAAAAGAACATGCTGCTCTAACCG-3′). A 100-fold excess of cold double stranded probe was used for the competition experiments and an oligonucleotide containing the AKR1B7 LXRα responsive element (5′-TTGAAAGGTCATCCAAGATGAACTGG-3′) was used as a nonspecific competitor. For the supershift assays, a polyclonal rabbit anti-NPM antibody was added and rabbit IgG were used as a negative control.

Chromatin immunoprecipitation assay
LNCaP cells (25×10^6) were cultured in medium supplemented with 5% charcoal stripped FBS for 72 h. Cells were treated with DHT for 2 h and proceeded as described (Kim *et al*., 2003). The precleared supernatant was immunoprecipitated by incubating at 4 °C overnight with anti-AR (PG21), anti-NPM (C19) or purified IgG, and immune complexes were obtained by incubating with protein A-Sepharose at 4 °C for 1 h. After purification, DNA samples were quantified by RT–PCR using the following primers: ARE I forward 5′-GGTGCATCCAGGGTGATCTA-3′ and reverse 5′-AAACCTTCATTCCCCAGGAC-3′; ARE II forward 5′-AGGGATCAGGGAGTCTCACA-3′ and reverse 5′-GCTAGCACTTGCTGTTCTGC-3′; ARE III forward 5′-GACAACTTGCAAACCTGCTC-3′ and reverse 5′-GATCCAGGCTTGCTTACTGT-3′. NT 3′- forward 5′-TGGCCTAGAGCCTCAGATGT-3′ and reverse 5′-TTCCAAGTACAGGGCTCACC-3′ and β-actin forward 5′-TCCTCCTCTTCCTCAATCTCG-3′ and reverse 5′-AAGGCAACTTTCGGAACGG-3′. One percent of soluble chromatin was processed in parallel without immunoprecipitation, and values obtained from this DNA were used to calculate immunoprecipitated DNA as percentage of input.

Densitometry and statistical analysis
Autoradiograms were scanned and densities were quantified using Quantity-One software (Bio-Rad). Values are expressed as mean ± s.d. Where appropriate, a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Fisher's *t*-test was conducted to analyse for differences between treatment. Statistical significance was determine at $^*P<0.01$ and $^{**}P<0.05$.

Acknowledgements

We are very grateful to J-P Saru, A de Haze for their technical assistance, A Bruhat for his pertinent advices for DNA ChIP. This work was supported by grants awarded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National du Cancer (grant PL06-125), Ligue Contre le Cancer Puy de Dôme and the Université Blaise Pascal (UBP). L Léotoing is recipient of a doctoral fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

References

Baron S, Manin M, Beaudoin C, Léotoing L, Communal Y, Veyssiere G *et al*. (2004). Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem* **279**: 14579–14586.

Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ. (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol* **24**: 985–996.

Bocker T, Bittinger A, Wieland W, Buettner R, Fauser G, Hofstaedter F *et al*. (1995). *In vitro* and *ex vivo* expression of nucleolar proteins B23 and p120 in benign and malignant epithelial lesions of the prostate. *Mod Pathol* **8**: 226–231.

Boonyaratanakornkit V, Melvin V, Prendergast P, Altmann M, Ronfani L, Bianchi ME *et al*. (1998). High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding *in vitro* and transcriptional activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **18**: 4471–4487.

Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* **4**: 529–533.

Darne CH, Morel L, Claessens F, Manin M, Fabre S, Veyssiere G *et al*. (1997). Ubiquitous transcription factors NF1 and Sp1 are involved in the androgen activation of the mouse vas deferens protein promoter. *Mol Cell Endocrinol* **132**: 13–23.

Dhar SK, Lynn BC, Daosukho C, St Clair DK. (2004). Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. *J Biol Chem* **279**: 28209–28219.

Fabre S, Manin M, Pailhoux E, Veyssiere G, Jean C. (1994). Identification of a functional androgen response element in the promoter of the gene for the androgen-regulated aldose reductase-like protein specific to the mouse vas deferens. *J Biol Chem* **269**: 5857–5864.

Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L *et al*. (2000). p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem* **275**: 20853–20860.

Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F. (2007). The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res* **67**: 4514–4523.

Heinlein CA, Chang C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* **23**: 175–200.

Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. (2000). Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* **275**: 24451–24457.

Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. (2000). International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* **85**: 60–67.

Hu YC, Yeh S, Yeh SD, Sampson ER, Huang J, Li P *et al*. (2004). Functional domain and motif analyses of androgen receptor coregulator ARA70 and its differential expression in prostate cancer. *J Biol Chem* **279**: 33438–33446.

Inouye CJ, Seto E. (1994). Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *J Biol Chem* **269**: 6506–6510.

Kang Z, Janne OA, Palvimo JJ. (2004). Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* **18**: 2633–2648.

Kim J, Jia L, Tilley WD, Coetzee GA. (2003). Dynamic methylation of histone H3 at lysine 4 in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Nucleic Acids Res* **31**: 6741–6747.

Lemon B, Tjian R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* **14**: 2551–2569.

Léotoing L, Manin M, Monte D, Baron S, Communal Y, Lours C *et al*. (2007). Crosstalk between androgen receptor and epidermal growth factor receptor-signalling pathways: a molecular switch for epithelial cell differentiation. *J Mol Endocrinol* **39**: 151–162.

Liu H, Tan BC, Tseng KH, Chuang CP, Yeh CW, Chen KD *et al*. (2007). Nucleophosmin acts as a novel AP2alpha-binding transcriptional corepressor during cell differentiation. *EMBO Rep* **8**: 394–400.

Maiguel DA, Jones L, Chakravarty D, Yang C, Carrier F. (2004). Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol Cell Biol* **24**: 3703–3711.

Melvin VS, Edwards DP. (1999). Coregulatory proteins in steroid hormone receptor action: the role of chromatin high mobility group proteins HMG-1 and -2. *Steroids* **64**: 576–586.

Morimoto RI. (2002). Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell* **110**: 281–284.

Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* **506**: 272–276.

Ranganathan S, Salazar H, Benetatos CA, Hudes GR. (1997). Immunohistochemical analysis of beta-tubulin isotypes in human prostate carcinoma and benign prostatic hypertrophy. *Prostate* **30**: 263–268.

Savkur RS, Olson MO. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA byprotein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* **26**: 4508–4515.

Shatkina L, Mink S, Rogatsch H, Klocker H, Langer G, Nestl A *et al*. (2003). The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Mol Cell Biol* **23**: 7189–7197.

Subong EN, Shue MJ, Epstein JI, Briggman JV, Chan PK, Partin AW. (1999). Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. *Prostate* **39**: 298–304.

Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK. (2005). Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol* **25**: 7534–7545.

Szebeni A, Herrera JE, Olson MO. (1995). Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* **34**: 8037–8042.

Takemura M, Sato K, Nishio M, Akiyama T, Umekawa H, Yoshida S. (1999). Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase alpha activity. *J Biochem (Tokyo)* **125**: 904–909.

Verrijdt G, Haelens A, Schoenmakers E, Rombauts W, Claessens F. (2002). Comparative analysis of the influence of the high-mobility group box 1 protein on DNA binding and transcriptional activation by the androgen, glucocorticoid, progesterone and mineralocorticoid receptors. *Biochem J* **361**: 97–103.

Volle DH, Repa JJ, Mazur A, Cummins CL, Val P, Henry-Berger J *et al*. (2004). Regulation of the aldo-keto reductase gene akr1b7 by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* **18**: 888–898.

Wang L, Hsu CL, Chang C. (2005). Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate* **63**: 117–130.

Weng JJ, Yung BY. (2005). Nucleophosmin/B23 regulates PCNA promoter through YY1. *Biochem Biophys Res Commun* **335**: 826–831.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc).

Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Gynécologie Obstétrique & Fertilité 34 (2006) 978–984
Gynécologie Obstétrique & Fertilité
http://france.elsevier.com/direct/GYOBFE/

Trente-septième Journée thématique de la SFEF (Paris, 18 mai 2006)

Effets à long terme des perturbateurs endocriniens environnementaux sur la fertilité masculine

Long-term effects of environmental endocrine disruptors on male fertility

C. Mauduit[a,b,*], A. Florin[a], S. Amara[a], A. Bozec[a], B. Siddeek[a], S. Cunha[a], L. Meunier[a], J. Selva[c], M. Albert[c], F. Vialard[c], M. Bailly[c], M. Benahmed[a]

[a] *Inserm U407, faculté de médecine Lyon-Sud, BP 12, 69 921 Oullins, France*
[b] *Laboratoire d'anatomie pathologique, centre hospitalier Lyon-Sud, 69 495 Pierre Bénite, France*
[c] *Service d'histologie–embryologie–cytogénétique et biologie de la reproduction, centre hospitalier Poissy – Saint-Germain-en-Laye, et UFR Paris–Île-de-France Ouest, 78303 Poissy, France*

Reçu le 10 juillet 2006 ; accepté le 11 août 2006
Disponible sur internet le 25 septembre 2006

Résumé

Différentes études épidémiologiques ont montré, au cours des 50 dernières années, une augmentation de l'incidence des cancers du testicule, des malformations congénitales de l'appareil reproducteur masculin — cryptorchidie et hypospadias —, associée à une détérioration probable de la production spermatique dans l'espèce humaine. Le syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT) a été proposé comme entité pathologique sous-jacente à ces trois perturbations. L'exposition à des composés chimiques présents dans notre environnement appelés perturbateurs endocriniens (PE) parce qu'ils modifient la production et/ou l'action des hormones endogènes serait à l'origine du SDT. Les PE sont présents dans notre environnement quotidien, c'est-à-dire dans les aliments et l'eau (à travers l'utilisation des herbicides et pesticides), les cosmétiques, les produits ménagers, etc. Des modèles expérimentaux ont été développés pour (i) établir un lien entre l'exposition aux PE et le SDT et (ii) identifier les mécanismes d'action qui entrent en jeu. Après un rappel sur les PE et après avoir souligné l'importance de la fenêtre d'exposition, quatre mécanismes identifiés seront décrits : (i) transmission intergénérationnelle (épigénétique), (ii) mort cellulaire programmée, (iii) altération du signal androgénique et (iv) rôle des cellules de soutien des cellules germinales. Pour conclure, nous tenterons de proposer quelques biomarqueurs qui pourraient être utilisés pour identifier, en pathologie testiculaire humaine, un lien avec une exposition intra-utérine aux antiandrogènes.
© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Several epidemiologic studies have demonstrated during the last 50 years an increased incidence in testis cancer, male genital tract malformations (cryptorchidism and hypospadias) and a decrease in sperm quality in men. These three pathologies seem to be linked and to belong to the testicular dysgenesis syndrome (TDS). It was suggested that TDS is a consequence of intra-uterine exposure to environmental compounds that disrupt the metabolism of native hormones. Such substances are so called endocrine disruptors (EDs). EDs are present in our daily environment such as food and water (through the use of pesticides), cosmetics, house-care products etc. Experimental models have been carried out to (i) establish a link between EDs exposure and SDT and (ii) identify the mechanisms that are involved in. After a brief definition of EDs and having underlined the importance of the window of exposure to EDs, several mechanisms will be described such as (i) intergenerational transmission (epigenetic), (ii) programmed cell death of testicular cells, (iii) modification of the androgenic signal and (iv) role of the germ cells-nourishing cells. To conclude, we will try to propose some biomarkers that would be useful to identify the potential link between fetal exposure to anti-androgenic EDs and male testicular pathology.
© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : mauduit@sante.univ-lyon1.fr (C. Mauduit).

1297-9589/$ - see front matter © 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.gyobfe.2006.08.010

Mots clés : Syndrome de dysgénesie testiculaire ; Perturbateur endocrinien ; Apoptose ; Cellules germinales ; Epigénétique ; Antiandrogène ; Oestrogéno-mimétique

Keywords: Testicular dysgenesis syndrome; Endocrine disruptors; Apoptosis; Germ cells; Epigenetic; Anti-androgene; Oestrogen-like

1. Introduction

De nombreuses études épidémiologiques indiquent une augmentation de l'incidence de plusieurs pathologies liées aux hormones sexuelles comme le cancer du sein, de la prostate, du testicule mais aussi des malformations congénitales de l'appareil reproducteur masculin (cryptorchidie, hypospadias) et une détérioration probable de la production spermatique dans l'espèce humaine. Si des controverses existent à propos de l'augmentation de l'incidence de ces deux dernières pathologies, des travaux récents menés sur les populations finlandaises et danoises, confortent cette hypothèse [1]. Ainsi, au Danemark, 4 % des enfants sont maintenant conçus par Assistance médicale à la procréation (AMP) et presque 1 % des Danois développera un cancer du testicule [2]. En France, une étude récente, menée à partir des neuf registres régionaux de cancer, a montré que l'incidence du cancer du testicule était passée de 3,17 en 1978 à 4,82 pour 100 000 en 2000 (taux standardisé sur la population mondiale [3]). Les questions soulevées par ces constatations sont : existe-t-il un lien entre ces différentes pathologies ? Quelle en est l'étiologie ?

2. Syndrome de dysgénésie testiculaire

Dès 2001, Skakkebæk [2] a proposé que l'augmentation de l'incidence des cancers testiculaires, des malformations congénitales de l'appareil reproducteur masculin et de la détérioration de la production spermatique serait liée. Le concept de syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT) a ainsi été proposé comme entité sous-jacente à ces pathologies (Fig. 1). Ces désordres de la sphère urogénitale mâle sont chacun des facteurs de risque pour les autres anomalies et auraient tous une origine commune pendant la vie intra-utérine. D'un point de vue biologique, ils résultent d'anomalies survenant au niveau des cellules de Sertoli ou de Leydig fœtales. Les conséquences

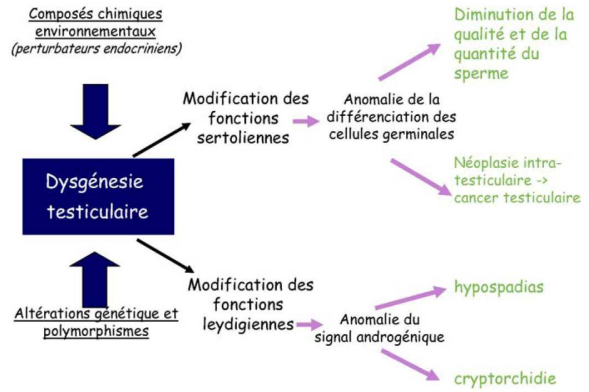


Fig. 1. Syndrome de dysgénésie testiculaire : mécanismes cellulaires d'après Skakkebæk, 2001 [2].

sont soit immédiates (problème de descente testiculaire, de masculinisation) ou bien à long terme (cancer testiculaire, diminution de la production de spermatozoïdes).

La rapidité de l'augmentation de l'incidence des trois symptômes a suggéré que plutôt qu'une cause génétique, c'était une cause environnementale qui était à la base de ce syndrome. En effet, certaines molécules chimiques présentes dans notre environnement peuvent interférer avec les hormones endogènes (voir ci-dessous). Dans le cas du SDT, ce sont les molécules qui possèdent une activité antiandrogénique ou bien estrogéniques qui sont suspectées. Un argument très convaincant en ce sens provient de la comparaison récente de l'incidence de la cryptorchidie, au cours de ces quarante dernières années, chez les nouveau-nés dans les maternités de Berlin-Est et Ouest (pour revue, voir [4]). La fréquence de la cryptorchidie est d'environ 3–4 % pendant la période 1965 à 1971 dans les deux parties de la ville. Ce niveau est maintenu à Berlin-Est pendant la décennie suivante 1972–1983 alors que pendant la même période à Berlin-Ouest l'incidence chute à moins de 1 %. Pendant la décennie 1987–1997, cette incidence décroît dans les deux parties de la ville soit moins de 0,5 % à Berlin-Ouest et moins de 2 % à Berlin-Est. Une cause environnementale parvient à expliquer ces statistiques. En effet, le DDT a été largement utilisé dans les deux parties de la ville depuis 1960 jusqu'en 1970, arrêté à Berlin-Ouest dès 1972 alors qu'il était poursuivi à Berlin-Est jusque dans les années 1980 avant d'être arrêté lors de la réunification de l'Allemagne. Le DDT et son métabolite le DDE sont des perturbateurs endocriniens environnementaux possédant des activités estrogénique et antiandrogénique. Enfin, un autre argument surprenant et en faveur d'une étiologie environnementale du SDT est le taux élevé de certains organochlorés dans le plasma de patients atteints de cryptorchidie [5].

3. Perturbateurs endocriniens environnementaux (PEE)

3.1. Définition

D'après la définition donnée par l'Agence de protection de l'environnement américaine (EPA) en 1997, un perturbateur endocrinien est « une substance exogène qui interfère avec la synthèse, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones endogènes qui sont responsables du maintien de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et /ou du comportement. L'altération des fonctions endocriniennes peut entraîner de graves effets négatifs chez un individu et/ou sa descendance. »

3.2. Nature chimique des PEE

Les perturbateurs endocriniens peuvent être classés en deux grandes catégories, si l'on considère leur nature chimique : les

substances synthétiques ou naturelles (Tableau 1). Les substances synthétiques sont utilisées pour un usage industriel (agents de nettoyage, produits antirouille, plastifiants etc.), dans l'agriculture (pesticides, herbicides, insecticides, fongicides etc.), dans les produits de consommation courante (cosmétiques, produits d'entretien, emballages etc.). Les dioxines, sous-produits des incinérateurs de déchets, ainsi que des hormones de synthèse utilisées pour la croissance des bovins (interdits dans l'Union européenne) ou certains additifs pour l'alimentation animale appartiennent aussi à cette catégorie. La deuxième catégorie est constituée par les substances naturelles comme les phyto-estrogènes (soja), les isoflavonoïdes et les lignanes retrouvées dans certains végétaux comestibles, elles ont généralement une activité estrogénique. Toutefois, ces substances naturelles sont facilement métabolisées par l'organisme, contrairement à la grande majorité des perturbateurs endocriniens d'origine synthétique. Ainsi, parmi les douze polluants les plus toxiques pour l'espèce humaine et la faune mis sur la liste des produits interdits par le programme des Nations Unies pour l'environnement (UNEP), tous ont des propriétés de perturbateurs endocriniens (Tableau 2). Ces produits ont la particularité d'être très peu biodégradables et relativement volatiles, la conséquence étant la dissémination et l'accumulation de ces substances ou de leurs métabolites dans la chaîne alimentaire.

3.3. Cibles des PEE

La majorité des effets néfastes des perturbateurs endocriniens s'exerce sur trois axes hormonaux principaux : l'axe hypothalamus–hypophyse–gonade, l'axe hypothalamus–hypophyse–thyroïde et l'axe hypothalamus–hypophyse–surrénales. Dans cette revue, nous nous focaliserons sur les effets observés sur l'appareil reproducteur mâle, les PEE susceptibles d'interférer dans ce cas avec les hormones endogènes ont une activité de type estrogénique ou bien antiandrogénique (Tableau 3). Les PEE peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrine endogène selon trois mécanismes : en affectant la synthèse, le transport, le métabolisme et l'excrétion de l'hormone, altérant ainsi sa concentration ; par antagonisme de la liaison de l'hormone à son récepteur dans les cellules cibles ; en mimant l'action de l'hormone endogène, induisant ainsi des effets similaires à ceux de l'hormone endogène mais de manière dérégulée.

Nous traiterons essentiellement de l'action à long terme des PE de type antiandrogène.

Tableau 1
Exemple de composés ayant une activité de perturbateur endocrinien

Synthétiques		Naturels
Médicaments	Autres	(phyto-estrogènes)
Acétate de cyprotérone	Pour des exemples voir Tableau 2	Coumestrol (coumarin)
Diéthylstilbestrol (DES)		Enterodiol (lignane)
Ethinyl-estradiol		Enterolactone (lignane)
Flutamide		Genistein (isoflavone)
Kétoconazole		Soja (isoflavone)
Spironoloactone		

Tableau 2
Liste des polluants organiques persistants (POPs) bannis

Nom de la molécule	Utilisation
Aldrin	Insecticide
Chlordane	Insecticide
Dieldrin	Insecticide
Dioxines	Déchet industriel
Endrine	Pesticide
Furanes	Déchets industriels
Heptachlore	Pesticide
Hexachlorobenzène (HCB)	Fongicide
Mirex	Insecticide, retardateur de feu, additif pour plastique
Polychlorinated bisphenyls	Produits industriels
Toxaphène	Insecticide
DDT	Insecticide

4. Modèles expérimentaux développés

Différentes équipes dans le monde ont développé des modèles expérimentaux, généralement chez les rongeurs, reproduisant une exposition pendant la vie adulte ou bien pendant la vie fœtale ou néonatale à des antiandrogènes [6–9]. De ces expériences, il ressort que c'est l'exposition pendant la vie fœtale qui est la plus délétère sur le testicule puisqu'aux mêmes doses, les effets sont réversibles lorsque l'exposition a lieu à l'âge adulte alors que les effets sont irréversibles lorsque l'exposition à lieu pendant la vie intra-utérine [9]. Nous insisterons donc sur le modèle d'exposition fœtale aux antiandrogènes, ce modèle d'exposition fœtale étant celui qui reproduit le mieux le SDT.

Le modèle d'exposition fœtale aux antiandrogènes (Fig. 2) consiste à administrer par gavage la substance aux rongeurs femelles du dixième au vingt et unième jour de gestation,

Tableau 3
Exemples de perturbateurs endocriniens environnementaux ayant des activités oestrogéno-mimétiques et/ou antiandrogéniques

Nom de la molécule	Utilisation
ESTROGÉNOMIMÉTIQUE	
Aldrin	Insecticide
PCB : polychlorinated bisphenyls	Industrie
Dieldrin	Insecticide
Bisphénol A	Présent dans les plastiques alimentaires
Nonylphénol	Industrie
Képone (chlordecone)	Pesticide
Furanes	Déchet industriel, contaminant des PCB
ESTROGÉNOMIMÉTIQUE ET ANTI-ANDROGÈNE	
TCDD : 2,3,7,8 tétrachlorodibenzyl-p-dioxine	Déchet d'incinérateur
Methoxychlor	Fongicide
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane et ses métabolites	Insecticide
ANTI-ANDROGÈNE	
Esters de phthlates (dont DBP : di-n-butyl phthalate)	Plastifiants (Présent dans cosmétiques et certains jouets pour enfant)
Vinclozolin	Pesticide
Linuron	Pesticide
Procymidone	Pesticide
Lindane	Pesticide
Iprodione	Pesticide

cette période couvrant toute la durée de mise en place de l'appareil génital mâle, de la différenciation sexuelle au développement du tractus génital mâle [9,10]. L'utilisation de fenêtre d'exposition plus courte (deux jours) a permis de déterminer la période la plus critique : 16e–17e jour post-coïtum [11]. Cette période correspond au maximum de production de la testostérone et à la mise en place des organes génitaux internes et externes.

Le modèle d'exposition in utero aux antiandrogènes (comme le flutamide) reproduit les anomalies du SDT (Tableau 4). Ainsi, dès 6,25 mg/kg par jour de flutamide in utero il est observé une agénésie des glandes annexes et un hypospadias. La descendance mâle présente aussi une diminution de la distance anogénitale et une cryptorchidie uni- ou bilatérale. Pour les testicules descendus dans le scrotum, une diminution du poids est observée à la dose la plus forte alors que des anomalies sévères de la spermatogenèse sont detectées à partir de la dose 12,5 mg/kg par jour [8]. Toutefois, il n'est pas observé de séminomes chez les animaux exposés in utero aux antiandrogènes. Il faut signaler qu'il est très rare d'observer chez les rongeurs des séminomes et les quelques modèles murins établis ces dernières années sont chez des souris transgéniques pour des gènes exprimés dans les spermatogonies comme le GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor), (pour revue, voir [12]).

À partir de ce type de modèle expérimental, il a été possible d'identifier un certain nombre de mécanismes par lesquels les antiandrogènes perturbent durablement la fonction de reproduction mâle. Parmi les mécanismes identifiés, ceux qui sont décrits ci-après sont de type épigénétique, apoptotique, l'altération du signal androgénique et des anomalies survenant entre les cellules germinales et leurs cellules de soutien.

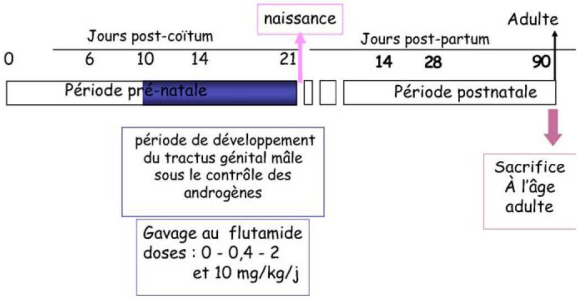


Fig. 2. Modèles expérimentaux d'exposition in utero aux antiandrogènes.

Tableau 4
Anomalies observées chez les animaux adultes exposés in utero à un antiandrogène (en % d'animaux atteints), d'après [8]

	Flutamide (mg/kg/j)				
	0	6,25	12,5	25	50
Absence de prostate ventrale (%)	0	37	88	96	97
Cryptorchidie unilatérale (%)	0	20	25	45	47
Poids des testicules descendus (%)	100	100	99	96	64
Anomalies sévères de la spermatogenèse (%)	4	7	13	34	79

5. Mécanismes et les cibles des perturbateurs endocriniens de type antiandrogène

Le modèle décrit ci-dessus montre que l'exposition fœtale à un antiandrogène induit une pathologie (hypospermatogenèse) se déclarant chez l'adulte. Ce type d'observation expérimentale ainsi que d'autres études soit expérimentale soit épidémiologique sont autant d'éléments qui étayent l'hypothèse émise par Barker [13]. Des événements de type nutritionnel ou métabolique survenant pendant la vie fœtale ou néonatale sont mémorisés (empreinte) lors du développement de l'organisme. Si ces événements sont inappropriés, le développement d'une pathologie adulte est possible suggérant des effets à long terme d'événements survenant pendant la vie intra-utérine. Par exemple, un lien a été établi entre un poids faible et une petite taille à la naissance (en fonction de l'âge gestationnel) et un risque accru d'hypertension artérielle, de maladie cardiovasculaire et de diabète de type II [13]. Concernant l'oncologie gynécologique, un lien a été établi entre exposition au DES (diéthylstilbestrol) pendant la vie intra-utérine et cancer du col de l'utérus [14].

Concernant l'hypospermatogenèse observée chez l'animal adulte ayant été exposé pendant la période fœtale aux antiandrogènes, les répercussions ne sont pas seulement sur la première génération d'animaux mais aussi sur les trois suivantes. Ainsi, des rats mâles et femelles exposés aux PE pendant leur vie intra-utérine, lorsqu'ils sont croisés entre eux, donnent naissance à des animaux présentant une diminution de la qualité et de la quantité de sperme. L'anomalie est portée par les mâles car seule la descendance issue d'un croisement entre mâles exposés et femelles non exposées présente une hypofertilité [15].

Les mécanismes impliqués dans la programmation fœtale des pathologies se déclarant à long terme et/ou se transmettant aux générations suivantes décrites ci-dessus, seraient de type anomalies épigénétiques de l'ADN. Les modifications épigénétiques de l'ADN sont des modifications physiologiques qui n'altèrent pas la séquence de la molécule d'ADN. Différents mécanismes de modification épigénétique de l'ADN ont été décrits. L'un d'eux, la méthylation, est défini comme l'ajout par un enzyme de motifs CH3 au niveau de certaines régions promotrices de l'ADN. Une méthylation accrue du promoteur diminue l'expression du gène qu'il contrôle. C'est un mécanisme global de régulation des gènes en particulier au cours du développement. Bien que la méthylation soit considérée comme un mécanisme réversible, il semble que les profils de méthylation soient transmissibles. Dans le cas du modèle décrit ci-dessus de rats mâles exposés aux antiandrogènes in utero, le profil de méthylation de l'ADN des animaux exposés a été retrouvé modifié [15] suggérant que certains gènes indispensables au bon déroulement de la spermatogenèse voient leur transcription altérée. De même, il a été établi que l'exposition intra-utérine ou postnatale au DES provoque des modifications de la méthylation de certains gènes impliqués dans la prolifération des cellules épithéliales utérines, provoquant leur expression inappropriée après la naissance ou bien à l'âge adulte. L'expression de ces facteurs de croissance serait à la base du développement du cancer utérin dans ce modèle [14].

5.1. Apoptose

L'exposition, pendant la vie fœtale, à un antiandrogène comme le flutamide à des doses élevées (50 mg/kg par jour Tableau 4) provoque une diminution du poids testiculaire résultant d'une perte massive en cellules germinales [8]. Les expériences pour identifier les mécanismes d'action des PE nécessitent de conserver les cellules germinales et donc de travailler avec des doses plus faibles (0 ; 0,4 ; 2 et 10 mg/kg par jour). Á ces différentes doses, le poids testiculaire chez l'animal adulte n'est pas modifié et les anomalies morphologiques de la gonade mâle ne sont pas observées aux doses de 0,4 et 2 mg/kg par jour [9].

Les anomalies des cellules germinales et l'hypospermatogenèse observée chez les animaux adultes exposés in utero aux antiandrogènes sont liées à une activation chronique de l'apoptose. (Fig. 3) Cette mort cellulaire touche spécifiquement les spermatocytes (cellules en méiose) et les spermatides (cellules en différenciation pour devenir des spermatozoïdes). De plus, l'apoptose touche spécifiquement les tubules séminifères aux stades VI-VIII c'est-à-dire les stades androgénodépendants. Au niveau des mécanismes moléculaires, un profil apoptotique a été identifié. Au niveau de la dernière étape de l'apoptose, l'étape exécutrice, une activation chronique des caspases-3 et 6 est observée dans les cellules germinales adultes. En amont, c'est très probablement la voie mitochondriale qui est affectée. Une diminution de l'expression des molécules antiapoptotique (Bcl2, Bclw) est observée alors que le niveau des molécules proapoptotique (Bax) augmente [16]. La voie des récepteurs de mort via la caspase-8 ne semble pas intervenir.

L'apoptose des cellules germinales spécifiquement aux stades VI-VIII, l'augmentation du rapport Bax/Bclw, ces différentes observations signent un profil apoptotique lié à une insuffisance androgénique chez les animaux adultes exposés in utero à un antiandrogène.

5.2. Altération du signal androgène

Il semblait donc important d'étudier l'état de l'imprégnation et du signal androgénique dans ce modèle à différents niveaux : taux d'hormones plasmatiques, quantité de cellules cibles (cellules de Sertoli dans les tubules séminifères), niveau des récepteurs dans ces cellules et de leurs cofacteurs et enfin expression des gènes androgénodépendants. Premièrement, le taux de testostérone plasmatique chez l'animal adulte exposé in utero à un antiandrogène comme le flutamide [17] ou la vinclozoline [11], n'est pas modifié. Il en est de même pour les taux plasmatiques de LH, FSH et estradiol [18]. De plus, le taux de testostérone intratesticulaire n'est pas affecté [19]. Deuxièmement, le nombre de cellules cibles des androgènes dans les tubules séminifères (cellules de Sertoli) ainsi que l'expression du récepteur des androgènes ne sont pas affectés [18,20]. Ces différentes observations suggèrent que l'exposition in utero au flutamide altère l'action des androgènes dans le testicule adulte en aval

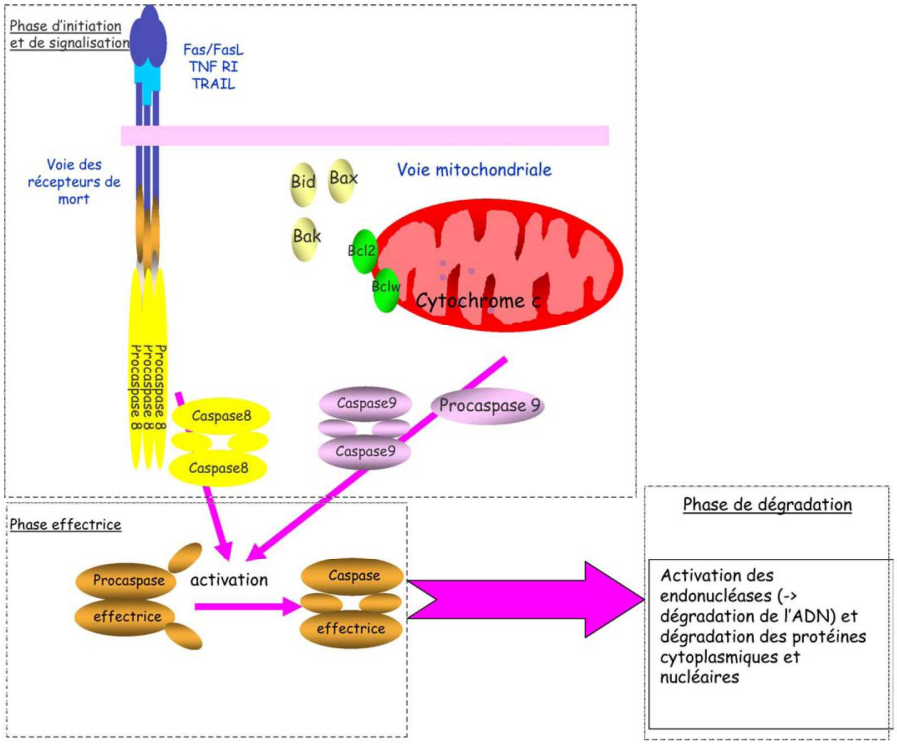


Fig. 3. Représentation schématique des différentes étapes de l'apoptose.

des récepteurs aux androgènes. En effet, l'expression de certains cofacteurs du récepteur des androgènes est modifiée avec une augmentation du corépresseur pc-jun et une diminution du coactivateur Smad3 [21].

5.3. Rôle des cellules de Sertoli

Bien que les cellules germinales ne soient pas les cibles directes de l'action des PE de type antiandrogène car elles n'expriment pas le récepteur des androgènes, l'exposition intra-utérine provoque leur mort dans le testicule adulte. En revanche, il est connu que les cellules de Sertoli possèdent ces récepteurs AR et qu'elles entretiennent d'étroites relations avec les cellules germinales. En effet, les cellules de Sertoli sont les cellules nourricières des cellules germinales, elles ont un rôle protecteur indispensable pour le bon déroulement de la spermatogenèse. Les cellules de Sertoli pourraient subir des modifications irréversibles lors de l'exposition aux PE pendant la vie fœtale. A l'âge adulte, elles ne seraient alors plus capables d'assurer correctement leur rôle de soutien vis-à-vis des cellules germinales. Une de ces altérations pourrait être une modification de leur nombre. En effet, le nombre de spermatozoïdes produits est directement lié au nombre de cellules de Sertoli. Si une diminution du nombre de cellules de Sertoli (par exemple en raison d'une diminution du taux de FSH [22] ou de ses récepteurs) provoque une hypospermatogenèse, une prolifération accrue des cellules de Sertoli (due, par exemple, à l'inhibition de l'hormone thyroïdienne T3) entraîne une augmentation de la production de spermatozoïdes [23]. Toutefois, aucune modification du nombre de cellules de Sertoli n'a été détectée [18]. Une seconde hypothèse serait une altération de la fonction des cellules de Sertoli. Afin de répondre à cette question, des cellules de Sertoli purifiées issues de rats de 20 jours traités ou non durant la vie intra-utérine par le flutamide sont cultivées en présence de cellules germinales provenant de rats adultes indemnes de tout traitement. Les cellules germinales en co-culture avec des cellules de Sertoli issues d'animaux exposés aux PE durant la vie fœtale, présentent une activation importante de l'apoptose [18]. Ces résultats suggèrent que chez les animaux exposés in utero aux antiandrogènes, les cellules de Sertoli subissent une altération irréversible de leur fonction. Elles ne semblent plus capables de protéger efficacement les cellules germinales contre les agressions.

6. Conclusions

Les modèles expérimentaux d'exposition fœtale aux PE de type antiandrogène reproduisent globalement les symptômes du SDT et ont permis d'avancer dans une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la genèse fœtale d'une pathologie se déclarant à l'âge adulte (en particulier l'hypospermatogenèse). Les résultats obtenus permettront peut-être d'établir un lien entre l'exposition intra-utérine à des PE et certaines infertilités chez l'homme. Un élément important est que bien qu'une altération du signal androgénique existe chez l'adulte, celle-ci se situe en aval du récepteur des androgènes. Par conséquent, elle n'est pas accessible par les dosages hormonaux classiques. En effet, les taux de testostérone, LH, FSH et 17β-estradiol sont normaux. Il faut ainsi trouver d'autres marqueurs pour mettre en évidence l'exposition in utero aux PE. Une première approche serait l'étude du profil de méthylation. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que des études de méthylation montrent une modification du profil du gène H19 chez les patients présentant une oligospermie modérée ou sévère [24]. Il reste, toutefois, à établir un lien avec une potentielle exposition aux PE. Une autre approche serait l'étude du profil d'expression des gènes de l'apoptose ou bien des gènes identifiant le signal androgénique.

Enfin, ces travaux pourraient aussi permettre de développer des biomarqueurs pour identifier des produits possédant une activité PE de manière à tenter de limiter leur utilisation. Il faut noter que de nombreux PE sont persistants dans l'environnement et s'accumulent dans la chaîne alimentaire, pérennisant ainsi la possibilité d'exposition.

Références

[1] 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.

[2] Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod 2001;16:972–8.

[3] Hedelin G. L. R. Évolution du cancer du testicule en France. Andrologie 2002;3:50–7.

[4] Ivell R, Hartung S. The molecular basis of cryptorchidism. Mol Hum Reprod 2003;9:175–81.

[5] Hosie S, Loff S, Witt K, Niessen K, Waag KL. Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes? Eur J Pediatr Surg 2000;10:304–9.

[6] Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, et al. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. Hum Reprod Update 2001;7:248–64.

[7] Kelce WR, Gray LE, Wilson EM. Antiandrogens as environmental endocrine disruptors. Reprod Fertil Dev 1998;10:105–11.

[8] McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. Toxicol Sci 2001;62:236–49.

[9] Omezzine A, Chater S, Mauduit C, Florin A, Tabone E, Chuzel F, et al. Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed *in utero* to flutamide. Endocrinology 2003;144:648–61.

[10] Gray Jr. LE, Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, et al. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. Toxicol Ind Health 1999;15:94–118.

[11] Wolf CJ, LeBlanc GA, Ostby JS, Gray Jr. LE. Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. Toxicol Sci 2000;55:152–61.

[12] Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Tabone E, Droz JP, Benahmed M. Growth regulatory factors and signalling proteins in testicular germ cell tumours. APMIS 2003;111:212–24 (discussion 224).

[13] Barker DJ. In utero programming of cardiovascular disease. Theriogenology 2000;53:555–74.

[14] Hadjimichael OC, Meigs JW, Falcier FW, Thompson WD, Flannery JT. Cancer risk among women exposed to exogenous estrogens during pregnancy. J Natl Cancer Inst 1984;73:831–4.

[15] Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. Science 2005; 308:1466–9.

[16] Bozec A, Chuzel F, Chater S, Paulin C, Bars R, Benahmed M, et al. The mitochondrial-dependent pathway is chronically affected in testicular germ cell death in adult rats exposed in utero to anti-androgens. J Endocrinol 2004;183:79–90.

[17] Goddard I, Florin A, Mauduit C, Tabone E, Contard P, Bars R, et al. Alteration of lactate production and transport in the adult rat testis exposed *i*n utero to flutamide. Mol Cell Endocrinol 2003;206:137–46.

[18] Benbrahim-Tallaa L, Tabone E, Mauduit C, Chuzel F, Bars R, Benahmed M. In utero exposure to flutamide permanently alters glutathione S-transferase alpha expression in the adult rat testis. 2006 (submitted).

[19] Kassim NM, McDonald SW, Reid O, Bennett NK, Gilmore DP, Payne AP. The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. J Anat 1997;190:577–88.

[20] Florin A, Maire M, Bozec A, Hellani A, Chater S, Bars R, et al. Androgens and Post-Meiotic Germ Cells Regulate Claudin-11 Expression in Rat Sertoli Cells. Endocrinology 2005;146:1532–40.

[21] Maire M, Florin A, Kaszas K, Regnier D, Contard P, Tabone E, et al. Alteration of transforming growth factor-beta signaling system expression in adult rat germ cells with a chronic apoptotic cell death process after fetal androgen disruption. Endocrinology 2005;146:5135–43.

[22] Singh J, Handelsman DJ. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. J Endocrinol 1996;151:37–48.

[23] Palmero S, Bolla F, Benahmed M, Morera AM, Fugassa E. Triiodothyronine effects on Sertoli cell protein turnover in the prepubertal pig. Cytotechnology 1993;11(Suppl 1):S27–9.

[24] Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. Lancet 2004;363:1700–2.

APOPTOTIC PROFILE INDUCED BY EGME IN TESTICULAR RAT GERM CELLS AND ALTERATION OF THE ANDROGEN SIGNAL.

Souheila AMARA[1], Léo MEUNIER[1], Aurélie VEGA[1], Bénazir SIDDEEK[1], Aline BOZEC[1], Imen HAMMAMI[1], Mohamed BENAHMED[1], Claire MAUDUIT[1,2]

[1]Inserm, U407, Oullins, F-69921 France; Université de Lyon, Lyon, F-69921, France; Université Lyon 1, Faculté de médecine Lyon Sud, Oullins, France;
[2]Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite cedex F-69495.

Short title: EGME-induced alteration of androgen signal

Key words: EGME, apoptosis, testicular germ cells, endocrine disruptor, antiandrogen

Grant support: This work was supported by French Institute for Health and Medical Research (INSERM U407); the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie (MENRT grant to AB) ; France, Organon France through a FARO (Fond d'Aide à la Recherche Organon) fellowship (to SA), SALF (Société d'Andrologie de Langue Française) for a fellowship (to SA).

Correspondence and reprint requests:
MAUDUIT Claire, INSERM Unité 407**,** Faculté de Médecine Lyon-Sud, BP12, 69 921 Oullins cedex France. Tel: (33) 4 26 23 59 24 - Fax: (33) 4 26 23 59 16 – e-mail: mauduit@sante.univ-lyon1.fr

Abstract

Ethylene Glycol Monomethyl Ether (EGME) has been shown to increase oligospermia and azoospermia frequency in factory workers by targeting pachytene spermatocytes. In addition, a link was observed between exposure to end-products containing EGME and some subfertile male workers. The abnormal sperm counts could be observed until 5 years after the exposure has been removed. In this context, the aim was to identify hallmarks of EGME exposure, particularly at low doses. In the present study, adult male rats were exposed to increasing doses of EGME (0, 12.5, 25 and 50 mg/kg per day). We evaluated in testes the profile of the executioner step of apoptosis through Caspase 3, IAP –caspase inhibitors-, and the IAP inhibitor DIABLO expression. At these doses, EGME did not modify testicular weight, but pachytene spermatocytes are the apoptotic-positive cells and their number increased in a dose-dependent manner. EGME induced a dose-dependent increase in active CASP3 ($p=0.004$) and DIABLO ($p<0.0001$) protein levels while IAPs, BIRC2 and XIAP protein levels remained unchanged. EGME might possess anti-androgenic effects since expression of the androgeno-dependent genes RHOX5 ($p=0.02$) and GSTA2 ($p<0.0001$) was decreased in testes from rats treated with EGME at 25 mg/kg. In conclusion, EGME induced pachytene spermatocyte apoptosis at the lowest (12.5) dose used and this cell death process is probably related to in vivo anti-androgen effects, suggesting an endocrine disruptor-like action.

INTRODUCTION

The last two decades have witnessed growing scientific concern over the potential adverse affects on male reproductive functions that may result from exposure to chemicals [1-3]. Among the chemicals used by industry or for house-holding that may alter reproductive functions are the glycol ethers, including Ethylene Glycol Monomethyl Ether (EGME). Although it displays one of the highest toxicity levels, EGME is readily soluble and for this reason is largely used in paints, stains, inks and in the semi-conductor industry. This glycol ether compromises reproductive function, since an exposure to EGME increases oligospermia and azoospermia frequency in male factory workers and the risk of miscarriage appears to be higher in female workers [4-6]. However, end-products containing glycol ethers and particularly EGME are widely used. Indeed, between 1983 and 1998, the French Institute INRS collected data concerning over 40,000 products, nearly 10% of these products contained ethylene glycol ether derivatives. The percentage of glycol ethers in these preparations is variable (from 0.1% to100%). EGME is present in printing inks, varnishes, paints, textile dyes and jet fuels therefore many sectors are concerned by professional exposure such as metal polishers, automobile industry workers, painters, workers in the aeronautical industry, printers, workers in the furniture industry, printed circuit manufacturers, textiles and dying industries, car cleaners, hairdressers … Exposure to EGME may occur by inhalational or dermal exposure. The exposure doses present in the working environment of end-products might be lower than during manufacture of EGME, but the doses are extremely variable due to differences in frequency and duration of use (e.g. painting), concentration of EGME in the end-products, precautions taken during use. In this context, several epidemiological studies showed a link between EGME exposure and oligoazoospermia or subfertility in male workers such as shipyard painters [4]; producers of metallic packaging [7]; male semiconductor workers [5, 8]; workers handling fuels [9]. This last study showed that 5 years after removing contact with EGME end-products, some men still display anormal sperm counts. These data suggest that the risk of infertility is not restricted to men working in manufacture of EGME but men in contact with the glycol ether [10]. To date, it is not known if EGME is the only cause of their infertility or subfertility. More probably, for subfertile men, exposure to end-products containing EGME, at least, has negative effects, may aggravate or reveal the poor fertility status. Moreover, since abnormalities in sperm counts could remain 5 years after exposure, the detection of EGME or metabolites in urine is not useful while the identification of biomarker hallmarks of EGME exposure would be of interest. In this context, the present

study aimed to identify hallmarks of EGME exposure. The most sensitive testicular target cells of EGME appear to be early and late pachytene spermatocytes [11-13]. In EGME-exposed rats, spermatocytes displayed heavily stained cytoplasmic granules, nuclei with uniformly condensed chromatin, or dispersed chromatin masses [14]. The EGME effects are driven by its metabolites. EGME is metabolized by alcohol dehydrogenase into methoxyacetaldehyde which, in turn, is converted by the aldehyde dehydrogenase into methoxyacetic acid (MAA). Administration of MAA to male rodents reproduces the EGME effects on male spermatogenesis [for a review, see 15] and inhibition of EGME metabolism prevents testicular toxicity [16, 17]. MAA is active at a concentration 10 to 100-time lower that the native substance. While the morphological effects of EGME/MAA have been well described, the molecular mechanisms involved in triggering apoptosis remained to be clarified. The last step of apoptosis, before the irreversible cleavage of crucial proteins and endonuclease activation, is under the control of effector caspases named Caspase 3, 6 or 7. Caspase 3 (CASP3) has been largely studied and is known to be synthesized as a pro-enzyme which needs cleavage to be active [for a review, see 18]. Activation and/or activity of CASP3, 7 or 9 are regulated by the Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs). IAPs share a common domain named BIR (baculovirus IAP repeat), that binds to and inhibits CASP3, 7 or 9 [19, 20]. In mammals, the IAP family includes XIAP, BIRC3 (as previously known as c-IAP1), BIRC2 (as previously known as c-IAP2), NAIP2, BIRC5 (as previously known as Survivin), DIAPH1 and BIRC7 (as previously known as Livin) [21]. A third level of regulation has also been observed. IAP action can be inhibited by mitochondrial (DIABLO, HTRA2) or cytosolic (XAF1) proteins [22-24]. Therefore, the fate of the cell at the executioner step of apoptosis depends on the relative quantity of each actor: effector caspase; IAPs and IAP inhibitors, such as DIABLO. In addition to the caspase pathway, the AIFM1 (Apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated 1) exists; this is a phylogenetically ancient mitochondrial inter-membrane flavoprotein endowed with the unique capacity to induce caspase-independent peripheral chromatin condensation and large-scale DNA fragmentation when added to purified nuclei [25].

Since EGME exposure is associated with congenital anomalies and elevated levels of chromosome aberrations, it was suspected to act as a genotoxic [26]. However, the possibility also exists that EGME interferes with the endocrine system and, as such, would be an environmental endocrine disruptor, as suggested by in vitro studies conducted on cell lines [27, 28]. The interactions of EGME in vivo with the endocrine system remain to be clarified.

Our aim was to identify the apoptotic profile involved in testicular germ cell death after exposure to low doses of EGME through the study of the executioner step of apoptosis and to identify in vivo the endocrine disrupting activity of the glycol ether.

MATERIALS

TRIzol®, deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) and Moloney-Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase were obtained from Invitrogen, (Eragny, France). Oligonucleotide primers were synthesized by Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). HotStartTaq for LightCycler was purchased from Roche (Meylan, France). Sigma (Meylan, France) was the source for random hexanucleotides, the protease inhibitor cocktail, actin polyclonal antibody, rabbit polyclonal antibody, human XIAP and active AIFM1, Tween 20, ethylene glycol monomethyl ether (EGME) and Biomax MR films. EGME was diluted in sterile water. Taq polymerase was purchased from Promega Life Science (Madison, WI). Horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG and the chemiluminescent kit were obtained from CovalAb (Lyon, France). Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) was the source for Horseradish peroxidase-labeled anti-goat IgG, and for the following rabbit polyclonal primary antibodies: BIRC2, BIRC5, pro AIFM1. It was also the source for the goat polyclonal antibody raised against DIABLO, RHOX5 (as previously known as Pem), SMAD3 and for the mouse monoclonal antibody raised against phospho JUN. Active CASP3 rabbit polyclonal antibody was obtained from Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Rabbit polyclonal anti-human GSTA2 antibody (NCL-GSTα) was purchased from Novocastra-TEBU (Le Perray-en-Yvelines, France). Mayer's haematoxylin, the aqueous mounting medium (Faramount), and Envision plus and CSAII kits were obtained from Dako (Trappes, France). [α-^{33}P]-dATP (1000-3000) Ci/mmol was purchased from Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). English editing by Amplus® (Lyon, France).

EXPERIMENTAL ANIMALS

Forty 90-day-old male rats (OFA-SD Iffa Credo; l'Arbresle, France), free from specific pathological organisms, were given either water (vehicle) or EGME, at 12.5, 25 or 50 mg/kg per day by gavage during 15 days. Ten rats were used for each condition. Rats were killed at the end of treatment by CO2 inhalation and the testes were removed and weighed. One of the testes was then snap frozen for quantitative studies; the other was fixed for morphological studies. All studies on animals were conducted in accordance with current regulations and standards approved by the INSERM animal care committee.

METHODS

TUNEL and Immunohistochemistry

Testes were immediately fixed for 24 hours in Bouin's fluid, dehydrated stepwise in graded ethanol baths and embedded in paraffin. Bouin-fixed testes were sectioned at 5 μm. The sections were mounted on positively charged glass slides (Super Frost Plus, Menzel-Glaser, Frelburg, Germany), deparaffinized, rehydrated and treated 20 min at 93–98 C° in citric buffer (0.01 M, pH6); subsequently, slides were rinsed in osmosed water (2 x 5 min) and washed (2 x 5 min) in Tris buffer saline pH 7.8 (TBS). The slides were used for either TUNEL or immunohistochemistry. TUNEL reaction was performed as described earlier [29]; results were expressed as the number of TUNEL-positive cells per 100 random round seminiferous tubules. For immunohistochemistry, the Envision Plus kit was used (as indicated by the manufacturer) for the antibodies raised against active AIFM1 (1/20,000), active CASP3 (1/100) and anti- DIABLO (1/400). For the anti XIAP (1/50) antibody, the CSAII detection system was used as indicated by the manufacturer. As a negative control, the antibody diluent replaced the primary antibody. No staining was observed in the negative control. The same antibodies were used for immunohistochemistry and western blotting analyses.

Western blotting analysis

Testicular tissue was homogenized in 200 μl ice-cold hypotonic buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 1% protease inhibitor cocktail). Tissues were further homogenized by sonication (10 sec at 80). Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay [30]. Protein concentration was 80 μg for active CASP3, 60 μg for pro AIFM1, active AIFM1, BIRC2, SMAD3 and phospho JUN ; 40 μg for DIABLO, GSTA2 and RHOX5; 15 μg for XIAP. Protein concentration, for each gene, was determined in preliminary experiments on serially diluted protein extracts. Proteins were resolved on 10% sodium dodecyl sulfate / polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes as described earlier [31]. The antibodies were diluted as follows: 1/100 for active CASP3 and pro AIFM1, 1/6,000 for active AIFM1, DIABLO and BIRC2; 1/4,000 for XIAP, 1/1,000 for GSTA2, 1/600 for phospho JUN; 1/400 for SMAD3 and RHOX5. Protein loading was checked by reprobing the blot with a rabbit IgG anti-ACTIN

(1/500). The Biomax MR films were scanned and quantitation of the band intensity was estimated by densitometry using Optiquant software (Packard, Meriden, CT).

PCR co-amplification and real time PCR

Total RNAs were extracted from rat testes with the TRIzol® reagent and reverse transcription was realized as described earlier [31]. PCR co-amplification: each target gene (*Aifm1*, *Casp3*, *Diablo*, *Xiap*, *Birc2*) was co-amplified with a housekeeping gene (Cyclophilin A or Actin beta, *Actb*), in the presence of 2 µL reverse transcription mix, 0.0255U/µL of Taq polymerase, 1 µM of target primers and 0.5 to 1 µM of housekeeping gene primer, 100 µM of dNTP and 0.075 µL of [α-^{33}P] dATP. For PCR co-amplification, a first step was carried out at 95°C for 5 min followed by several cycles (see Table 1) consisting in a step at 94C°for 30 sec, a step at hybridization temperature (Tm) for 30 sec, and a step at 72°C for 30 sec. PCR ended with a step at 72 C° for 5 min. The co-amplified target and house-keeping gene PCR products were resolved on 8% polyacrylamide gel. The dried gels were exposed to a phosphor screen from about 30 min to 1 h. Quantification of each PCR product was performed on Cyclone Phosphorimager with Optiquant software (Packard, Meriden, CT). Data were expressed as target/housekeeping gene mRNA ratios. Sequences for the primers are described in Table 1. All PCR products were checked by direct sequencing. PCR analyses were conducted from the logarithmic phase of amplification. RT-PCR primers were designed inside separate exons to avoid any bias related to residual genomic contamination. Moreover, no amplification was observed when PCR was performed on RNA preparations.

Real time PCR: In a first step, we assessed standard curves, by scalar dilution of cDNA, for target genes and *Actb*. The samples were run in triplicate. SYBR green real-time PCR assays were carried out in 20 µl PCR mixture volume consisting of 2 µl of LC FastStart SYBR green master mix, containing HotStarTaq DNA polymerase, 1 µl of 10 µM of each oligonucleotide primer, 4 µl of diluted (1/40) reverse transcription mix and 5 mM MgCl2. Gene amplification was carried out as follows: initial activation of HotStarTaq DNA polymerase at 95 C for 480 sec; 45 cycles in three steps: 95 C for 15 sec, Tm (see table 1) for 6 sec, and 72 C for 12 sec. At the end of amplification cycles, melting temperature analysis was carried out by a slow increase in temperature (0.1 C/sec) up to 95 C. PCR products were checked by direct sequencing. Amplification, data acquisition, and analysis were carried out by LightCycler instrument (Roche Molecular Biochemicals) using LightCycler software (version 5.3.2, Roche). This software, coupled to the LightCycler instrument, determines the threshold cycle that represents the number of cycles in which the fluorescence intensity is significantly above

the background fluorescence. The amounts of target relative to the amount of *Actb* in the same sample were analyzed by the relative quantification approach with the use of efficiency correction (Real Quant 1.0 software, Roche Molecular Biochemicals). The results are expressed as a normalized ratio.

Data Analysis

Ten animals were used for each experimental condition. A one-way analysis of variance (ANOVA) for dependent groups was performed to determine whether there were differences between all groups; this was followed by the Bonferroni post hoctest if $p<0.05$ to determine the significance ($p<0.05$) of differences between pairs of groups. Statistical tests were performed on StatView software, Version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTS

Effects of EGME treatment on adult testes

Administration of EGME during 15 days to adult male rats did not modify their body or testicular weight (Table 2). A slight, although non-significant, decrease of testicular weight was observed at an EGME doses of 50 mg/kg per day. No morphological abnormality was observed in testes from adult rats treated with 12.5 and 25 mg/kg per day of EGME (Fig. 1A-C), although some giant cells were detected in the seminiferous tubules of the rats treated with 50 mg/kg per day of EGME (Fig.1D). In terms of apoptosis, very few TUNEL-positive cells were observed in the testes from untreated animals used as a control (Fig. 1E). In contrast, TUNEL-positive cells, mainly pachytene spermatocytes, were identified in adult rat testes treated with 12.5 (Fig. 1F) 25 (Fig. 1G) and 50 (Fig. 1H) mg/kg per day of EGME. No TUNEL-positive cells were detected among somatic cells (Leydig and Sertoli), spermatogonia or spermatids in the different animals (Fig. 1). The number of apoptotic germ cells in adult rat testes increased after EGME treatment in a dose-dependent manner (Fig. 1I). A significant increase in apoptotic germ cells was observed at doses of 12.5 (22%, $p<0.0001$), 25 (32%, $p<0.0001$), and 50 (132%, $p<0.0001$) mg/kg per day**.** Since EGME induced programmed cell death in germ cells, we further focused our study on the characterization of the molecules involved in the executioner step of apoptosis.

Immunolocalization of proteins belonging to the executioner step of apoptosis in rat testes

We first localized the protein from the executioner step of apoptosis *in situ* (Fig. 2 and Table 3). The active form of effector CASP3 was expressed in pachytene spermatocytes and round spermatids (Fig. 2A), while DIABLO was detected in pachytene spermatocytes and with a lower intensity in round spermatids (Fig. 2C). Concerning the IAPs, XIAP (Fig. 2G) was detected in the Leydig and Sertoli cells and BIRC2 in the different types of germ cells (data not shown). Active AIFM1 protein was localized in premeiotic germ cells and in Leydig cells (Fig. 2E). The treatment of adult male rats with EGME did not modify the cellular localization for AIFM1 (Fig. 2F) or XIAP (Fig. 2H). In contrast, a staining for active CASP3, at lower intensity, was detected in elongating and elongated spermatids from EGME-treated rats (Fig. 2B). For DIABLO, the lower intensity detected in round spermatids from untreated animals seemed to disappeared in treated rats (Fig. 2D).

Since we wanted to quantify the different proteins belonging to the effector step of apoptosis, EGME doses were chosen to minimize or avoid massive germ cell loss that may confound the interpretation of effects of the molecule on testicular gene expression**.** According to the

morphological and TUNEL data obtained above, we conducted the experiments with EGME at doses of 12.5 and 25 mg/kg per day, where a mild apoptotic process was observed (Fig. 1I).

Effects of EGME treatment on mRNA and protein levels of the pro-apoptotic molecules involved in the executioner step of apoptosis

EGME induced a dose-dependent increase in both *Casp3* mRNA and protein levels (Fig. 3) in adult rat testes. A significant increase in *Casp3* mRNA was observed at 25 mg/kg/day of EGME either with co-amplification PCR (35% increase, p=0.001, Fig. 3B) or real time PCR (28% increase, p=0.04, Fig. 3A). Similarly, active CASP3 protein levels were increased after EGME treatment at 25mg/kg per day (124% increase, p=0.02, Fig. 3C). *Diablo* mRNA expression was unchanged either with co-amplification PCR (Fig. 3E) or real time PCR (Fig. 3D). At protein levels, a significant increase in DIABLO was observed at 25 mg/kg per day (171%, p<0.0001, Fig. 3F). Expression of the mitochondrial factor *Aifm1* was unchanged at mRNA levels (Fig. 4A) and at the protein levels for the pro (Fig. 4B) and active (Fig. 4C) forms.

Effects of EGME treatment on mRNA and protein levels of the anti-apoptotic molecules involved in the executioner step of apoptosis

Birc2 mRNA (Fig. 5A) and protein (Fig. 5B) levels were not modified in the testes from rats treated with EGME. Similarly, EGME treatment did not modify *Xiap* mRNA (Fig. 5C) and protein (Fig. 5D) levels.

The next experiments were devoted to identifying the effects of EGME as an endocrine disruptor on the androgen signal in the testes.

Effects of EGME treatment on the androgen signal

In the EGME-treated testes, we analyzed the androgenic signal is represented by some androgen receptor (AR) co-factors (SMAD3, phospho JUN) and androgeno-dependent genes such as RHOX5 and GSTA2. SMAD3 (known also as AR co-activator) protein levels were significantly increased in the testes from rats treated with the EGME at 25 mg/kg per day (57% increase, p<0.0001, Fig. 6A) while its mRNA levels were decreased (58% decrease, p=0.0037, Fig. 6C). The expression of AR co-repressor phospho JUN was significantly decreased at 25 mg/kg per day at protein (41% decrease, p=0.002, Fig. 6B) and mRNA levels (46% decrease, p=0.003, Fig. 6D). The androgeno-dependent genes, RHOX5 (27% decrease, p=0.002, Fig. 7A) and GSTA2 (57%, decrease, p<0.0001, Fig. 7B), showed significantly

decreased protein levels in testes from rats treated by EGME at 25 mg/kg per day, while their mRNA levels were unchanged (*Rhox5*, Fig. 7C; *Gsta2*, Fig. 7D-).

DISCUSSION

While the morphological effects of EGME on the testes have been well described [11, 32, 33], the cellular and molecular mechanisms underlying these effects remain to be clarified. With clarification as our goal, we developed a model of adult rats exposed during 15 days to increasing doses of EGME. The doses used in the present study were lower than those normally used in the literature [12, 34, 35]. As generally used to characterize morphological effects, doses higher than 50 mg/kg per day induce a dramatic germ cell loss which is hardly compatible with the quantitative studies for testicular gene expression. In the present study, the rats were administrated 12.5, 25 or 50 mg/kg per day of EGME. Under these conditions, we did not detect modification of either body or testicular weights. At a microscopic level, the testes from rats treated with 12.5 and 25 mg/kg per day did not show gross histological alterations, whereas at 50 mg/kg per day, giant cells were detected. Previous studies showed a progressive depletion of pachytene spermatocytes from a dose of 100 mg/kg per day as early as 24 hours after treatment [11, 14, 16]. This degenerating process induced by 100 or 200 mg/kg of EGME [34] or its metabolite MAA [650 mg/kg, [36, 37] has been characterized as apoptosis. In the present work, detection of apoptosis showed a significant dose-dependent increase in TUNEL-positive germ cells from as low as 12.5 mg/kg of EGME. At the 50 mg/kg dose, the apoptotic rate is heterogeneous, from 29% to 414%. Because adult rats treated with 50 mg/kg per day showed a 10%, non-significant reduction in testicular weight, histological alterations and a high and heterogeneous apoptotic rate, we decided to conduct our quantitative studies on testicular gene expression on rats treated with 12.5 and 25 mg/kg of EGME, since germ cell loss might occur at the 50 mg/kg dose. Indeed, the histological alterations we detected at 50 mg/kg might be the reason for reduced fertility that was observed five weeks after this single dose of EGME [38]. Interstingly, the active CASP3 staining was more intense in spermatids than in spermatocytes although apoptotic spermatocytes were identified in EGME-exposed rats. Since CASP3 activation of has been shown to be involved in testicular germ cell apoptosis [for a review, see 39], it is probable, therefore, that apoptosis in pachytene spermatocytes was mediated through CASP3 activation. In contrast, CASP3 staining and expression were increased in spermatids from EGME-treated rats while these testicular cell type were not targeted by apoptosis. It was previously reported an activation of CASP3, particularly in lymphocytes, in absence of apoptosis [for a review see 40], suggesting the role of CASP3 in the activation of different proteins (for example, IL2 or

MAP kinases). In this context, the elevated active CASP3 levels observed in spermatids might be related to protein activation instead of apoptosis.

We further localized the molecules of the executioner step of apoptosis in the testes. Active CASP3 was observed exclusively in spermatocytes and spermatids, while its inhibitors were detected in somatic testicular cells (Leydig and Sertoli cells) for XIAP and in the different testicular germ cells for BIRC2. The DIABLO IAP inhibitor was mainly localized in pachytene spermatocytes. AIFM1, a caspase-independent apoptosis inducer, was expressed in Leydig and germ cells. The apoptotic process induced by EGME in the pachytene spermatocytes is probably related to activation of the caspase-dependent pathway because we observed increased protein levels of active CASP3 and DIABLO (both localized in TUNEL-positive pachytene spermatocytes), while the expression of AIFM1 remained unchanged. Moreover, the germ cells did not succeed in protecting themselves against effector CASP3 action since BIRC2 expression remained unchanged. XIAP expression, detected in Leydig and Sertoli cells, remained unchanged, suggesting that these cells did not need to protect themselves against EGME. In other words, EGME would not target Leydig or Sertoli cells in terms of apoptosis. However, when animals were administrated an oxaliplatin chemotherapy, XIAP levels decreased [41] and the association of ionizing radiation plus oxaliplatin increased AIFM1 expression [41]. These data might suggest that the apoptotic profile induced in testicular cells can be specific to the drug/chemical used. Moreover, since pachytene spermatocytes are the cells targeted by the EGME-induced apoptosis [the present study, [34, 42], the possibility exists that the apoptotic profile we described here represents a hallmark for the programmed cell death of these cells. However, futher studies are needed to verify this hypothesis.

Concerning EGME mechanism of action, it has recently been suggested that the molecule possesses *in vitro* endocrine disrupting activities [28]. Indeed, by using a L929 fibroblast cell line stably transfected with a MMTV promoter-CAT, Tirado has observed that MAA potentiated the effects of DHT but had no effect on the AR in the absence of hormone [28]. Moreover, MAA could also activate the ERbeta receptor [27]. These data suggest that MAA increased the in vitro transcription activity of AR, probably not directly but by altering AR co-activator expression [28]. In this context, it was of interest to evaluate in vivo whether EGME modifies the androgen signal in the testes and possesses endocrine disrupting activities. Here, we showed that EGME decreased the levels of two proteins (mainly expressed by Sertoli cells) whose expression is driven by androgen: RHOX5 (Reproductive homeobox 5) and GSTA2 (gluthation S-transferase A2). These data suggest that EGME

might impair the AR signal in Sertoli cells and that alterations of Sertoli cell functions might be one explanation to the apoptotic cell death of pachytene spermatocytes. While the RHOX5 and GSTA2 protein levels were decreased, their mRNA levels were unchanged. These observations indicate that the possibility exists that the proteins autoregulate their transcription as previously described [43]. Given that androgen-reponse elements (ARE) are present in the *Rhox5* promoter [44], and classical steroid-responsive elements, recognized by AR [45], are present in *Gsta2* promoter [46], it appears possible that the decreased expression of the proteins resulted from a direct effect of reduced testosterone levels or availability. Interestingly, reduced intratesticular testosterone levels after EGME treatement was reported earlier [32]. However, it is not known, to date, whether such a testosterone decrease originate from an alteration in androgen synthesis (StAR, steroidogenic enzyme expression/activity) or transformation into estradiol (aromatase activity). EGME probably alters the AR bioavailability since plasma [32] and seminiferous tubules at stages VII-VIII [28] showed increased ABP protein levels after MAA treatment. An excess of ABP generated in ABP transgenic mice is associated with increased pachytene spermatocyte apoptosis [47]. Another explanation to decreased expression of the Sertoli cell androgenodependent gene RHOX5 and GSTA2 might be an indirect action. Indeed, MAA have been reported to modify the chromatine remodelling pattern through inhibition of histone deacetylase activity and increase in histone acetylase activity [48].

As a consequence to decreased androgeno-dependent gene expression the possibility exits that in reaction AR activity is increased. Indeed, the AR activity, evaluated through the co-activator Smad3 and the co-repressor pc-jun seems to be increased in vivo (the present study). In vitro, Tirado et al. found also an increase in AR activity after MAA treatment [28].

In summary, the present data identified the apoptotic profile of testicular germ cells after treatment with EGME. The glycol ether in vivo might alter the androgenic signal, suggesting that EGME might be an endocrine disruptor. Moreover, some protein changes reported in the present study were detected before histopathological changes occurred i.e. at the lowest dose used. Therefore, the protein evaluated here could potentially serve as a biomarker to evaluate EGME reproductive toxicity.

REFERENCES

1. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Bmj 1992; 305: 609-613.
2. Ekbom A, Akre O. Increasing incidence of testicular cancer--birth cohort effects. Apmis 1998; 106: 225-229; discussion 229-231.
3. Swan SH. Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: long-term effects in humans. Apmis 2000; 108: 793-804.
4. 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.
5. Correa A, Gray RH, Cohen R, Rothman N, Shah F, Seacat H, Corn M. Ethylene glycol ethers and risks of spontaneous abortion and subfertility. Am J Epidemiol 1996; 143: 707-717.
6. Cook RR, Bodner KM, Kolesar RC, Uhlmann CS, VanPeenen PF, Dickson GS, Flanagan K. A cross-sectional study of ethylene glycol monomethyl ether process employees. Arch Environ Health 1982; 37: 346-351.
7. 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.
8. 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.
9. Ben-Brik E, Jerome L, Arnaud I, Yous S, Labat L, Haguenoer JM, Multigner L. Exposure to glycol ethers in a population of French men evaluated by measurement of urinary alkoxycarboxylic acids. Int Arch Occup Environ Health 2004; 77: 368-372.
10. 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.
11. Chapin RE, Dutton SL, Ross MD, Sumrell BM, Lamb JCt. The effects of ethylene glycol monomethyl ether on testicular histology in F344 rats. J Androl 1984; 5: 369-380.
12. Chapin RE, Dutton SL, Ross MD, Lamb JCt. Effects of ethylene glycol monomethyl ether (EGME) on mating performance and epididymal sperm parameters in F344 rats. Fundam Appl Toxicol 1985; 5: 182-189.

13. Foster PM, Creasy DM, Foster JR, Gray TJ. Testicular toxicity produced by ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. Environ Health Perspect 1984; 57: 207-217.
14. Creasy DM, Beech LM, Gray TJ, Butler WH. An ultrastructural study of ethylene glycol monomethyl ether-induced spermatocyte injury in the rat. Exp Mol Pathol 1986; 45: 311-322.
15. Bagchi G, Waxman DJ. Toxicity of ethylene glycol monomethyl ether: impact on testicular gene expression. Int J Androl 2007.
16. Foster PM, Creasy DM, Foster JR, Thomas LV, Cook MW, Gangolli SD. Testicular toxicity of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. Toxicol Appl Pharmacol 1983; 69: 385-399.
17. Beattie PJ, Brabec MJ. Methoxyacetic acid and ethoxyacetic acid inhibit mitochondrial function in vitro. J Biochem Toxicol 1986; 1: 61-70.
18. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature 2000; 407: 770-776.
19. Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. Oncogene 2003; 22: 8568-8580.
20. Clem RJ, Miller LK. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. Mol Cell Biol 1994; 14: 5212-5222.
21. Vaux DL, Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6: 287-297.
22. Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. Nat Cell Biol 2001; 3: 128-133.
23. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. Nature 2000; 408: 1004-1008.
24. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. Nature 2000; 408: 1008-1012.
25. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? J Cell Sci 2002; 115: 4727-4734.
26. El-Zein RA, Abdel-Rahman SZ, Morris DL, Legator MS. Exposure to ethylene glycol monomethyl ether: clinical and cytogenetic findings. Arch Environ Health 2002; 57: 371-376.

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

28. Tirado OM, Martinez ED, Rodriguez OC, Danielsen M, Selva DM, Reventos J, Munell F, Suarez-Quian CA. Methoxyacetic acid disregulation of androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat testis. Biol Reprod 2003; 68: 1437-1446.

29. Mauduit C, Siah A, Foch M, Chapet O, Clippe S, Gerard JP, Benahmed M. Differential expression of growth factors in irradiated mouse testes. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 50: 203-212.

30. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985; 150: 76-85.

31. Mauduit C, Goddard I, Besset V, Tabone E, Rey C, Gasnier F, Dacheux F, Benahmed M. Leukemia inhibitory factor antagonizes gonadotropin induced- testosterone synthesis in cultured porcine leydig cells: sites of action. Endocrinology 2001; 142: 2509-2520.

32. Reader SC, Shingles C, Stonard MD. Acute testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene and ethylene glycol monomethyl ether in the rat: evaluation of biochemical effect markers and hormonal responses. Fundam Appl Toxicol 1991; 16: 61-70.

33. Lee KP, Kinney LA. The ultrastructure and reversibility of testicular atrophy induced by ethylene glycol monomethyl ether (EGME) in the rat. Toxicol Pathol 1989; 17: 759-773.

34. Watanabe A, Nakano Y, Endo T, Sato N, Kai K, Shiraiwa K. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 27). Repeated toxicity study on ethylene glycol monomethyl ether for 2 and 4 weeks to detect effects on male reproductive organs in rats. J Toxicol Sci 2000; 25 Spec No: 259-266.

35. Jindo T, Wine RN, Li LH, Chapin RE. Protein kinase activity is central to rat germ cell apoptosis induced by methoxyacetic acid. Toxicol Pathol 2001; 29: 607-616.

36. Rao AV, Shaha C. N-acetylcysteine prevents MAA induced male germ cell apoptosis: role of glutathione and cytochrome c. FEBS Lett 2002; 527: 133-137.

37. Krishnamurthy H, Weinbauer GF, Aslam H, Yeung CH, Nieschlag E. Quantification of apoptotic testicular germ cells in normal and methoxyacetic acid-treated mice as determined by flow cytometry. J Androl 1998; 19: 710-717.

38. Holloway AJ, Moore HD, Foster PM. The use of rat in vitro fertilization to detect reductions in the fertility of spermatozoa from males exposed to ethylene glycol monomethyl ether. Reprod Toxicol 1990; 4: 21-27.

39. Sinha Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 85: 175-182.

40. Zeuner A, Eramo A, Peschle C, De Maria R. Caspase activation without death. Cell Death Differ 1999; 6: 1075-1080.

41. Chater S, Amara S, Moussata D, Bozec A, Omezzine A, Romestaing P, Chapet O, Gerard JP, Mornex F, Benahmed M, Mauduit C. Differential effects of ionizing radiation and platinum-derivative chemotherapy on apoptotic pathways in testicular germ cells. Int J Radiat Biol 2007; 83: 269-278.

42. Wang W, Wine RN, Chapin RE. Rat testicular Src: normal distribution and involvement in ethylene glycol monomethyl ether-induced apoptosis. Toxicol Appl Pharmacol 2000; 163: 125-134.

43. Devost D, Boutin JM. Autoregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs. Mol Cell Endocrinol 1999; 158: 99-109.

44. Barbulescu K, Geserick C, Schuttke I, Schleuning WD, Haendler B. New androgen response elements in the murine pem promoter mediate selective transactivation. Mol Endocrinol 2001; 15: 1803-1816.

45. Claessens F, Alen P, Devos A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W. The androgen-specific probasin response element 2 interacts differentially with androgen and glucocorticoid receptors. J Biol Chem 1996; 271: 19013-19016.

46. Falkner KC, Rushmore TH, Linder MW, Prough RA. Negative regulation of the rat glutathione S-transferase A2 gene by glucocorticoids involves a canonical glucocorticoid consensus sequence. Mol Pharmacol 1998; 53: 1016-1026.

47. Selva DM, Tirado OM, Toran N, Suarez-Quian CA, Reventos J, Munell F. Meiotic arrest and germ cell apoptosis in androgen-binding protein transgenic mice. Endocrinology 2000; 141: 1168-1177.

48. 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.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Testicular morphology and apoptosis detection in adult testes from rats treated with EGME.

Survey view of adult testis morphology from rats not exposed (A) or exposed to 12.5 (B), 25 (C), or 50mg/kg per day of EGME (D). Arrow= giant cells. Detection of TUNEL-positive cells in the testis from rats that were untreated (E), or treated with 12.5 (F) 25 (G) or 50 (H) mg/kg per day of EGME. Scale bar = 50µm, inset scale bar = 200 µm. (I) The number of TUNEL-positive germ cells per 100 round seminiferous tubules was determined in the testes from rats treated with 0, 12.5, 25 or 50 mg/kg per day of EGME. Results are expressed as the mean (dark bar) and each rat is represented as a dot.

Figure 2. Immunostaining for active CASP3, DIABLO, AIFM1, and XIAP in adult rat testes.

Sections were treated with antibodies raised against active CASP3 (A-B), DIABLO *(*C-D*)*, active AIFM1 *(*E-F*)*, XIAP *(*G-H*)*. Testes were obtained from adult rats untreated (A, C, E, and J) or treated (B, D, F and H) with 50mg/kg per day of EGME. Scale bar = 50µm. g: spermatogonia, c: pachytene spermatocyte, d: spermatids, S: Sertoli cell, L: Leydig cell.

Figure 3. Effects of EGME treatment on active *Casp3* and *Diablo* mRNA and protein levels in adult rat testes.

mRNA and protein levels were determined in adult testes from untreated rats (0) or rats treated with 12.5 or 25 mg/kg per day of EGME. (A) *Casp3* mRNA by real time-PCR, (B) *Casp3* mRNA by co-amplification PCR, (C) active CASP3 protein, (D) *Diablo* mRNA by real time-PCR, (E) *Diablo* mRNA by co-amplification PCR and (F) DIABLO protein. (B, C, E, F) Representative auto radiograms are shown in the upper panels. The results are expressed as the mean (dark bar) and each rat is represented as a dot.

Figure 4. Effects of EGME treatment on *Aifm1* mRNA and protein levels in adult rat testes.

Aifm1 mRNA (A), pro AIFM1 (B), and active AIFM1 (C) protein levels were determined in adult rat testes from untreated rats (0) or rats treated with 12.5 or 25 mg/kg per day of EGME. Representative autoradiograms are shown in the upper panels. Results are expressed as the mean (dark bar) and each rat is represented as a dot.

Figure 5. Effects of EGME treatment on *Birc2* and *Xiap* mRNA and protein levels in adult rat testes.

Birc2 mRNA (A), BIRC2 protein (B), *Xiap* mRNA (C) and XIAP protein (D) levels were determined in adult rat testes from untreated rats (0) or rats treated by 12.5 or 25 mg/kg per day of EGME. Representative autoradiograms are shown in the upper panels. Results are expressed as the mean (dark bar) and each rat is represented as a dot.

Figure 6. Effects of EGME treatment on the androgenic signal: *Smad3* and *Jun*

Protein levels were determined in adult rat testes from untreated rats (0) or rats treated by 12.5 or 25 mg/kg per day of EGME for (A) SMAD3, (B) phospho JUN. Representative autoradiograms are shown in the upper panels. MRNA levels were determined for *Smad3* (C) and *Jun* (D). Results are expressed as the mean (dark bar) and each rat is represented as a dot.

Figure 7. Effects of EGME treatment on the androgenic signal: *Rhox5* and *Gsta2*

Protein levels were determined in adult rat testes from untreated rats (0) or rats treated by 12.5 or 25 mg/kg per day of EGME for (A) RHOX5, (B) GSTA2. Representative autoradiograms are shown in the upper panels. MRNA levels were determined for (C) *Rhox5*, (D) *Gsta2*. Results are expressed as the mean (dark bar) and each rat is represented as a dot.

Table 1: Primers, sequences and PCR conditions.

Primers	**Sequences**	**PCR product** Length (pb)	**Tm (°) Cycle Number**
PCR co-amplification			
Aifm1	**F**:GTTGGAGTCAGCGGTG **R**:CCCAGATGTTAGAACGTGC	188	62°C 33 cycles
Diablo	**F**: TCTCTCAGTAACGAAGCA **R**: CACACCTCATCTTCCTCC	192	58°C 24 cycles
Casp3	**F**:ACGGTACGCGAAAAGTGAC **R**:TCCTGACTTCGTATTTCAGGGC	282	55°C 28 cycles
Birc2	**F**:CCCCACTGTCCATTTCT **R**:CCTTGACTAAGATGGTGTCG	191	55°C 27 cycles
Xiap	**F**:TCTTGACAGGCCGTCG **R**:CCCCGTGTAGTAGAGTCC	195	27°C 24 cycles
Cyclophilin A	**F**:ACCCCACCGTGTTCTTCG **R**:CATTTGCCATGGACAAGA	299	According to target gene
Actb	**F**:AGCCTCGCCTTTGCCG **R**:CTGGTGCCTGGGGCG	146	According to target gene
Real time PCR			
Casp3	**F** : GCGAGCTGACATTCCAGTGC **R** : AGCAAGTCGATGGACTCTGG	122 bp	58°C
Diablo	**F**: ATGACACTGTGTGCGGTTCC **R**: CACCTCATCTTCCTCCTGGG	243 bp	55°C
Jun	**F**:GATCGCCCGGCTAGAGGAAAAAG **R**:TCGCAACCCAGTCCATCTTGTGT	307 bp	55°C
Smad3	**F**: ACAAGGTCCTCACCCAGATG **R**:TGGCGATACACCACCTGTTA	317 bp	53°C
Rhox5	**F**:GCCTGGGAGTCAAGGAA **R**:GCCACTATCCTTGTCCCCATCA	234 bp	55°C
Gsta2	**F**:ACAAGATTATCTCGTTGGCAACAG **R**:CTTCCACATGGTAGAGGAGTTCAA	242 bp	55°C
Actb	**F**:AGCCTCGCCTTTGCCG **R**:CTGGTGCCTGGGGCG	146 bp	55°C

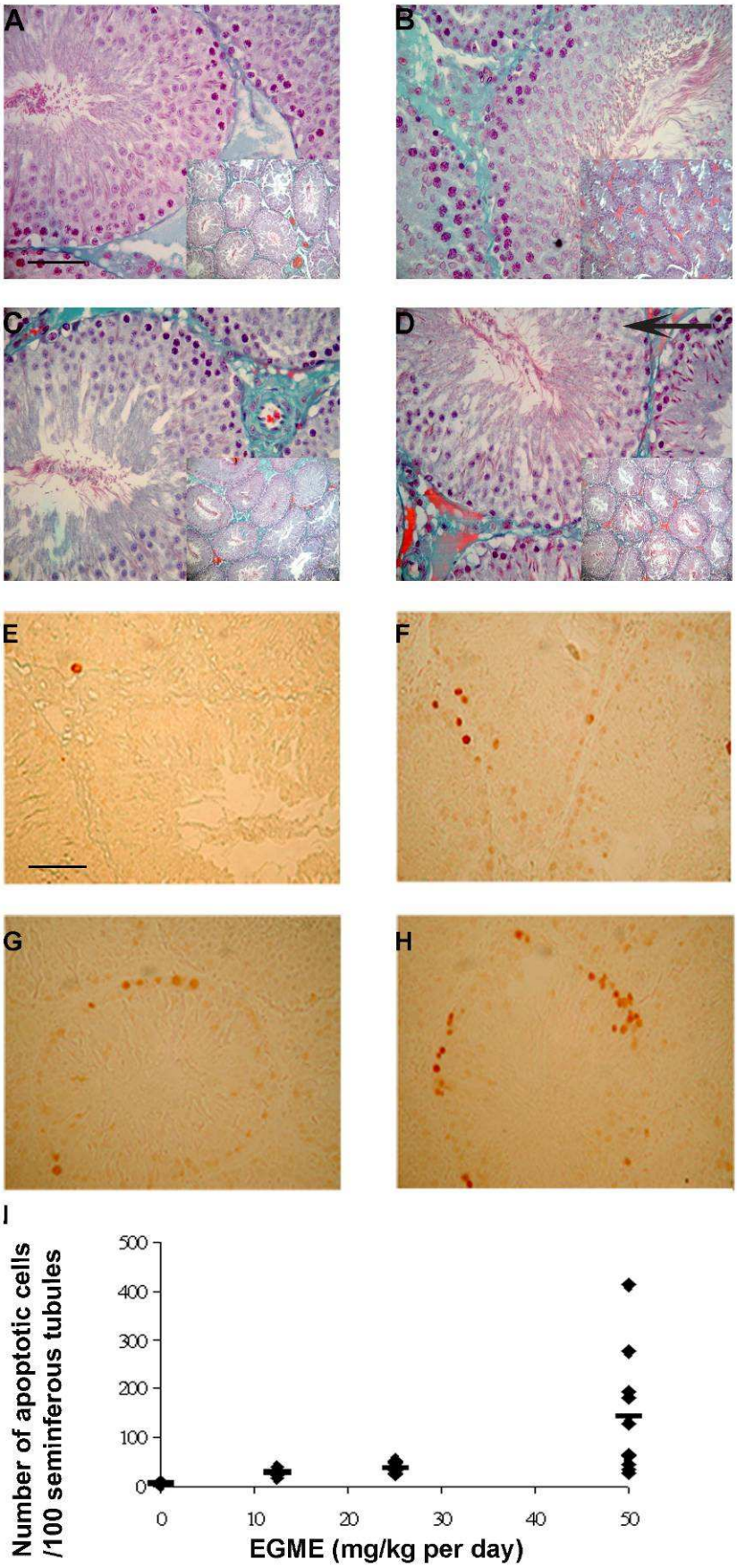
Table 2: Body and testis weight of rats treated with EGME.

EGME (mg/kg per day)	**Body weight (g)**	**left testicular weight (g)**	**right testicular weight (g)**
0	500.5± 68.23	3.95±0.67	3.90±0.68
12.5	506.6± 30.30	3.74±0.35	3.75±0.31
25	483.1±39.93	3.88±0.40	3.92±0.32
50	503.9±36.55	3.54±0.41	3.53±0.41

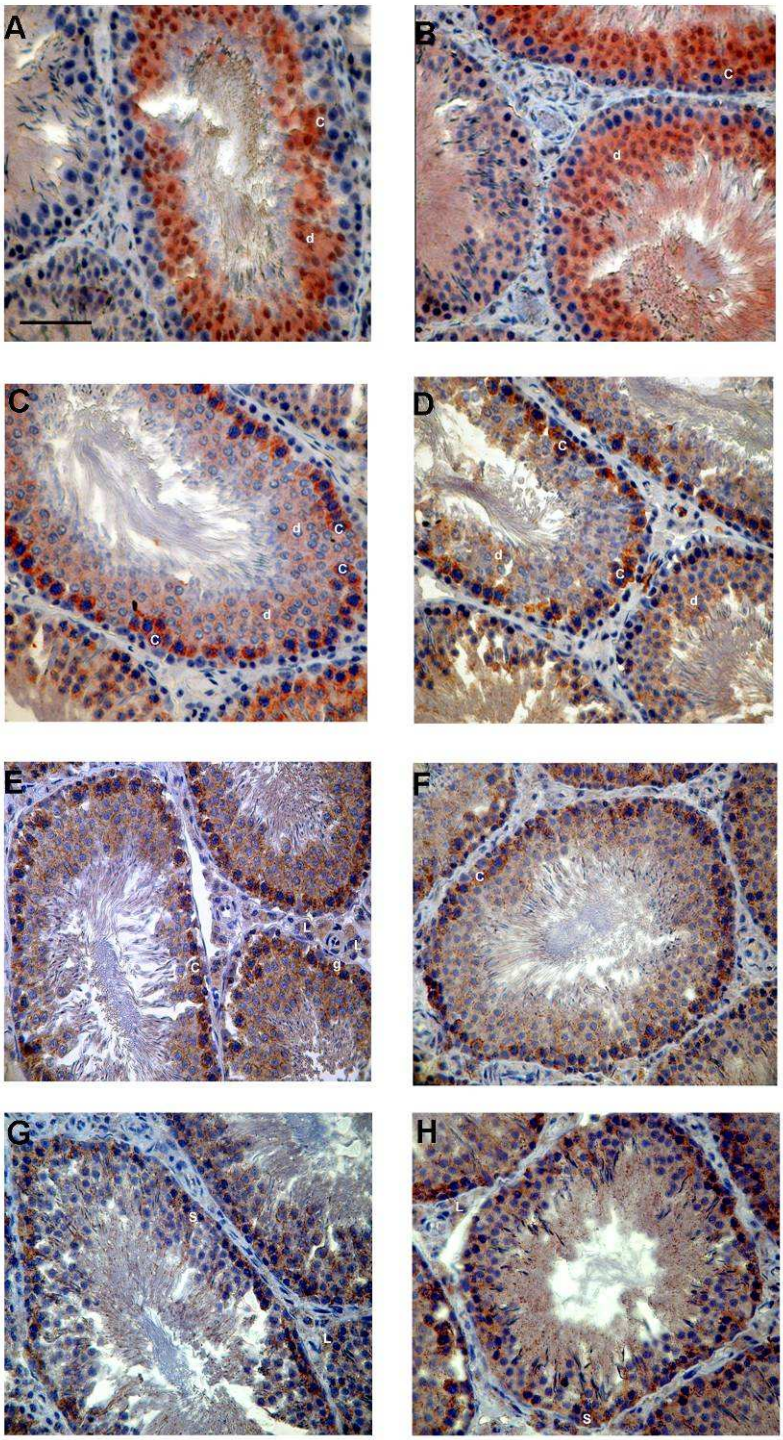
The results are expressed as the mean ± SD.

Table 3: Localization of apoptotic cascade protein in the testicular cells

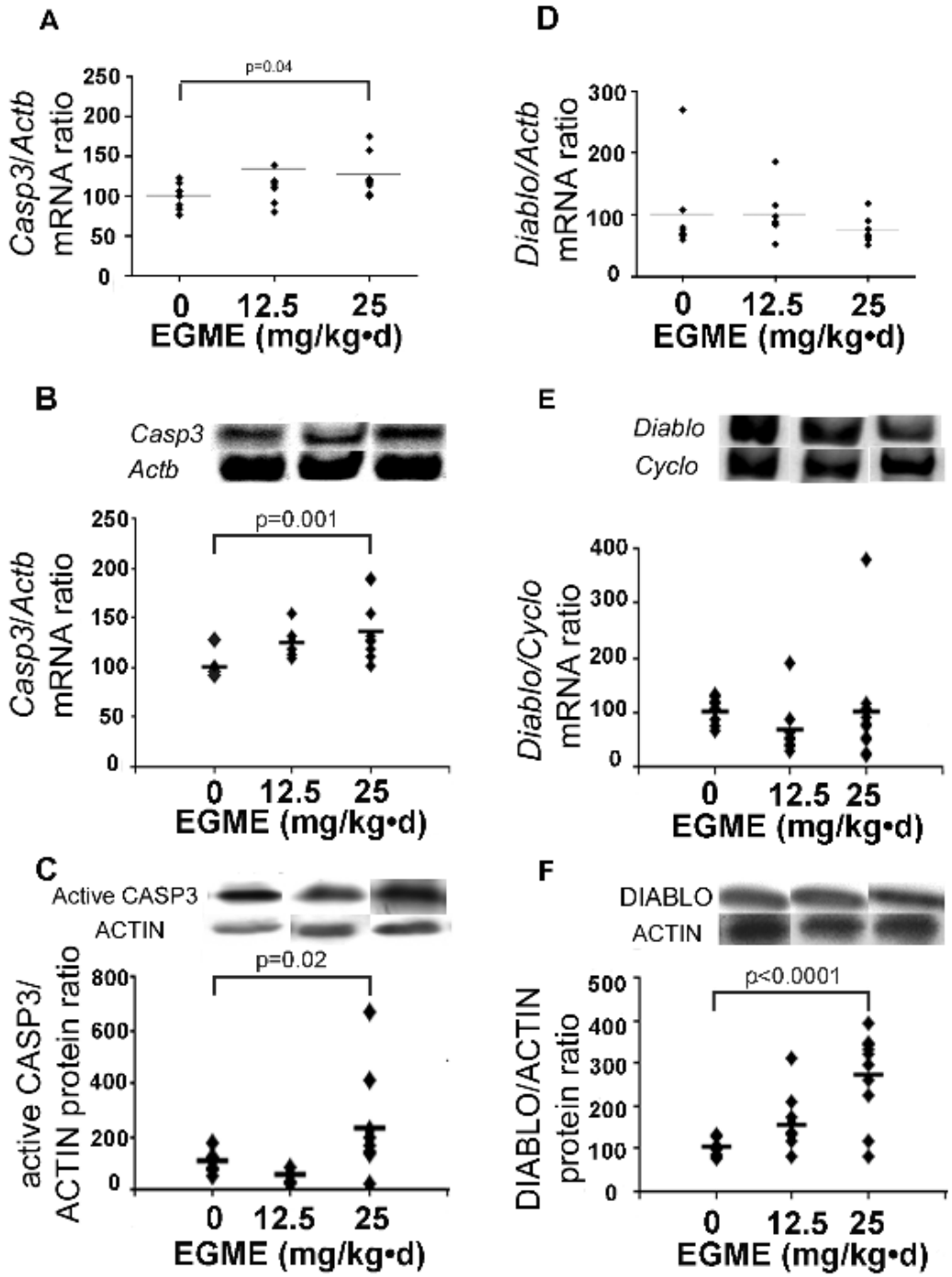
			Germ cells		
	Leydig cell	**Sertoli cell**	**Spermatogonia**	**Spermatocytes**	**Spermatids**
Active CASP3	0	0	0	+	++
DIABLO	0	0	0	+	+/-
Active AIFM1	+	0	+	+	0
XIAP	+/-	+	0	0	0
BIRC2	0	0	+	+	+



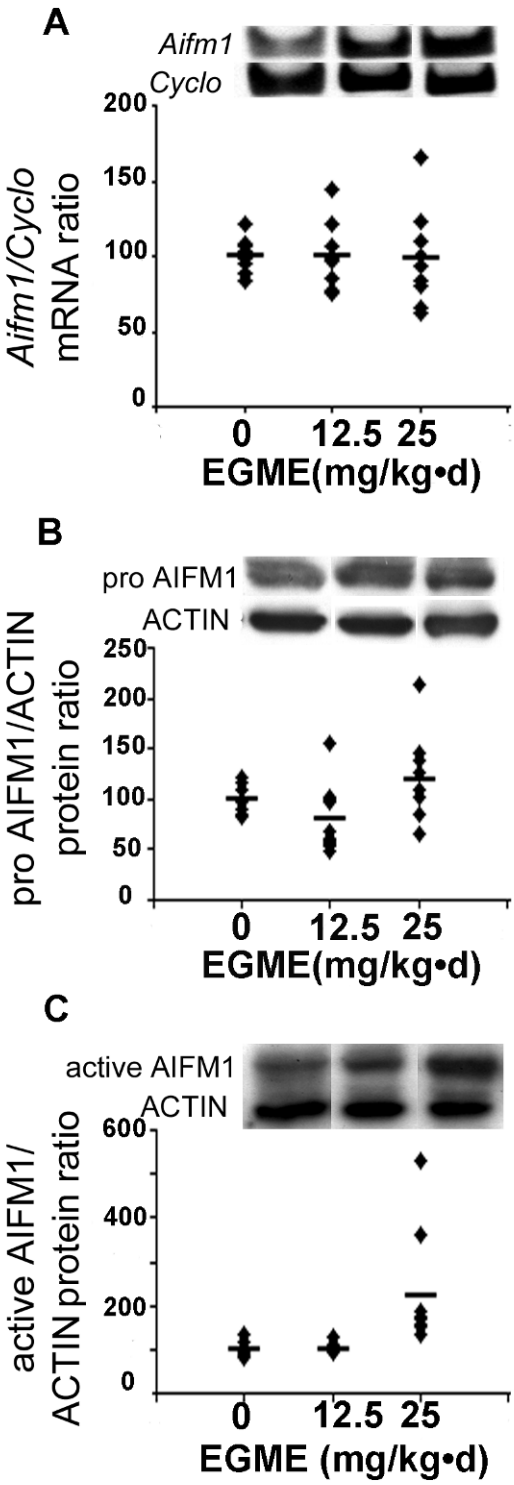
Amara et al. Fig. 1



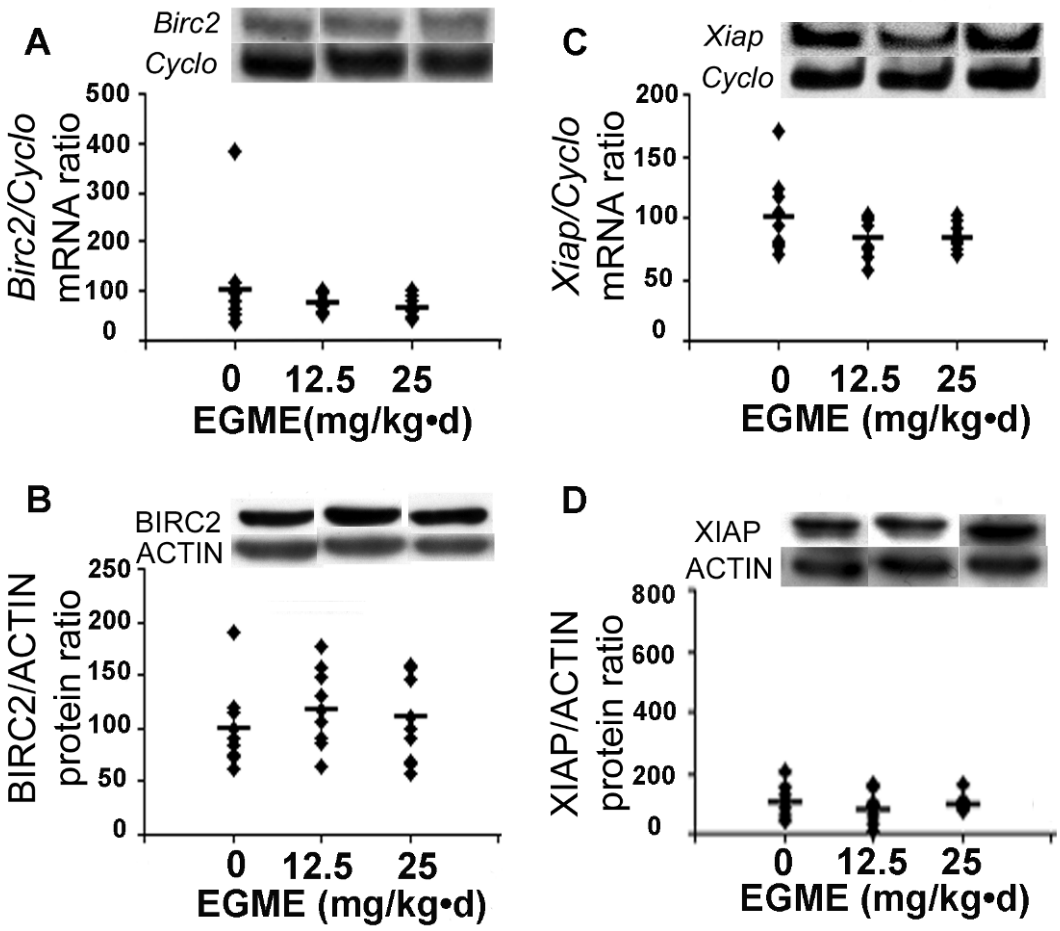
Amara et al. Fig. 2



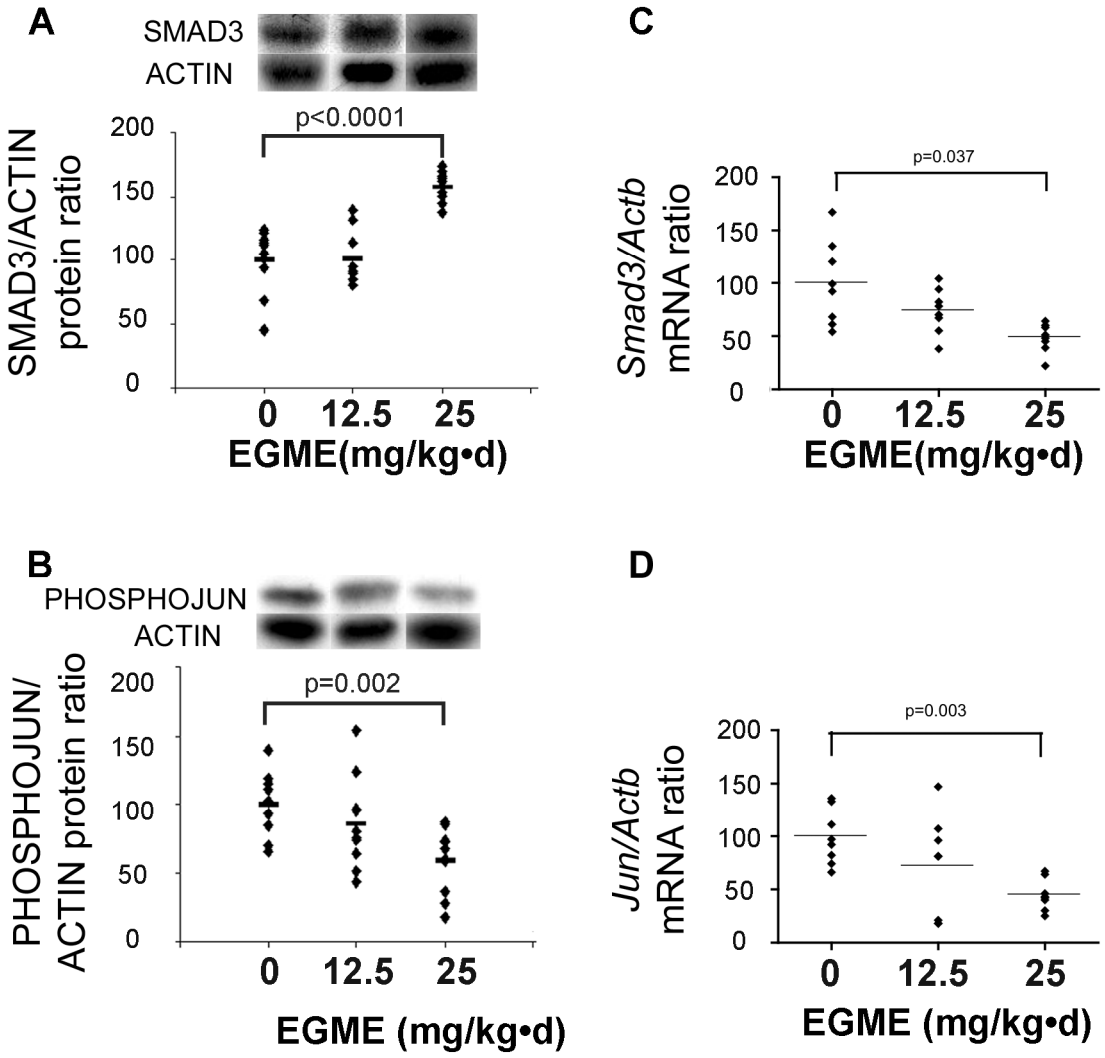
Amara et al. Fig. 5



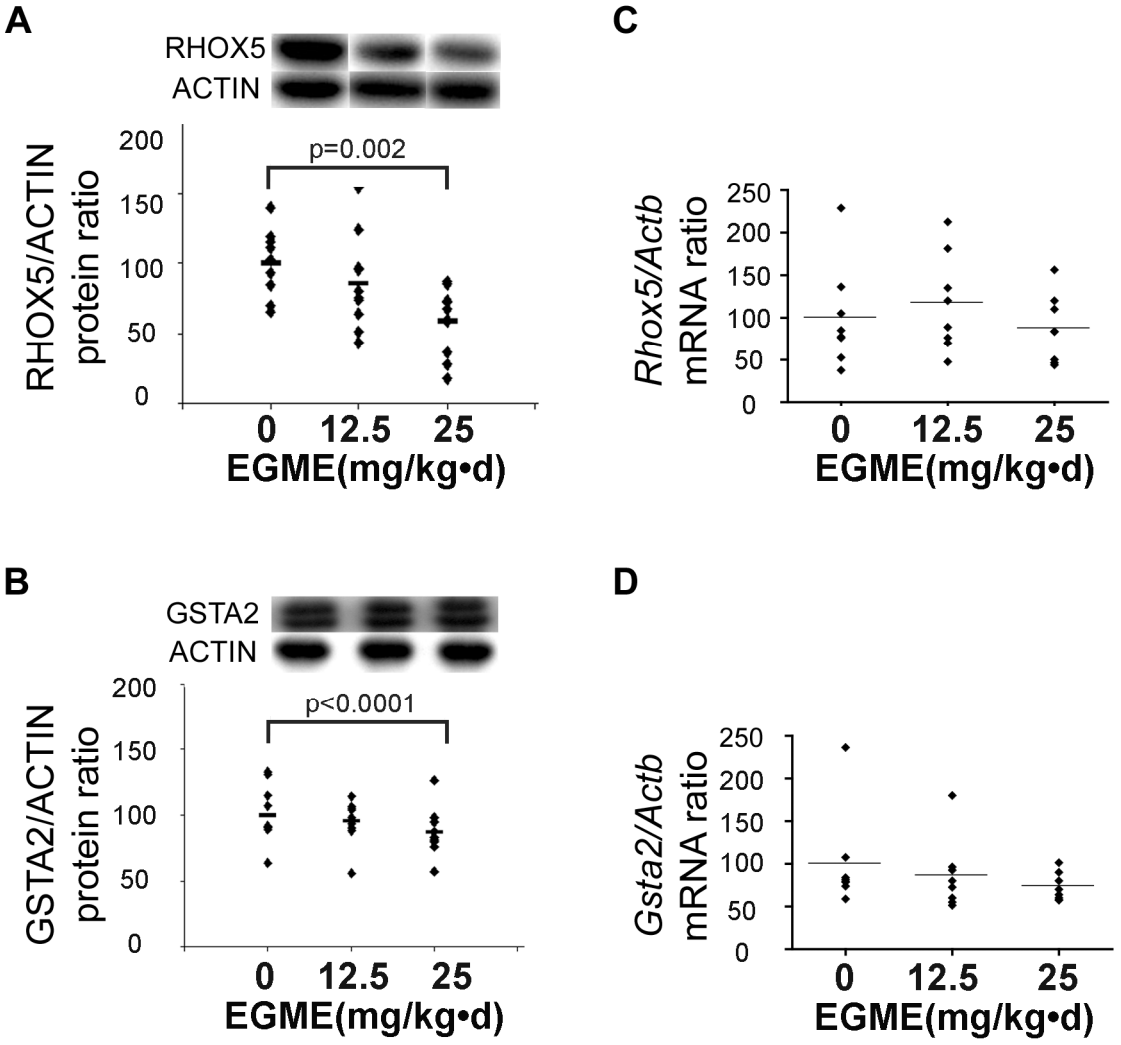
Amara et al. Fig. 4



Amara et al. Fig. 5



Amara et al. Fig. 6



Amara et al. Fig. 7

Résumé en français :

Un certain nombre d'études épidémiologiques ont montré au cours des cinquante dernières années une augmentation des infertilités, des malformations de l'appareil reproducteur masculin et des cancers testiculaires. Une des hypothèses est que, l'exposition durant la vie fœtale ou néonatale à des composés présents dans l'environnement capables d'interférer avec le système hormonal (perturbateurs endocriniens), serait responsable de l'augmentation de l'incidence de ces pathologies. Les molécules qui sont suspectées d'avoir des effets néfastes à long terme sur le tractus génital mâle possèdent des activités de type estrogénique ou antiandrogénique. Parmi les mécanismes impliqués dans l'effet à long terme, un certain nombre d'auteurs mettent en avant l'intervention de mécanismes de type épigénétiques. Dans ce contexte, nous avons utilisé deux types de modèles expérimentaux reposant sur l'exposition développementale de rats à ces composés : un modèle d'exposition néonatale à un estrogène (estradiol benzoate) et un modèle d'exposition fœtale à un antiandrogène (flutamide). Les deux modèles expérimentaux induisent chez le rongeur un phénotype d'hypospermatogenèse. Dans le cas de l'exposition néonatale à l'estradiol benzoate nous montrons que l'hypospermatogenèse observée chez les animaux à l'âge adulte est due à l'activation chronique de l'apoptose des cellules germinales testiculaires. Cette apoptose mettrait en jeu, par un mécanisme post-transcriptionnel, la diminution à long terme de l'expression de protéines clés de la machinerie épigénétique de méthylation de l'ADN, les ADN méthyltransférases (DNMT 3A, 3B et 1), et du facteur antiapoptotique, MCL-1. D'un point de vue fonctionnel, la chute d'expression des DNMTs se traduit notamment par l'augmentation d'expression des éléments transposables *LINE-1* et du gène *Ibtk* normalement contrôlés par méthylation de l'ADN. En amont, la chute d'expression des DNMTs et de MCL-1 serait dépendante de l'augmentation d'expression d'autres effecteurs épigénétiques, les microRNAs de la famille miR-29. Dans le cas, de l'exposition in utero au flutamide, notre travail indique que l'apoptose chronique des cellules germinales serait liée à la diminution à long terme de l'expression des inhibiteurs d'apoptose cIAP1 et cIAP2, et une augmentation d'expression de leur inhibiteur SMAC/DIABLO. En revanche, l'absence de mort des cellules somatiques testiculaires (Sertoli et Leydig) dans ce modèle serait due à l'augmentation d'expression spécifiquement dans ces cellules des inhibiteurs d'apoptose XIAP et SURVIVIN. Par ailleurs, le phénotype d'apoptose observé à l'âge adulte impliquerait également une altération précoce de l'expression des DNMTs.
En conclusion, nous apportons une réponse mécanistique au phénotype de programmation fœtale/néonatale d'apoptose des cellules germinales testiculaires adultes. En effet, l'augmentation des miR-29s provoquerait : (1) une chute d'expression des DNMTs altérant ainsi le profil de méthylation des gènes, et (2) une chute d'expression de facteurs protégeant les cellules germinales contre l'apoptose comme le facteur MCL-1.

Titre en anglais :

Involvement of epigenetic and apoptotic effectors in the hypospermatogenesis induced by endocrine disruptors.

Résumé en anglais :

During the five past decades, a number of epidemiological studies have indicated a higher incidence of infertility problems, male reproductive tract abnormalities and testicular cancers. Among the different hypotheses proposed, fetal or neonatal exposure to environmental compounds that can interfere with endocrine system, termed endocrine disruptors, may be at the origin of the rising incidence of these diseases. The molecules that are supposed to have long term adverse effects on the male genital tract have estrogenic or antiandrogenic properties. Some authors have suggested that the long term effects of endocrine disruptors could be mediated through epigenetic mechanisms. In this context, we have used two types of experimental models based on developmental exposure to these compounds: one model of neonatal exposure to an estrogen (estradiol benzoate) and another model of fetal exposure to an antiandrogen (flutamide). The two experimental models induce a phenotype of hypospermatogenesis in rodents. In the context of neonatal exposure to estradiol benzoate we show that the hypospermatogenesis observed in adult animals is the consequence of a chronic activation of the apoptotic process of testicular germ cells. This cell death process seem to involve the decrease of the key epigenetic effectors of DNA methylation machinery DNA methyltransferases (DNMT3A, 3B & 1), and of the antiapoptotic protein MCL-1 through post transcriptional mechanisms. In term of functional consequences the decrease of DNMTs proteins leads to increased expression of transposable element *LINE-1* and *Ibtk* gene that are normally controlled by DNA methylation. Upstream DNMTs and MCL-1 decrease may be triggered by the increase of other epigenetic factors, the microRNAs belonging to miR-29 family. Concerning in utero exposure to flutamide, our work indicate that the chronic apoptotic process of germ cells may be linked to long term decrease of the inhibitors of apoptosis cIAP1 & 2, and an increase of proapoptotic factors SMAC/DIABLO. On the other hand, the lack of testicular somatic cell death in this model may be the result of higher expression of inhibitors of apoptosis XIAP and SURVIVIN in these cells. Besides, the apoptotic process observed at the adult age may also involve a precocious alteration of DNMTs expression. In summary, our work provides a mechanistic view to the fetal/neonatal programming of adult germ cell death. Indeed, the increased levels of miR-29s may induce: (1) a decrease in DNMTs expression levels that consequently could alter the methylation pattern of some genes, and (2) a decrease in factors that normally prevent germ cells death such as MCL-1.

Discipline :
BIOLOGIE

Mots-clés :
Perturbateurs endocriniens, infertilité, cancer, testicule, épigénétique, apoptose, ADN méthyltransférases, microRNAs, programmation développementale, cellules germinales, hormones, reproduction.

Intitulé et adresse du laboratoire :

INSERM U895, Centre Méditerrannéen de Médecine Moléculaire (C3M), Equipe 5 « Environnement, reproduction et cancers hormono-dépendants », Bâtiment Archimed, 151 route de St-Antoine-de-Ginestière, B.P. 2 3194, 06204 - NICE CEDEX 3