



**HAL**  
open science

# Programmation néonatale de l'infertilité mâle : rôle de la dérégulation de l'expression des microARNs dans l'apoptose des cellules germinales

Nadjem Lakhdari

## ► To cite this version:

Nadjem Lakhdari. Programmation néonatale de l'infertilité mâle : rôle de la dérégulation de l'expression des microARNs dans l'apoptose des cellules germinales. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T096 . tel-01061771

**HAL Id: tel-01061771**

**<https://theses.hal.science/tel-01061771>**

Submitted on 8 Sep 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.

Université Paris-Sud

École doctorale : Signalisation et Réseaux intégratifs en biologie

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 19/12/2013

par

**Nadjem LAKHDARI**

Discipline : Biologie

Programmation néonatale de l'infertilité mâle : rôle de la dérégulation de l'expression des microARNs dans l'apoptose des cellules germinales.

Directeur de thèse : Mohamed BENAHMED      Directeur de recherche (INSERM U1065)

Composition du jury :

*Président du jury :*

Jean-François MICHIELS Professeur des Universités - praticien Hospitalier (*Université de Nice-Sophia-Antipolis*)

*Rapporteurs :*

Clément JIMENEZ

Professeur des Universités - praticien Hospitalier (Université de Bordeaux)

Bernard MARI

Directeur de recherche (UMR 6097 CNRS / UNSA)

*Examineurs :*

Michele TRABUCCHI

Chercheur (INSERM U1065)

Michel URTIZBEREA

Responsable Service Homologation (BASF Agro, Lyon)

Claire MAUDUIT

Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier (Université Claude Bernard Lyon 1)



# Remerciements

*La thèse a été pour moi une véritable aventure humaine inoubliable durant laquelle j'ai rencontré de nombreuses personnes formidables.*

*Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Je souhaite remercier Pr. MICHIELS Jean-François de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je remercie tout particulièrement le Pr. JIMENEZ Clement et le Dr. MARI Bernard d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le Dr. TRABUCCHI Michele, Dr URTIZBEREA Michel et Dr. MAUDUIT Claire d'avoir accepté d'être examinateurs de mon travail.*

*Je souhaite adresser mes remerciements à la société BASF et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie pour avoir financé cette thèse dans le cadre d'une convention CIFRE.*

*Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Mohamed BENAHMED pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je tiens à le remercier pour les discussions scientifiques (et non scientifiques) enrichissantes échangées, pour le temps qu'il m'a consacré, pour m'avoir transmis ses connaissances, son esprit d'analyse critique et sa rigueur scientifique. Je le remercie surtout pour sa grande disponibilité, sa patience à toute épreuve, pour m'avoir fait confiance et encouragée dans les moments de doute, pour son ouverture d'esprit en général. J'ai beaucoup appris à ses côtés.*

*J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Michel Urtizberea pour sa gentillesse, sa bonne humeur et sa générosité. Merci Michel pour vos mails.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr. Claire Mauduit. Je vous remercie très chaleureusement. Sans vous, ma thèse n'aurait probablement pas pu être possible. Merci pour m'avoir aidé dans les manipes. Merci également pour les corrections et la préparation de soutenance de ma thèse. Enfin, merci pour votre gentillesse. J'ai vraiment apprécié de travailler avec vous. Merci pour tout ce que vous avez fait Claire.*

*Je remercie le Dr Yannick Le Marchand-Brustel et Patrick Auberger qui ont dirigé le Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) au sein duquel j'ai fait ma*



*thèse (Merci Yannick, de m'avoir loué un appartement sans garant (c'est vraiment gentil de votre part)).*

*Je remercie tous mes amis pour les moments partagés en dehors de la thèse, pour leur amitié et leur soutien. Une pensée particulière pour Béna et Zezou. Merci à tous les membres passés et présents de l'équipe 5, nous ne sommes pas très nombreux donc le tour sera rapide, mais ce qui compte ce n'est pas la quantité c'est la qualité. Je remercie mes anciens collègues: Basma, Aurelie, Léo et Nicolas pour le temps passé en leur compagnie. Merci à Aurélie pour son aide pendant les premier mois de ma thèse et à Basma pour son amitié. Merci à Lolita, Stéphanie, Aurilien, Tom, Brane. Un grand merci à Lilia, Nathalie (la spécialiste des gâteaux !), Rachel, Jannine. Merci pour les bons moments partagés. Je leur souhaite à tous bonne chance pour la suite.*

*J'ai croisé de nombreuses autres personnes au sein de C3M avec qui j'ai eu des échanges amicaux. Je pense à nos voisins du couloire : Dr. Michele TRABUCCHI, Emelie, Nadra. Je pense aussi à Ali, Emilie, Mohamed, Tijana, Jean, Nadia, Stiven, Mickael, Bernard, Mamadou, Laurène ... et j'en oublie surement beaucoup, qu'elles m'en excusent. Je les remercie toutes pour leur sympathie et leur gentillesse.*

*Je remercie tous mes amis pour les moments partagés en dehors de la thèse, pour leur amitié depuis de nombreuses années et leur soutien. Merci à Djemel, Samir, Zakaria...*

*Merci à ma famille. Tout d'abord, mes parents qui m'ont porté du début jusqu'à la fin de ma thèse. Votre soutien et votre foi en moi ont constitué pour moi le véritable moteur de ma thèse. Je vous dédie ce travail. Merci à mon frère et mes sœurs: Mohamed, Zahira, Souhila et petite sœur: Rania.*

*A ma femme Sofia pour la patience et le soutien dont elle a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse. Je n'aurai jamais assez de ces quelques lignes dans ce manuscrit pour te remercier pour ton amour. Tu m'as donné le meilleur cadeau de ma vie: avec l'arrivé de Iness, ma vie a changé. Tu es contente que cette thèse s'achève enfin, car il faut passer aux nouveaux projets !*



# *Table des matieres*

Remerciements.....	2
Table des matieres.....	5
Table des illustrations et tableaux.....	10
Liste des abreviations.....	13
Résumé de la thèse.....	16
Avant-propos.....	18
<b>I. Etude bibliographique.....</b>	<b>20</b>
<b><i>1. Tractus génital mâle</i></b> .....	<b>21</b>
1.1 Anatomie.....	21
1.1.1 Généralités.....	21
1.1.2 Les testicules.....	21
1.2 Histologie et fonctions des testicules.....	22
1.2.1 Les tubes séminifères.....	22
1.2.1.1 L'enveloppe péritubulaire.....	22
1.2.1.2 Les cellules de Sertoli.....	23
- Rôle structural.....	23
- Rôle dans la progression des cellules germinales.....	23
- Rôle trophique.....	23
- Rôles sécrétoires.....	23
1.2.1.3 La spermatogénèse.....	25
- La phase proliférative.....	26
- La phase méiotique.....	27
- La spermiogénèse.....	27
1.2.2 L'espace interstitiel et sa fonction.....	28
1.2.2.1 L'espace interstitiel.....	28
1.2.2.2 La fonction endocrine des cellules de Leydig.....	29
1.3 Régulation de la spermatogénèse.....	32
1.3.1 Régulation hormonale.....	32
1.3.2 La régulation paracrine.....	34
<b><i>2. Infertilité masculine</i></b> .....	<b>37</b>
2.1 Définition.....	37

2.2	Causes d'infertilité masculine .....	37
2.2.1	Les causes dites « excrétoires » ou « obstructives » .....	37
-	L'infertilité obstructive congénitale .....	37
-	L'infertilité obstructive acquise .....	37
2.2.2	Les causes non obstructives dites « sécrétoires » .....	37
2.3	Diagnostic .....	38
2.3.1	L'anamnèse et l'examen clinique .....	38
2.3.2	Le spermogramme .....	39
A)	Le volume .....	39
B)	Le PH .....	39
C)	La numération .....	40
D)	La mobilité .....	40
E)	La vitalité .....	40
F)	La morphologie .....	40
G)	L'analyse de certains marqueurs spécifiques .....	40
2.3.3	Bilan hormonal .....	40
2.3.4	Examens radiologiques .....	41
2.3.5	Bilan génétique .....	41
2.3.6	Biopsie testiculaire .....	42
-	Forme primitive .....	43
-	Forme acquise dite « mixte » .....	44
2.3.7	Examens complémentaires .....	45
-	Études de la méiose .....	45
-	Étude de l'expression des gènes spécifiques .....	45
2.4	Moyens thérapeutiques .....	46
<b>3.</b>	<b><i>Le concept: de l'origine développementale de pathologies adultes</i></b> .....	<b>48</b>
3.1	Définition du concept .....	48
3.2	Programmation des anomalies du tractus génital mâle (Syndrome de Dysgénésie Testiculaire (SDT)) .....	49
3.2.1	Mise en évidence du SDT .....	49
3.2.2	Origine du SDT .....	49
3.3	Les PEEs dans la programmation du SDT ? .....	50
3.4	Mécanismes .....	52
<b>4.</b>	<b><i>Les Perturbateurs endocriniens environnementaux</i></b> .....	<b>54</b>
4.1	Définition .....	54
4.2	Classification .....	54
4.2.1	Selon l'origine .....	54
4.3	Mécanismes d'actions .....	55

4.3.1	Mécanisme hormonal .....	56
4.3.2	Mécanismes épigénétiques.....	56
4.4	Effets des PEs sur le testicule .....	58
4.4.1	Perturbateurs endocriniens synthétiques .....	58
4.4.2	Les Perturbateurs endocriniens d'origine naturelle.....	63
<b>5.</b>	<b><i>Apoptose des cellules germinales mâles</i></b> .....	<b>68</b>
5.1	Apoptose et homéostasie tissulaire .....	68
5.1.1	Phase d'initiation .....	69
5.1.2	Phase effectrice .....	69
5.1.3	Phase de dégradation.....	70
5.2	L'apoptose au cours de la spermatogenèse .....	70
-	Protéines de la famille de Bcl2 et p53.....	70
-	Protéines BARD1.....	71
-	Protéine Survivine.....	71
-	Protéines Fas.....	71
<b>6.</b>	<b><i>Les protéines de choc thermique (HSPs)</i></b> .....	<b>74</b>
6.1	Réponse au stress .....	74
6.2	Classification et fonctions des HSPs.....	75
6.2.1	La famille HSP70.....	75
-	Régulation de l'expression de HSPA2 dans le testicule.....	79
6.2.2	La Famille des petites protéines de stress (Small Hsps) .....	80
1.4	Les motifs consensus Heat Shock Element-HSE.....	84
1.5	Les facteurs de transcription du choc thermique.....	84
6.2.3	La protéine HSF1 .....	86
-	HSF1 dans le testicule.....	89
6.2.4	La protéine HSF2.....	90
1.6	Interactions fonctionnelles entre les HSFs .....	91
<b>7.</b>	<b><i>Les effecteurs épigénétiques</i></b> .....	<b>94</b>
7.1	Généralités .....	94
7.1.1	L'épigénétique .....	94
7.1.2	Les différentes formes de régulation épigénétique.....	94
7.1.3	Les Petits ARN (non codants) régulateurs .....	95
7.2	Synthèse des miARNs.....	100
7.2.1	Transcription des miARNs.....	100
7.2.2	Maturation du pri-miARN .....	100
7.2.3	Export cytoplasmique .....	102
7.2.4	Maturation du pré-miARN.....	102

7.2.5	Modes d'actions de miARNs .....	103
-	Régulation de l'initiation de la traduction.....	106
-	Répression post-initiation .....	107
7.2.6	Régulation de la biogenèse des miARNs .....	111
7.2.7	La stabilité des miARNs .....	124
7.2.8	Transport de miARNs .....	130
-	Les exosomes .....	130
-	Les microparticules .....	131
-	Lipoprotéine.....	131
-	Les protéines d'Argonaute 2.....	131
<b>8.</b>	<b><i>Les miARNs dans des évènements biologiques</i></b> .....	<b>133</b>
8.1	Généralités .....	133
8.1.1	Les miARNs dans les processus biologiques.....	133
8.1.2	Les miARNs et le cancer .....	134
8.2	Rôle des miARNs dans l'appareil génital mâle .....	137
8.2.1	Rôle des protéines de biogénèse des miARNs.....	137
a)	DROSHA.....	138
b)	DGCR8 .....	139
c)	DICER .....	139
d)	PROTEINES AGO .....	141
8.2.2	Rôle des miARNs dans la différenciation sexuelle.....	142
8.2.3	Rôle des miARNs dans spermatogénèse.....	142
8.3	MiARNs et cancer du testicule .....	147
<b>9.</b>	<b><i>Les miARNs sont-ils de nouveaux biomarqueurs et/ou cibles thérapeutiques?</i></b> .....	<b>151</b>
9.1	Généralités .....	151
9.1.1	Les caractéristiques d'un biomarqueur .....	151
9.1.2	Les avantages des miARNs.....	151
9.1.3	Les limites d'utilisation des miARNs .....	152
9.2	Utilisation des miARNs dans la toxicologie .....	154
9.3	Les miARNs sont des biomarqueurs circulants .....	161
9.3.1	MiARNs biomarqueurs dans les pathologies testiculaires .....	162
9.4	MiARNs comme outil thérapeutique .....	164
<b>II.</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>165</b>
1-	<b>Le modèle expérimental:</b> exposition néonatale à un estrogénomimétique : .....	168

2-	<b>Article n°1:</b> 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 MCL1.....	169
	Résumé de l'article .....	169
3-	<b>Article n°2:</b> L'altération des voies miR-29, miR-18a et réponse au choc thermique est impliquée dans l'infertilité masculine : mécanismes d'action et biomarqueurs.....	183
	Résumé de l'article.....	183
	<b>III. Discussion</b> .....	221
	<b>IV. Conclusion</b> .....	232
	<b>V. Perspectives</b> .....	234
	<b>VI. Références bibliographiques</b> .....	236
	<b>VII. Annexes</b> .....	266

# *Table des illustrations et tableaux*

<i>Figure 1. Structure de l'appareil reproducteur masculin chez l'homme.</i> .....	21
<i>Figure 2. Représentation schématique de la structure interne du testicule.</i> .....	22
<i>Figure 3. Structure dimérique des inhibines et activines.</i> .....	24
<i>Figure 4. Les évènements cellulaires au cours des différentes phases de la spermatogenèse.</i> .....	26
<i>Figure 5. Schéma de spermiogenèse.</i> .....	28
<i>Figure 6. Biosynthèse des stéroïdes sexuels chez l'homme</i> .....	29
<i>Figure 7. Contrôle hormonale de spermatogenèse.</i> .....	32
<i>Figure 8. Les modes d'action de FSH et la testostérone (T) sur la spermatogenèse</i> ...	33
<i>Figure 9. Production de l'Activine et de l'inhibine et de leurs récepteurs</i> .....	34
<i>Figure 10. Schéma du chromosome Y qui indique la position approximative des microdélétions de locis AZFa et AZFb.</i> .....	41
<i>Figure 11. Spermatogenèse normale chez l'homme.</i> .....	42
<i>Figure 12. Biopsies testiculaires à hypospermatogenèse complète.</i> .....	43
<i>Figure 13. Biopsies testiculaires avec syndrome de régression sertolienne (SCOS).</i> .....	43
<i>Figure 14. Biopsies testiculaires avec arrêts de maturation des cellules germinales.</i> .....	44
<i>Figure 15. Le syndrome de dysgénésie testiculaire. CIS: carcinome in situ. D'après [69]...</i>	50
<i>Figure 16. Les mécanismes épigénétiques impliqués dans la programmation des maladies adultes</i> .....	52
<i>Figure 17. Différences de structure entre l'estradiol, le diéthylstilbéstrol et le bisphénolA.</i> ...	58
<i>Figure 18. Les voies métaboliques de vinclozine chez le rat.</i> .....	60
<i>Figure 19. Structure de Flutamide et son métabolite (2-Hydroxyflutamide).</i> .....	61
<i>Figure 20. Structure de Prochloraz.</i> .....	62
<i>Figure 21. Structure moléculaire de la génistéine (à gauche) et du 17β-oestradiol (à droite).</i> .....	63
<i>Figure 22. Structure de la zéaralénone et ses dérivés comparée à l'estradiol (E2).</i> .....	65
<i>Figure 23. Les voies de l'apoptose. Schéma montrant les voies apoptotiques.</i> .....	68
<i>Figure 24. Schéma des niveaux où les molécules pro et anti-apoptotiques peuvent impliquées dans la régulation de l'apoptose de cellules germinales.</i> .....	72
<i>Figure 25. Structure et organization des domaines de Hsp70.</i> .....	76
<i>Figure 26. Modulation de l'apoptose par les HSPs.</i> .....	77
<i>Figure 27. Structure générale des sHSP.</i> .....	81
<i>Figure 28. Modulation de l'apoptose par HSPB1 (HSP27). D'après [282]</i> .....	83
<i>Figure 29. Représentation du motif HSE. D'après [284]</i> .....	84
<i>Figure 30. Structure des différents HSFs humains. Adapté d'après [288].</i> .....	85



<b>Figure 31.</b> Structure de HSF1 et ces différents sites de phosphorylation..	86
<b>Figure 32.</b> Modèle de régulation du facteur HSF1.	87
<b>Figure 33.</b> Structure de HSF1 et HSF2..	90
<b>Figure 34.</b> Les différentes interactions entre HSFs	92
<b>Figure 35.</b> Les différentes formes de régulation épigénétique. D'après [314].	94
<b>Figure 36.</b> La voie de la biogénèse des siARNs..	96
<b>Figure 37.</b> Schéma de la biogénèse des piARNs..	97
<b>Figure 38.</b> Représentation de la structure d'un duplex miARN..	99
<b>Figure 39.</b> Biogénèse des miARNs..	99
<b>Figure 40.</b> Maturation du pri-miARN (voie canonique).]	100
<b>Figure 41.</b> Les différentes voies de la biogénèse des miARNs indépendante de Drosha..	101
<b>Figure 42.</b> Les différentes voies de la biogénèse des miARNs indépendante de Dicer...	103
<b>Figure 43.</b> Principes de l'interaction miARN/ARNm.	104
<b>Figure 44.</b> Appariements entre miARNs et ARNm cibles..	104
<b>Figure 45.</b> Mécanismes de la répression des ARNm cibles induite par les miARNs.....	107
<b>Figure 46.</b> Modèle d'activation de traduction de certains miARNs spécifique du cycle cellulaire.....	109
<b>Figure 47.</b> Coordination de déadenylation par GW182 et Ago..	110
<b>Figure 48.</b> Les protéines qui interagissent avec le microprocesseur..	112
<b>Figure 49.</b> Exemples de protéine régulant positivement la maturation des pri-miARN.....	113
<b>Figure 50.</b> Exemple de protéine régulant négativement la maturation des pri-miARNs. ....	114
<b>Figure 51.</b> hnRNP A1 régulent positivement et négativement la maturation des pri-miARNs..	115
<b>Figure 52.</b> Exemples de régulation de maturation des pri-miARNs par miARNs mature. ....	116
<b>Figure 53.</b> Protéines régulant positivement la maturation des pri-miARNs .....	118
<b>Figure 54.</b> Exemples des protéines régulant négativement la maturation des pri-miARN. ..	119
<b>Figure 55.</b> Exemple de protéine régulant positivement la maturation des pré-miARNs. ....	121
<b>Figure 56.</b> Exemple de protéines régulant négativement la maturation de pré-miARN. ....	122
<b>Figure 57.</b> Modèle de la stabilisation sélective de miR-122 par GLD2. ....	127
<b>Figure 58.</b> Mécanismes de transport des miARNs de cellules dans la circulation sanguine périphérique et vers les cellules cibles.....	130
<b>Figure 59.</b> Implication des miARNs dans le développement embryonnaire.....	133
<b>Figure 60.</b> Profil d'expression des transcrits codant la machinerie de biogenese de miRNAs au sein des sous-populations cellulaires du testicule.....	138
<b>Figure 61.</b> Le calendrier de la délétion du gène Dicer1 pendant la spermatogénèse est indiqué par des flèches rouges. ....	140
<b>Figure 62.</b> Trois groupes miARNs regroupés en fonction de leurs profils d'expression au cours de la spermatogénèse. ....	143
<b>Figure 63.</b> Expression des miARNs chez les patients infertiles..	163

<b>Tableau 1.</b> Principaux facteurs paracrines intratesticulaires contrôlant les cellules Leydig.....	31
<b>Tableau 2.</b> Valeurs normales du spermogramme selon les normes de l'OMS 2010. ....	39
<b>Tableau 3.</b> Relations entre causes précoces et maladies survenant à l'âge adulte décrites dans la littérature. ....	49
<b>Tableau 4.</b> Exemples de familles de molécules à effet perturbateur endocrinien et leurs sources potentielles. ....	55
<b>Tableau 5.</b> Effets épigénétiques de bisphénol A (BPA) et des phtalates.....	57
<b>Tableau 6.</b> Présentation des différentes mycotoxines. ....	65
<b>Tableau 7.</b> Les différentes protéines de la famille HSP70 (HSPA). ....	75
<b>Tableau 8.</b> Les différentes protéines de la famille des petites protéines de choc thermique (HSPB).. ....	80
<b>Tableau 9.</b> Les régulations post-traductionnelles de HSF1. ....	88
<b>Tableau 10.</b> Classement des petits ARN (sncRNA). ....	96
<b>Tableau 11.</b> Classement de miARNs selon leurs transports. ....	131
<b>Tableau 12.</b> Les miARNs et leurs cibles dans le développement embryonnaire.....	134
<b>Tableau 13.</b> Exemples de dérégulation de l'expression des protéines de la biogénèse de miARNs dans plusieurs types de cancer.....	137
<b>Tableau 14.</b> Les modèles de souris knock-out Dicer1. ....	140
<b>Tableau 15.</b> Caractérisation fonctionnelle des miARN dans spermatogénèse.. ....	147
<b>Tableau 16.</b> Caractérisation fonctionnelle des miARN dérégulés dans le cancer du testicule .....	149
<b>Tableau 17.</b> Exemples de miARNs circulants associés à différentes pathologies humaines. ....	154
<b>Tableau 18.</b> Effets des médicaments, des composés naturels ou chimiques sur l'expression des miARNs.....	160
<b>Tableau 19.</b> La concentration de l'ARN isolé à partir de différents fluides corporels et le nombre de miARNs détectés .....	161

# *Liste des abreviations*

## **A**

ABP	Androgen Binding Protein
ADN	Acide desoxyribonucleique
AGO	Argonaute
AMH	Hormone Anti-mullerienne
Apo A1	Apolipoproteine A1
AR	Recepteur aux androgenes
ARE	Element de reponse aux androgenes
ARN	Acide ribonucleique

## **B**

BAH	Bromo adjacent domain
BBP	Benzyl butyl phthalate
BMP	Bone morphogenetic protein
BPA	Bisphenol A

## **C**

CGPs	Cellules germinales primordiales
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	Dehydroepiandrosterone
DHH	Desert hedgehog
DHT	Dihydrotestosterone

## **E**

E2	Estradiol
E2F	Elongation 2 factor
EB	Estradiol benzoate
EE	Ethynil estradiol
EGF	Epidermal growth factor
EGME	Ethylene glycol monomethyl ether
ER	Recepteur aux estrogenes
ERE	Element de reponse aux estrogenes
EXP5	Exportin 5

## **F**

FGF	Fibroblast growth factor
FLU	Flutamide
FSH	Hormone folliculostimulante

## **G**

GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
------	---

Gly	Glycine
GnRH	Gonadoliberine
GPR30	G Protein-coupled Receptor 30
GW182	Glycine-tryptophan protein of 182 kDa

## H

H3K27me3	Histone 3 Lysine 27 trimethylee
H3K9me1	Histone 3 Lysine 9 monomethylee
H3K9me2	Histone 3 Lysine 9 dimethylee
HDAC	Histone deacetylase
HDL	High density lipoprotein
HMT	Histone methyltransferase
Hox	Homeobox
Hsd	Hydroxysteroid dehydrogenase

## I

IAP	Intracisternal A particle
IAPs	Inhibitors of apoptosis
Ibtk	Inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
Igf2R	Insulin-like growth factor 2 receptor
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin

## J

jpc	Jours postcoitum
jpn	Jours postnatales
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 luteinisante
LIF	Leukaemia inhibitory factor
Lys	Lysine

## M

Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MEHP	Mono (2-ethylhexyl) <i>phtalate</i>
miR	MicroARN

## N

NCoR	Nuclear corepressor
NFκB	Nuclear factor kappa B
NLS	Signal de localisation nucelaire
nt	Nucelotides

## O

ORF	Open reading frame
-----	--------------------

## P

P450	Cytochrome P450
PBD	Poly bromo domain
PCBs	Polychlorobiphenyls
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PEs	Perturbateurs endocriniens
PEEs	Perturbateurs endocriniens environnementaux
Pgk-2	Phosphoglycerate kinase 2
Pol	Polymerase
Pro	Proline
<b>R</b>	
Rasgrf1	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1
RISC	RNA-induced silencing complex
Rnase	Ribonuclease
<b>S</b>	
SCF	Stem cell factor
SDF1	Stromal cell-derived factor-1
SDT	Syndrome dysgenésie 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
<b>T</b>	
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
<b>W</b>	
WT1	Wilms tumor 1
<b>X</b>	
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
<b>Z</b>	
ZEA	Zearalenone

# *Résumé de la thèse*

Un certain nombre d'études épidémiologiques font état d'une augmentation de l'infertilité masculine durant ces cinquante dernières années, en particulier dans les pays industrialisés, mais aussi d'une augmentation des malformations de l'appareil reproducteur masculin telles que la cryptorchidie (absence de migration des testicules dans les bourses) ou l'hypospadias (malformation du pénis), et des cancers testiculaires. Des données expérimentales suggèrent que ces anomalies du tractus génital mâle sont liées. Ces symptômes forment le syndrome de dysgénésie testiculaire. Les causes d'apparition de ce syndrome semblent être d'origine environnementale. En effet, les évolutions relativement rapides de ce syndrome suggèrent des facteurs dynamiques, en lien avec le mode de vie ou l'environnement. 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 environnementaux, PEEs), serait responsable de l'augmentation de l'incidence de ces pathologies. Au banc des principaux accusés, les molécules qui possèdent des activités de type estrogénique ou antiandrogénique.

A ce jour, les mécanismes d'action à l'origine du syndrome de dysgénésie testiculaire sont encore mal connus. Certaines études suggèrent des mécanismes de type épigénétique dans les effets à long terme des PEEs.

L'objectif de notre travail était d'identifier et caractériser les mécanismes d'action de type épigénétique impliqué dans l'infertilité mâle. Pour cela, nous avons utilisé un modèle expérimental (rats nouveau-nés) reposant sur une exposition développementale à un estrogène (estradiol benzoate). Ce modèle induit chez le rat adulte un phénotype d'hypospermatogénèse liée à une apoptose chronique des cellules germinales testiculaires. Nous montrons que ce phénotype est lié à l'altération de deux voies, impliquant en amont des effecteurs épigénétiques. La première voie implique la famille des miR-29s. Ainsi, nous observons une augmentation de l'expression des miR-29a, b, c qui provoque une diminution de deux de ses cibles: la protéine antiapoptotique MCL-1 et les enzymes de méthylation de l'ADN DNMTs. La chute des DNMTs entraîne une hypométhylation globale (estimée à travers le gène Line-1) et spécifique du facteur de choc thermique HSF1. Ceci provoque une réexpression de facteurs entraînant l'apoptose des cellules germinales adultes. La deuxième voie implique le miR-18a. L'augmentation de son expression provoque une chute de l'expression de sa cible, HSF2 qui

régule la protéine de choc thermique HSP70/HSPA2. Le faible taux d'HSPA2 est une autre explication de l'apoptose des cellules germinales dans notre modèle.

Nous montrons aussi que ce phénotype est irréversible lorsque l'exposition à lieu chez le nouveau-né alors qu'il est réversible quand l'exposition à lieu à l'âge adulte. Ces données suggèrent que l'exposition néonatale à l'estradiol benzoate induit une programmation développementale de l'hypospermatogénèse.

Enfin, les anomalies tissulaires d'expression des miRNAs se retrouvent au niveau sanguin, suggérant leur utilisation potentielle comme biomarqueurs. Nous avons validé cet aspect chez l'homme en montrant que l'expression des miR29s et du miR-18a était plus élevée chez les patients oligo- ou azoospermiques que les chez patients normospermiques.

En conclusion, nos résultats indiquent que l'hypospermatogénèse due à une apoptose chronique des cellules germinales observée chez l'animal adulte après exposition néonatale à l'EB met en jeu une modification d'expression de plusieurs effecteurs épigénétiques clés: miR-29s, miR-18a et DNMTs. De plus, les miR-29s et miR-18a pourraient être de nouveaux biomarqueurs circulants non invasifs de la stérilité masculine dans le contexte d'une oligo ou azoospermie chez l'homme.

# *Avant-propos*

Une des avancées majeures dans les concepts de la médecine humaine, ces vingt dernières années, est l'hypothèse de l'origine fœtale (programmation fœtale) des pathologies chroniques de l'âge adulte, hypothèse qui remet en cause la vision traditionnelle de la pathogenèse de ces maladies. Ce concept original proposé par DJ Barker (1989) suggère que des événements survenant pendant la vie périnatale, essentiellement d'ordre nutritionnel ou métabolique, sont mémorisés par l'organisme en développement. Si ces événements sont inappropriés à la situation de l'organisme en développement, il pourra en résulter l'apparition d'une pathologie à l'âge adulte. En effet, les études épidémiologiques ont établi un lien entre le poids de naissance et les pathologies cardiovasculaires. De même, des liens ont été établis entre des événements périnataux et l'augmentation du risque d'hypertension, de dyslipémie et diabète de type II. Dans le contexte du tractus génital, un exemple bien connu de programmation fœtale est l'exposition à la molécule estrogéno-mimétique Distilbène<sup>®</sup> pendant la grossesse qui augmente le risque de cancer dans la descendance féminine et masculine.

Pour les pathologies du tractus génital mâle, il a été observé ces 50 dernières années une détérioration de la qualité et de la production de sperme, une augmentation des malformations de l'appareil reproducteur (hypospadias, cryptorchidies) et du taux de cancers testiculaires. Ces pathologies seraient liées et constitueraient le syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT). Il a été proposé que le SDT, dans le contexte du concept de Barker, soit lié à une programmation fœtale. Plus précisément, 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 environnementaux (PEEs). Ainsi, les PEEs de type estrogénique ou anti-androgénique induiraient des altérations développementales conduisant à la programmation à long terme des pathologies du tractus génital mâle (SDT).

Les modèles expérimentaux animaux ont établi que l'exposition fœtale ou néonatale aux PEEs ayant une activité estrogénique ou anti-androgénique, conduisent aux symptômes du SDT (hypospermatogénèse / infertilité, malformation de tractus génital). Des mécanismes épigénétiques pourraient rendre compte de la programmation de ces pathologies. Il est proposé que les expositions aux PEEs pendant les périodes intra-utérine et/ou néonatale puissent provoquer des changements transmissibles et cellule-spécifique de l'état de méthylation du promoteur de certains gènes de spermatogénèse. Toutefois, les arguments et évidences scientifiques manquaient.



Les objectifs de mon travail ont été de mettre en évidence le lien entre effecteurs épigénétiques (microARNs), et l'apoptose des cellules germinales testiculaires dans le contexte pathologique de la programmation développementale de l'hypospermatogenèse après une exposition néonatale à un composé estrogéno-mimétique. Pour cela, nous avons étudié la famille des miR-29s et le miR-18a. Nous avons aussi caractérisé les cibles en aval de ces miRs (protéines de l'apoptose, facteurs de transcription et protéines du choc thermique) afin de valider ces voies depuis les effecteurs épigénétiques (miR-29s, miR-18a) jusqu'au phénotype (hypospermatogenèse/apoptose des cellules germinales adultes) observé dans notre modèle expérimental. Enfin, l'objectif était aussi d'essayer d'identifier des biomarqueurs (miRNA) de l'infertilité chez l'homme.

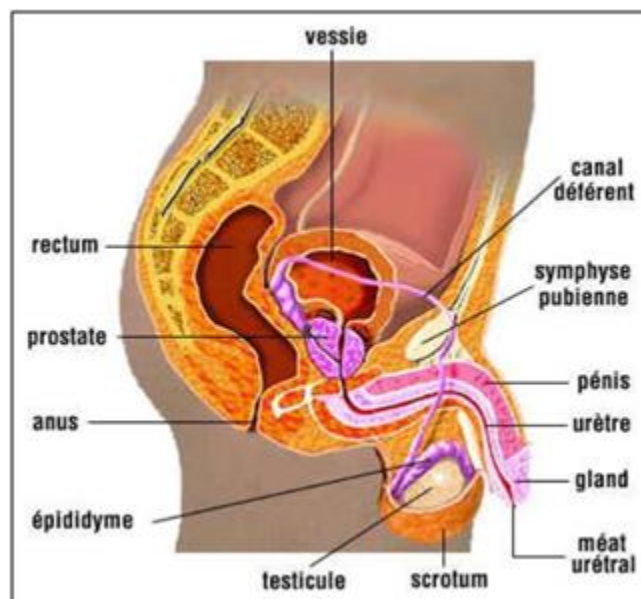
# ***I. Etude bibliographique***

# 1. Tractus génital mâle

## 1.1 Anatomie

### 1.1.1 Généralités

L'appareil reproducteur mâle (figure 1) est constitué: de deux testicules (ou gonades mâles), des voies excrétrices (canaux efférents, épидидymes, canaux déférents) permettant la sécrétion des spermatozoïdes vers l'extérieur, des glandes annexes (vésicules séminales, prostate et glandes de Cowper) sécrétrices du liquide qui permet de constituer avec les spermatozoïdes le sperme et du tractus uro-génital formé par l'urètre (prostatique, périnéal et pénien) qui s'ouvre à l'extérieur par le méat urinaire.



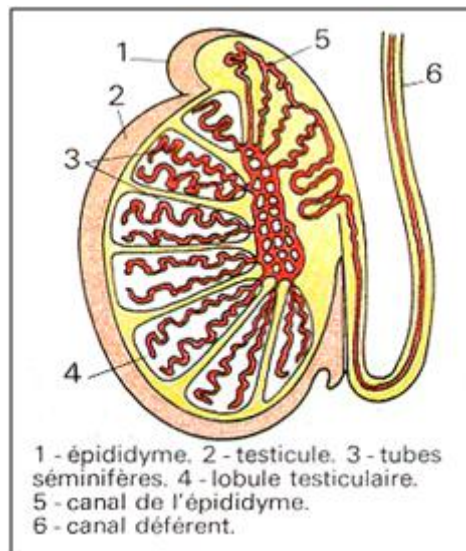
**Figure 1.** Structure de l'appareil reproducteur masculin chez l'homme.

D'après (<http://bubble5102.free.fr/fiv.htm>).

### 1.1.2 Les testicules

Les testicules sont situés en annexe de la verge, à l'extérieur de la cavité pelvienne dans une poche entourée d'une peau plissée appelée "scrotum". Ils sont directement entourés d'un tissu conjonctif solide et protecteur appelé "albuginée". Le fait que les testicules soient à l'extérieur du corps diminue leur température d'environ 2°C par rapport à la

température corporelle. Les testicules mesurent en moyenne 3x2x5 centimètres, pour un poids d'environ 18 grammes. Les testicules sont divisés en plusieurs lobules testiculaires qui contiennent les tubes séminifères, lieu de la spermatogénèse. Entre les tubes séminifères se situe le tissu interstitiel réalisant la fonction endocrine [1]Figure 2.



**Figure 2.** Représentation schématique de la structure interne du testicule.

D'après (<http://embryologie.chez-alice.fr/gametoge.html>).

## **1.2 Histologie et fonctions des testicules**

### **1.2.1 Les tubes séminifères**

Les tubes séminifères sont le lieu de la production des gamètes mâles, spermatogénèse. La paroi de chaque tube est constituée par l'épithélium séminifère, où sont associées les cellules somatiques de Sertoli et les cellules de la lignée germinale, reposant sur une enveloppe périvitubulaire ou lamina propria.

#### **1.2.1.1 L'enveloppe périvitubulaire**

L'enveloppe périvitubulaire (lamina propria) est composée d'une lame basale et de trois ou quatre couches concentriques de cellules périvitubulaires séparées par du matériel fibrillaire et collagène. Les cellules périvitubulaires, contractiles, permettent la

progression du contenu luminal vers les voies excrétrices. Les altérations de cette enveloppe sont un signe d'accompagnement constant des atteintes de la spermatogénèse [2].

### **1.2.1.2 Les cellules de Sertoli**

Ce sont des cellules fixes qui occupent toute la hauteur de l'épithélium séminifère (70 µm) et envoient des expansions autour des cellules germinales. Les cellules de Sertoli ont un rôle important pour la bonne marche de spermatogénèse.

#### **- Rôle structural**

Par les jonctions étanches qu'elles établissent entre elles vers leur pôle basal elles constituent une barrière physique séparant un compartiment basal en rapport avec l'interstitium contenant les capillaires sanguins et les cellules de Leydig et un compartiment apical, elles forment ainsi la barrière hémato testiculaire [3]. Du côté basal, les spermatogonies et les spermatocytes preleptotènes restent en équilibre avec le compartiment interstitiel. Du côté apical, les spermatocytes leptotènes, les spermatides et les spermatozoïdes baignent dans un environnement constitué d'éléments synthétisés et transportés par les cellules de Sertoli. Il en va de même pour le fluide tubulaire ou plasma séminal primitif dont la constitution est entièrement contrôlée par les cellules de Sertoli.

Le principal effet de la barrière sang-testicule est d'empêcher la reconnaissance de sites antigéniques exprimés sur les éléments de la lignée germinale à partir des stades méiotiques, par les cellules du système immunitaire maintenues en deçà du dispositif de jonctions serrées. Toute rupture importante de cette barrière, traumatique, post infectieuse, post biopsique, est à l'origine d'un processus d'auto-immunisation pouvant évoluer dans les cas sévères vers une azoospermie [4].

#### **- Rôle dans la progression des cellules germinales**

Elles exercent des fonctions mécaniques, par leur cytosquelette associé à des protéines contractiles, elles permettent aux cellules germinales de migrer au fur et à mesure de leur maturation, en direction de la lumière du tube séminifère.

#### **- Rôle trophique**

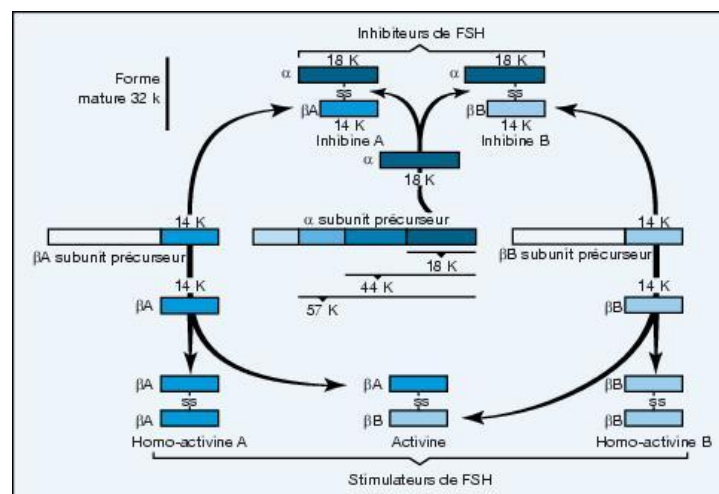
Elles exercent aussi des fonctions trophiques en assurant la maturation de la lignée germinale. Elle assure une fonction paracrines à l'égard des cellules germinales et elles sont responsables de la production du plasma séminal primitif [2, 5].

#### **- 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 secrétées 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- $\alpha$ , FGF), des facteurs autocrines et paracrines (ex: SCF, inhibin B, IL-1) et des composants de la matrice extracellulaire (ex: collagène, laminine) [5, 6]. L'une des premières protéines à avoir été identifiée est l'Androgen Binding Protein (ABP) permettant le transport de la testostérone depuis la partie basale vers les cellules germinales chez les rongeurs [7]. Parmi les protéines synthétisées par les cellules de Sertoli, nécessaires au contrôle de la prolifération, la différenciation et au métabolisme des cellules germinales:

- *L'inhibine et l'activine* sont des glycoprotéines hétérodimères (figure 3). L'inhibine est constituée de deux sousunités  $\alpha$  et  $\beta$  reliées par deux ponts disulfures. L'activine est un homodimère de 2 sous-unités  $\beta$ . Il existe une grande homologie de structure entre ces deux glycoprotéines et les facteurs de croissance de la famille du TGF $\beta$ , impliqués dans la régulation de la prolifération et différenciation cellulaire. Dans le testicule, l'inhibine et l'activine sont principalement produites par les cellules de Sertoli. La sécrétion d'inhibine par la cellule de Sertoli est directement influencée par la FSH qui stimule la production de la sous-unité  $\alpha$  sans modifier celle de la sous-unité  $\beta$  [8]. À côté de leur action hormonale sur la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires, l'inhibine et l'activine sont des facteurs paracrines, intervenant au cours du développement embryonnaire du testicule et dans la régulation des fonctions testiculaires [9]. Elles sont respectivement responsables de l'activation et l'inhibition de la stéroïdogénèse.



**Figure 3.** Structure dimérique des inhibines et activines. D'après [8]. Les formes matures des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta A$  et  $\beta B$  sont produites à partir de précurseurs qui peuvent être présents dans le sang. Sont

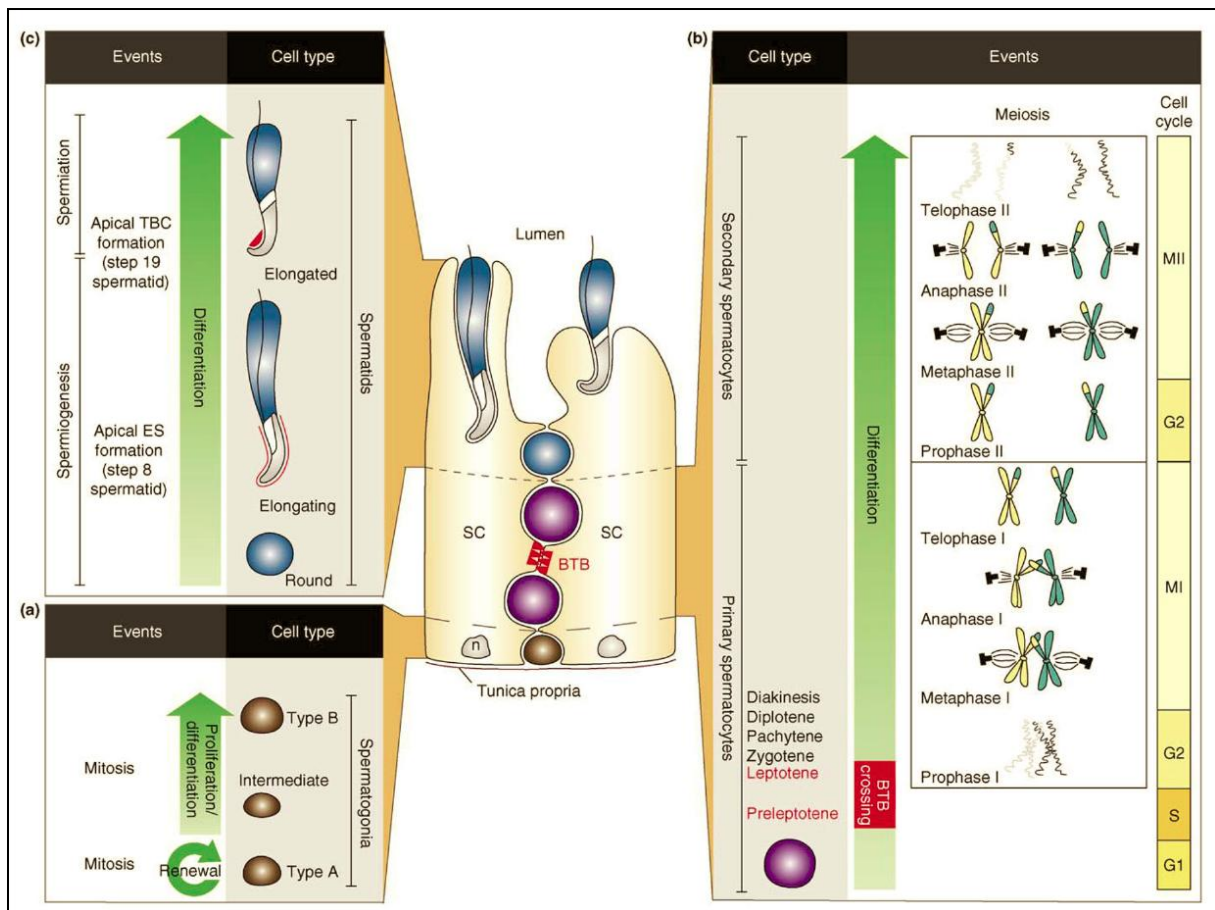
actuellement disponibles les dosages spécifiques de l'inhibine A, de l'inhibine B, de la pro-alpha-C et de l'activine A.

- **L'AMH** ou müllerian inhibiting substance (MIS) est une glycoprotéine, dont la structure la rattache à la famille des facteurs de croissance, en particulier du TGF $\beta$ . L'AMH est un dimère stabilisé par des ponts disulfures. Elle est produite par les cellules de Sertoli immatures chez le fœtus mâle sous contrôle du gène SRY. Elle est maximale à la huitième semaine [10], progressivement décroissante pendant la gestation, chez l'enfant et à la puberté, avec une variation inversement proportionnelle entre testostérone et AMH. Elle est responsable de la régression des canaux de Müller et serait un facteur de régulation paracrine de la prolifération des cellules de Leydig. Une anomalie du gène de l'AMH ou de son récepteur peut à l'origine du syndrome de persistance des canaux de Müller ou syndrome de « l'homme à utérus » [9].

### **1.2.1.3 La spermatogénèse**

Les spermatogonies souches sont, issues des cellules germinales primordiales (CGP) dérivant, elles-mêmes, de l'épiblaste. Après colonisation des crêtes génitales, les CGP seront englobées par les cellules de Sertoli formant ainsi l'ébauche des cordons séminifères, délimités par une membrane basale. Les CGP vont alors se différencier en préspermatogonies encore appelé les gonocytes. Après la naissance, les gonocytes se différencient en spermatogonies souches [11]. Entre la puberté et la sénescence, les spermatogonies souches vont permettre la production de gamètes matures haploïdes, les spermatozoïdes.

La spermatogénèse 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, génèrent des gamètes masculins haploïdes (n chromosomes), les spermatozoïdes. Ce processus de maturation des cellules germinales a lieu dans le tube séminifère. La spermatogénèse a une durée fixe pour chacune des espèces mais variable d'une espèce à l'autre (74 jours dans l'espèce humaine, 35 jours chez la souris) [12]. D'un point de vue fonctionnel, la spermatogénèse 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 spermatogénèse. D'après [13]. (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 division 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 spermiogénèse : 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 spermatogénèse reposant sur la mitose des cellules germinales souches : les spermatogonies. La division mitotique des spermatogonies de type A a lieu de manière continue et permet le maintien et le renouvellement de l'épithélium séminifère [2]. Au départ, une spermatogonie indifférenciée et isolée de type As (single) appartenant au stock de cellules germinales souches se divise de manière asymétrique



en 2 cellules filles: une spermatogonie de type  $A_s$  qui permet le maintien du pool de spermatogonies souches et une spermatogonie de type appariée  $A_{pr}$  (paired). Ces dernières subissent plusieurs cycles de divisions mitotiques successifs en passant par différents stades de spermatogonies A ( $A_{pr} \rightarrow A_{a1} \rightarrow A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow A_4$ ) et aboutit aux spermatogonies  $I_n$ , intermédiaires, qui se divisent en spermatogonies de type B. Une mitose finale des spermatogonies de type B permet de donner naissance aux spermatocytes primaires (spermatocytes I) dits préleptotènes.

### - *La phase méiotique*

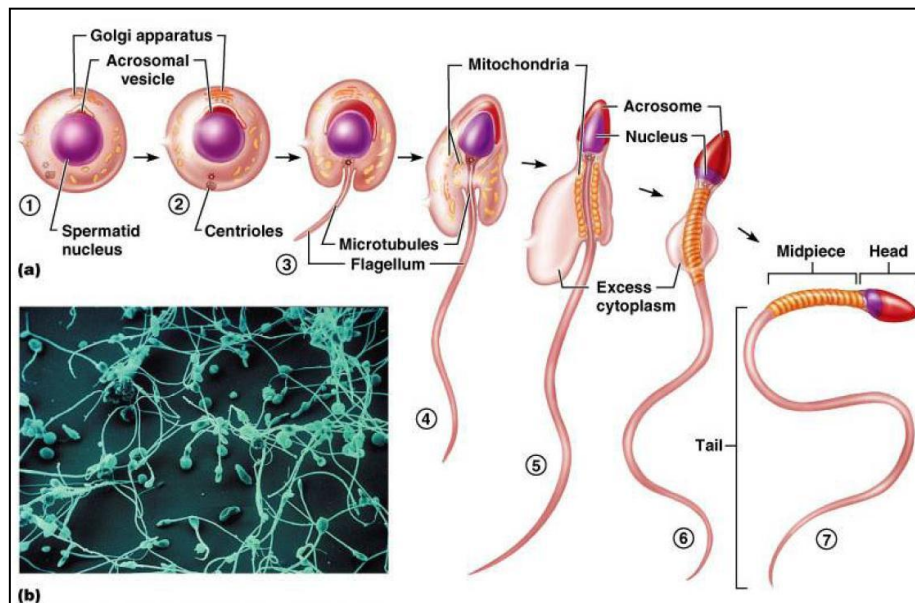
La méiose est ainsi constituée d'une succession de deux divisions cellulaires consécutives. La première division méiotique (méiose I) ou division réductionnelle comporte une prophase I longue (se subdivisant en 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacynèse), la métaphase I, l'anaphase 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 pour donner les spermatides rondes (n chromosomes, 1 chromatide)

### - *La spermiogenèse*

Au cours de cette phase les spermatides rondes immatures se différencient en spermatozoïdes (figure 5). Lors de leur différenciation en spermatozoïde, les spermatides subissent 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, les 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 développent 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, où ils se détachent de la cellule de Sertoli dans la lumière du tube séminifère, est appelée spermiation.



**Figure 5.** Schéma de spermiogenèse.

D'après (<http://www.pathofysiologie.nl/anatomie/het-mannelijk-genitale-stelsel/spermatogenese/>)

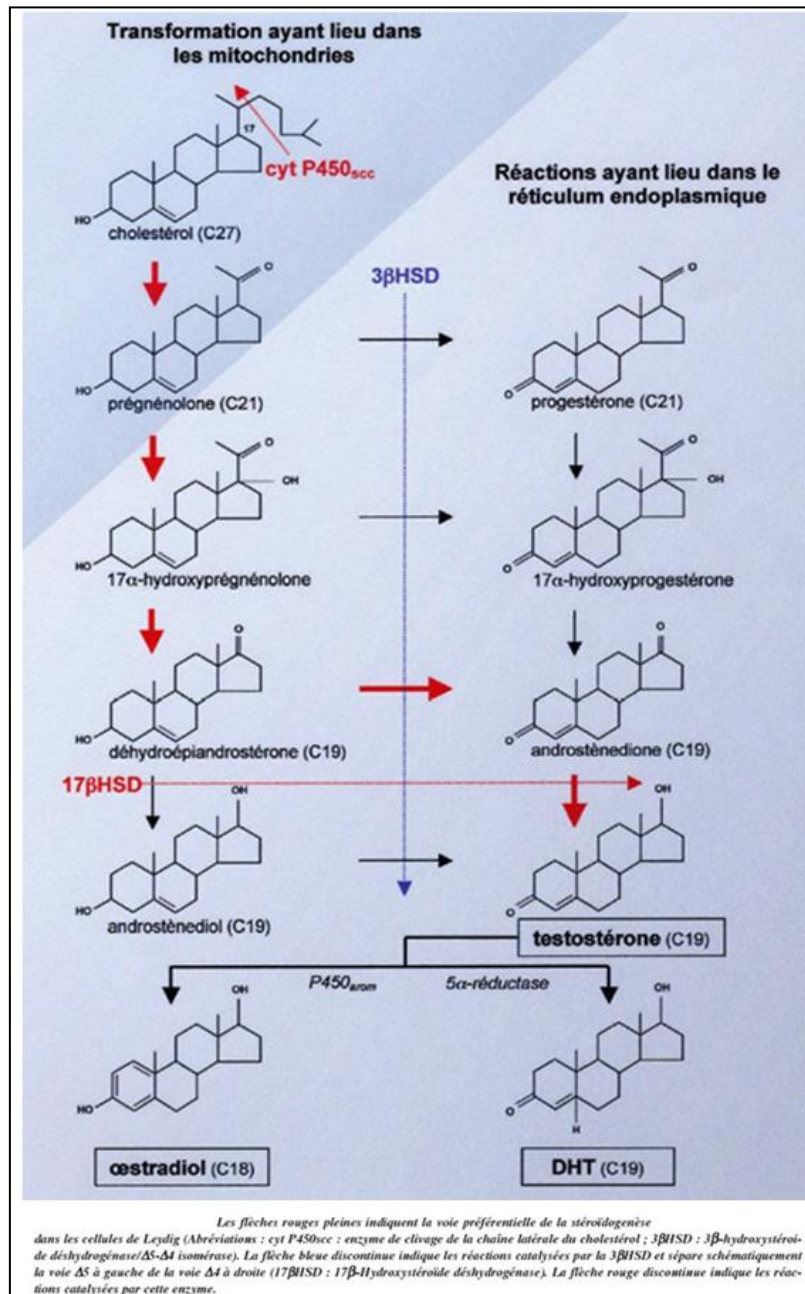
## 1.2.2 L'espace interstitiel et sa fonction

### 1.2.2.1 L'espace interstitiel

Ce compartiment est constitué par les cellules de Leydig situées dans le tissu conjonctif lâche entre les espaces intertubulaires. Sur le plan histologique, les cellules de Leydig apparaissent comme des cellules polyédriques de 10 à 15  $\mu\text{m}$  de diamètre groupées autour des capillaires sanguins et entourées par une lame basale discontinue. La présence dans le cytoplasme d'un abondant réticulum endoplasmique lisse, de nombreuses mitochondries à crêtes lamellaires ou tubulaires, d'un appareil de Golgi développé et d'inclusions lipidiques sont caractéristiques d'une activité de stéroïdogénèse. Elles renferment également des enclaves pigmentaires et des inclusions protéiques spécifiques (cristalloïdes de Reinke) [14, 15]. Les fonctions endocrines consistent de la production des hormones stéroïdes (95 % de la testostérone plasmatique) est assurée par les cellules de Leydig.

### 1.2.2.2 La fonction endocrine des cellules de Leydig

Les cellules de Leydig synthétisent la testostérone et des substances intermédiaires de testostérone. Ces hormones sont issues d'un précurseur commun, le cholestérol. Différentes enzymes permettent la transformation du cholestérol en trois principaux stéroïdes testiculaires: la testostérone, la dihydrotestostérone et le 17- $\beta$ -oestradiol (voir figure 6).



**Figure 6.** Biosynthèse des stéroïdes sexuels chez l'homme. D'après (<http://www.urofrance.org/science-et-recherche/base-bibliographique/article/html/physiologie-des-androgenes-chez-lhomme-adulte.html>).

La testostérone est le principal androgène circulant. La sécrétion globale de la testostérone est de 5 à 7,5 mg / 24h chez l'homme adulte normal. Quand à la dihydrotestostérone, c'est l'androgène actif au niveau des tissus périphériques (prostate, épидидyme, vésicule séminale) grâce à la présence de l'enzyme 5- $\alpha$  réductase dans ces tissus. Elle résulte de la réduction de la testostérone par la 5- $\alpha$  réductase. La DHT produite au sein du testicule intervient dans la régulation de la spermatogenèse mais la quantité libérée dans la circulation est négligeable au regard de la production par les tissus périphériques. Le 17- $\beta$ - estradiol sécrété par le testicule mais ne représente que 20 % du 17- $\beta$ - estradiol circulant (le reste provenant de la conversion périphérique de la testostérone).

Les androgènes ont pour principales fonctions la différenciation sexuelle masculine, le développement des organes génitaux internes et externes (action conjointe de l'AMH), le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires. La testostérone agit directement pour la différenciation des canaux de wolff, le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires. Mais la testostérone doit être métabolisée en DHT pour induire la virilisation du sinus urogénital et des organes génitaux externes, le développement de la prostate et du follicule pilosébacé à la puberté. La testostérone a, par ailleurs, une action anabolisante au niveau de tous les tissus, en particulier musculaire et osseux, et intervient dans le dimorphisme sexuel cérébral et la physiologie du comportement sexuel. En association avec la FSH, la testostérone est essentielle pour l'initiation et le maintien de la spermatogenèse. Elle agit sur les cellules de Sertoli, et sur les cellules péricubulaires, via des récepteurs spécifiques, stimulant indirectement la spermiogenèse par une voie paracrine.

De études récentes on constaté que la modification du ratio testostérone/oestradiol peut être responsable de développement d'une gynécomastie, voir même une infertilité. Les cellules de Leydig produisent aussi de nombreux peptides et facteurs de croissance qui participent à la régulation paracrine des fonctions testiculaires [16] (tableau1).

Facteur	Site de production	Mise en évidence	Régulation	Cellules de Leydig	
				Récepteur	Effets
Facteur(s) stéroïdogène(s)	S	Protéine	FSH / (S)	ND	/ stéroïdogénèse
Facteur(s) inhibiteur(s) de la stéroïdogénèse	S	Protéine		ND	\ fonctions différenciées
IGF-1	L, S	ARNm Protéine	FSH / (S) hCG / (L)	+	/ fonctions différenciées
TGFβ	L, S, P	ARNm Protéine	FSH \ (S)	+	\ fonctions différenciées
EGF/TGFα	L, S, G, P	ARNm Protéine	?	+	/ stéroïdogénèse \ fonctions différenciées
FGF	L, S, G, P	ARNm Protéine	FSH / (S)	+	\ fonctions différenciées
NGF	G	ARNm Protéine	?	?	?
PDGF	L	Protéine	/ hCG (L)	+	\ fonctions différenciées
Inhibine/Activine	L, S	ARNm Protéine	FSH / (S) hCG / (L)	+	Inhibine / stéroïdogénèse Activine \ stéroïdogénèse
Interleukine 1	L, S, M	ARNm Protéine	LPS / (S) hCG et LPS / (L)	+	\ fonctions différenciées
Interleukine 2	M, G	ARNm Protéine	?		
TNF-α	G	ARNm	?	ND	Stimulant: rat Inhibiteur: porc, souris
Interleukine 6	L, S	ARNm Protéine	FSH, IL 1, LPS / (S) hCG et LPS / (L)		
GHRH	L, G	ARNm Protéine	hCG / (L)	ND	Stimulant ou sans effet
CRF	L	ARNm Protéine	hCG / (L)	+	\ stéroïdogénèse stimulée par LH
AVP	L, S	ARNm Protéine	-	+	Effet aigu / stéroïdogénèse \ fonctions différenciées
A-II	L	Protéine		+	Inhibition
Endothéline	S	ARNm Protéine	FSH \ (S)	+	/ stéroïdogénèse
POMC	L	ARNm Protéine	LH / (S)		?

**Tableau 1.** Principaux facteurs paracrines intratesticulaires contrôlant les cellules Leydig.

D'après [17]. Abréviations: A-II: angiotensine II; AVP: arginine-vasopressine; CRF: corticotropin-releasing factor; EGF: epidermal growth factor; FGF: fibroblast growth factor; FSH: follicle stimulating hormone; G: cellules germinales; GHRH: growth hormone releasing factor; hCG: human chorionic gonadotropin; IGF-1: insulin-like growth factor 1; L: cellules de Leydig; LH: luteinizing hormone; LPS: lipopolysaccharides; M: macrophage; ND: non déterminé; NGF: nerve growth factor; P: cellules péritubulaires; PDGF: platelet-derived growth factor; POMC: proopiomélanocortine; S: cellules de Sertoli; TGFβ ou α: transforming growth factor β or α; TNF-α: tumor necrosis factor α.

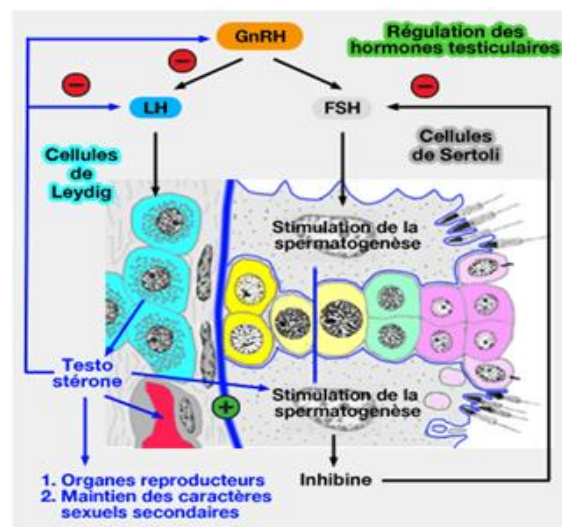
## 1.3 Régulation de la spermatogenèse

La spermatogenèse normale résulte d'un équilibre entre les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose des cellules germinales.

### 1.3.1 Régulation hormonale

L'axe hypothalamo-hypophysaire est l'interrupteur général de fonctionnement testiculaire.

Le décapeptide GnRH est produit au niveau hypothalamique, il se fixe sur les récepteurs membranaires spécifiques des cellules gonadotropes pour stimuler leur production [18]. Au niveau hypophysaire, les hormones produites sont l'hormone lutéinisante (LH) qui régule l'activité des cellules de Leydig et stimule la synthèse des androgènes, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) qui régule les fonctions setoliennes. La FSH en association avec la testostérone testiculaire agit sur les cellules de Sertoli pour assurer l'initiation et le maintien de la spermatogenèse (Figure 7 et 8).



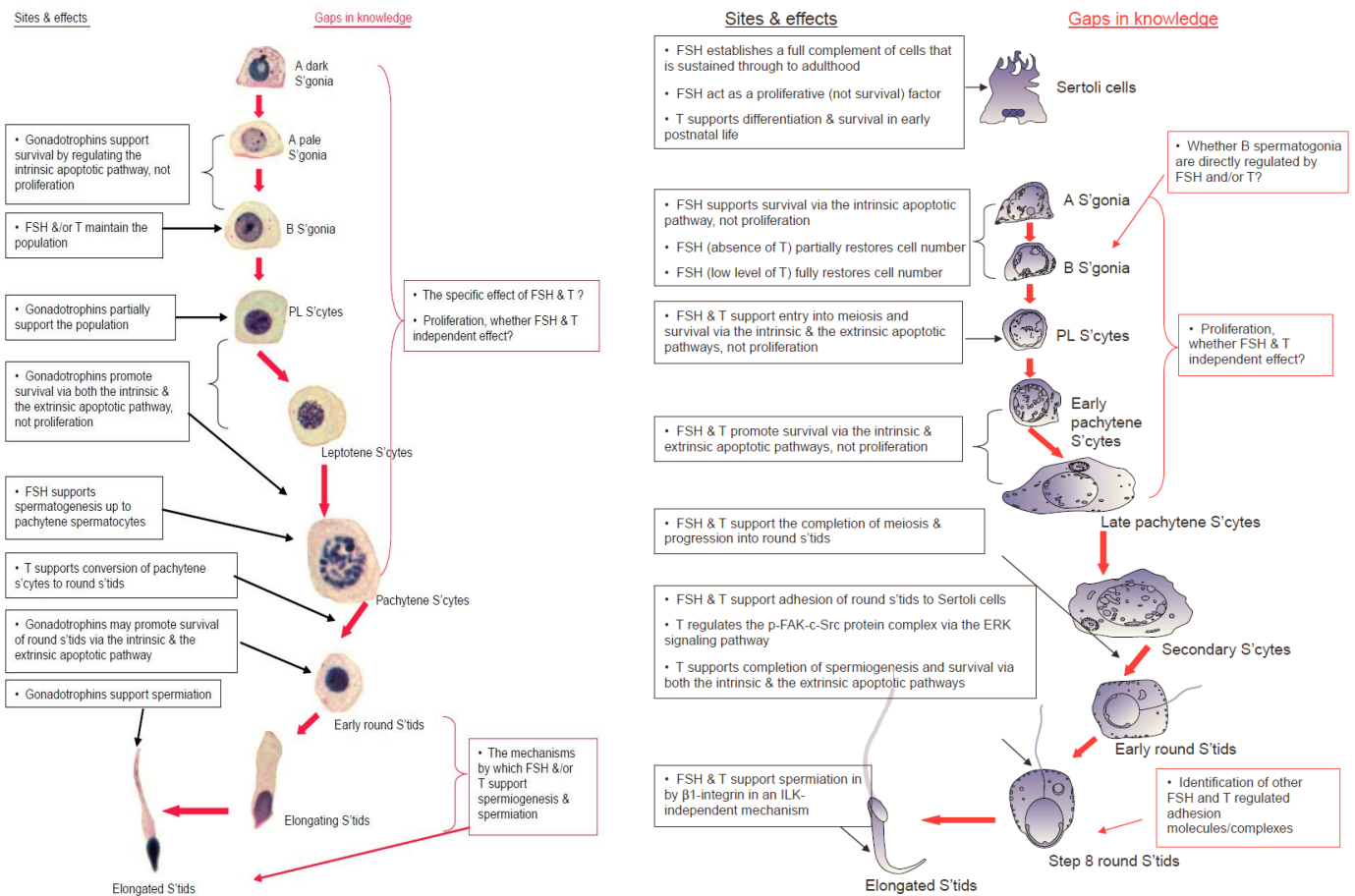
**Figure 7.** Contrôle hormonal de spermatogenèse.

D'après (<http://www.vetopsy.fr/endocrinologie/hormones-hypophysaires/FSH-secretion-fonctions-male.php>)

D'autres hormones circulantes peuvent participer à la régulation de la spermatogénèse. La prolactine module la production de testostérone, mais le mécanisme de cette action n'est pas encore bien élucidé. Chez l'homme, l'hyperprolactinémie chronique se traduit par une inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire et à une diminution de la sécrétion de



testostérone. Chez l'adulte, la spermatogénèse est entièrement dépendante de la présence de LH / testostérone (qualité), et aussi de la FSH (quantité de spermatozoïdes). En effet, il existe une bonne corrélation entre le taux de FSH et le nombre de spermatogonies. Le contrôle exercé par l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire est modulée par un rétrocontrôle assuré par les hormones testiculaires de nature stéroïdienne (testostérone) ou protéique (inhibine). La régulation de la spermatogénèse dépend en premier lieu de l'axe hypothalamo-hypophysaire, toutefois, elle implique aussi un système de régulation locale qui module les effets du système endocrine. Cette régulation locale fait intervenir non seulement les contacts cellulaires (entre cellules de Leydig et cellules de Sertoli, entre cellules de Sertoli et cellules germinales, entre cellules germinales elles-mêmes) mais aussi des facteurs de régulation ayant une action de type paracrine ou autocrine.



**Figure 8.** Les modes d'action de FSH et la testostérone (T) sur la spermatogénèse humaine (A) et de rat (B) basée sur des conclusions de la littérature (en noir) et les problèmes non résolus (en rouge). D'après [19].

### 1.3.2 La régulation paracrine

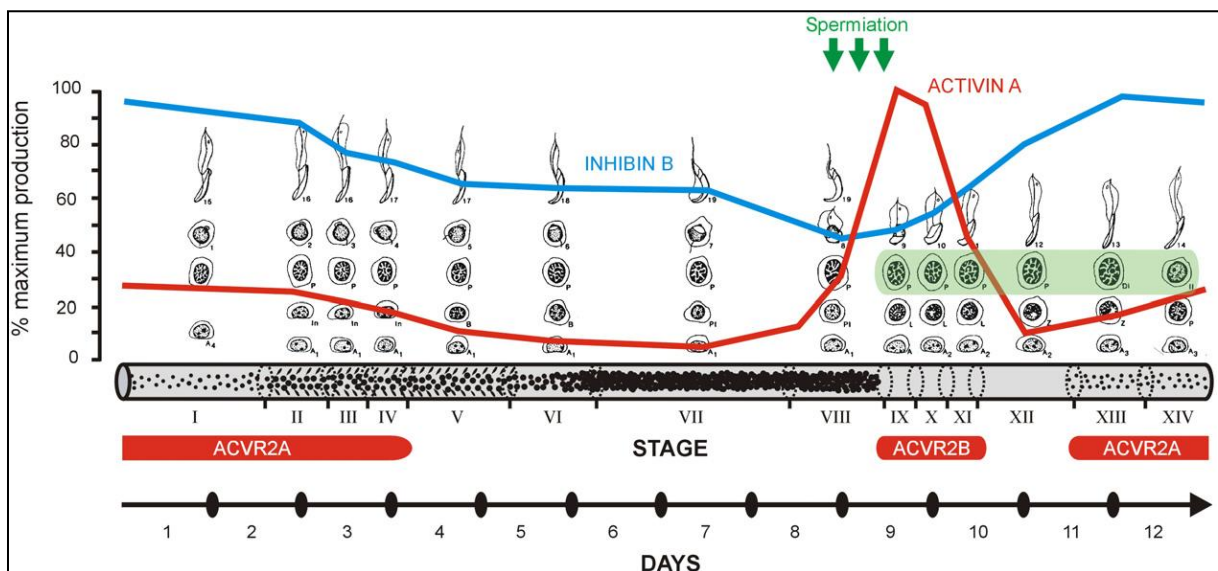
Elle est due à des substances (protéines, peptides...), sécrétées par une cellule ou un groupe de cellules, qui agissent sur des cellules voisines à l'intérieur du testicule.

Ces substances sont responsables d'interactions réciproques entre les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et cellules germinales [18]. La cellule de Sertoli synthétise un grand nombre de substances, notamment:

- Les inhibines et activines

Dans le contexte de la régulation paracrine du testicule, elles ont un rôle opposé: l'inhibine est sécrétée lorsque la production de spermatozoïdes est élevée. Cette protéine inhibe la synthèse d'ADN et les mitoses des spermatogonies [18] (Figure 9).

En revanche, l'activine favorise les mitoses de spermatogonies.



**Figure 9.** Production de l'Activine et de l'inhibine et de leurs récepteurs (ACVR2A et ACVR2B) au cours du cycle de l'épithélium séminifère du rat. D'après [20].

- L'IGF I joue un rôle important dans la régulation des fonctions endocrine et exocrine du testicule. La part respective de l'IGF I circulant et de l'IGF I produit in situ par les cellules de Leydig et Sertoli sous influence de LH et FSH, est difficile à préciser. L'IGF I a une action mitogène sur les cellules somatiques et germinales. Il augmente le nombre de récepteurs à LH et la capacité stéroïdogénique de la cellule de Leydig. Il stimule, dans la cellule de Sertoli, la



production de lactate et de l'activateur du plasminogène, facteurs importants d'interaction avec les cellules germinales.

- Le TGF $\beta$  est produit et agit sur les cellules somatiques en inhibant leurs fonctions différenciées en réponse aux gonadotrophines. Il diminue l'activité de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse et la production de testostérone de la cellule de Leydig ; il inhibe la production de lactate de la cellule de Sertoli. Il a des effets opposés à l'IGF I.

- L'EGF et TGF $\alpha$  sont deux peptides proches agissant via le même récepteur et pourraient être des modulateurs de la spermiogénèse et des fonctions leydigiennes et sertoliennes.

- Les IL 1 et 6 sont sécrétées principalement par les cellules de Sertoli où elles interviendraient comme régulateurs essentiels des stades précoces de la spermatogénèse [21].



## **2. Infertilité masculine**

### **2.1 Définition**

L'infertilité représente un enjeu médical et scientifique important. En France, un couple sur sept consulte pour des difficultés à concevoir. Le pourcentage de couples déclarant une incapacité à concevoir après 1 an de tentatives infructueuses est actuellement de l'ordre de 15 à 25%, ce qui constitue un problème de santé non négligeable [22].

### **2.2 Causes d'infertilité masculine**

Les causes d'infertilité masculine peuvent être séparées en 2 catégories:

#### **2.2.1 Les causes dites « excrétoires » ou « obstructives »**

Elles constituent 40% des cas. La production des spermatozoïdes testiculaires est conservée mais il existe une anomalie d'excrétion des spermatozoïdes. Selon l'étiologie, elles sont classées en deux groupes:

##### **- L'infertilité obstructive congénitale**

Les canaux déférents et/ou vésicules séminales sont absents (*agénésie bilatérale des canaux déférents*) due à une anomalie congénitale ou à un défaut de développement des dérivés Wolffiens, ou à une atrésie secondaire de tout ou partie des canaux déférents et/ou des vésicules séminales

##### **- L'infertilité obstructive acquise**

Des lésions entraînent des obstructions au niveau l'épididyme et/ou canaux différentielles (tumeurs testiculaires, séquelles interventionnelles ou inflammatoires, des rares volumineux kystes prostatiques comprimant les canaux éjaculateurs), troubles de l'éjaculation (paraplégie, troubles sexuels, éjaculation rétrograde).

#### **2.2.2 Les causes non obstructives dites « sécrétoires »**

Elles constituent 60% des cas. Elles correspondent à une anomalie de production des spermatozoïdes par les testicules. On distingue

### **2.2.2.1 *L'infertilité non obstructive centrale***

Elle constitue 1 à 5 % des cas d'infertilité masculine. Il s'agit d'un déficit de stimulation des testicules par les gonadotrophines (FSH, LH) entraînant un hypoandrisme plus ou moins marqué et une hypotestostéronémie [23], liée à une anomalie constitutionnelle (syndrome de Kallman-de Morsier) ou acquise (tumeurs hypothalamique hypophysaire, radiothérapie, atteinte post-chirurgicale de la région sellaire, maladies infiltratives, anorexie mentale).

### **2.2.2.2 *L'infertilité non obstructive testiculaire***

Elle constitue 52 % des cas d'infertilité masculine. Il s'agit d'une atteinte fonctionnelle du testicule, liée à une anomalie:

- ***Congénitale***

Anomalies génétiques (syndrome de Klinefelter, microdélétions du chromosome Y (azoospermia factor) et mutations au niveau du récepteur de l'hormone folliculo-stimulante [FSH]) [23-25].

- ***Acquise***

Varicocèle, cryptorchidie, altération ischémique (séquelle de traumatisme inguinoscrotaux ou de torsion testiculaire), antécédent d'orchite ourlienne, exposition à certaines substances toxiques (irradiation, chimiothérapie), l'exposition à la chaleur.

- ***Idiopathique***

Les causes de l'infertilité non obstructive testiculaire restent inexplicables.

A ce jour, l'étiologie de l'infertilité masculine reste inconnue dans 65 à 75% des cas, posant la question de l'impact du mode de vie et de l'environnement, en particulier l'exposition à des perturbateurs endocriniens (voir plus loin).

## **2.3 *Diagnostic***

### **2.3.1 *L'anamnèse et l'examen clinique***

L'anamnèse et l'examen clinique permettent de définir les éléments susceptibles d'altérer la spermatogénèse [26, 27] âge supérieur à 55 ans, cryptorchidie,

traumatisme et/ou torsion testiculaire, chirurgie inguinoscrotale, chimiothérapie, obésité, infections sexuellement transmissibles, tabagisme, alcoolisme, prise de cannabis et autres toxiques ou médicaments ; les antécédents héréditaires ; la palpation du testicule permet de constater l'hypoandrie ou la dilatation épидидymaire ou d'une absence d'un ou des deux canaux déférents.

### 2.3.2 Le spermogramme

Il permet d'identifier les altérations quantitatives (azoospermie, cryptozoospermie, oligospermie) et/ou qualitatives (asthénospermie, tératospermie, nécrospermie) des spermatozoïdes (

2).

Paramètres	Valeurs normales	Différentes anomalies observées (en dessous des valeurs normales)
Volume	>1,5ml	Hypospermie
Numération	>15.10 <sup>6</sup> /ml	- Oligospermie modérée (1<N<15.10 <sup>6</sup> /ml) - Oligospermie sévère (0<N<1.10 <sup>6</sup> /ml) - Cryptozoospermie (présence de spermatozoïdes uniquement sur culot de centrifugation) - Azoospermie (absence de spermatozoïdes sur culot de centrifugation), N = 0.10 <sup>6</sup> /ml
Mobilité progressive	>32%	Asthénospermie
Vitalité	>58%	Nécrospermie
Formes normales	>4%	Tératospermie

**Tableau 2.** Valeurs normales du spermogramme selon les normes de l'OMS 2010.

#### A) Le volume

L'azoospermie est constatée après la réalisation d'au moins deux spermogrammes avec absence de spermatozoïde. Une hypospermie (volume d'éjaculat inférieur à 2 mL) est due à un obstacle dans les voies excrétrices et/ou dysfonctionnement des glandes qui produit le sperme, soit à une faible sécrétion d'androgènes [28].

#### B) Le PH

La valeur normale du pH séminal est entre 7,2 et 8. Un pH acide (pH < 7,2) peut évoquer une atteinte des vésicules séminales et/ou des anses épидидymo-déférentielles alors qu'un pH alcalin (pH > 8) peut évoquer une atteinte prostatique [29].

**C) *La numération***

La normospermie est définie par une numération de spermatozides entre 15-200 millions/mL. L'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat définit l'azoospermie. L'oligozoospermie est équivalente à une numération inférieure à 15 millions/mL. Alors qu'un taux de spermatozoïdes supérieur à 200 millions/mL est appelé polyspermie.

**D) *La mobilité***

La mobilité est un des paramètres les plus importants pour l'appréciation du pouvoir fécondant du sperme [30]. Ces analyses fines du mouvement se font de façon automatisée (vélocimètre). Un éjaculat normal doit contenir au moins 32% de spermatozoïdes avec une mobilité normale. Ainsi, l'asthénospermie est définie par un pourcentage < 20 à 30% de spermatozoïdes avec mobilité normale.

**E) *La vitalité***

Dans le sperme normal, on observe plus de 58 % de formes vivantes. La présence d'une proportion importante de spermatozoïdes morts dans le sperme éjaculé (nécospermie) est le plus souvent idiopathique.

**F) *La morphologie***

Le spermocytogramme évalue la morphologie des spermatozoïdes permet de disséquer des anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle. Il est normal lorsque la proportion de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques est inférieure à 4 %. Au dessus de cette valeur le sperme est classé dans la catégorie des tératozoospermies.

**G) *L'analyse de certains marqueurs spécifiques***

Le fructose pour les vésicules séminales, la L-carnithine ou l' $\alpha$ -glucosidase pour l'épididyme, le zinc, l'acide citrique et/ou les phosphatases acides pour la prostate.

### **2.3.3 *Bilan hormonal***

Ce dosage a pour but d'évaluer la fonctionnalité des compartiments sertoliens et leydigiens [31]. Les dosages de FSH et d'inhibine B sérique permettent d'évaluer la fonction sertolienne, alors que le dosage de testostérone permet d'évaluer la fonction leydigienne. En cas d'hypotestostéronémie, un dosage de LH et de prolactine est nécessaire pour définir les étiologies de l'hypogonadisme.

### 2.3.4 Examens radiologiques

Une échographie permet de mesurer le volume testiculaire (la valeur seuil 16 mL) [32]. Elle permet aussi de mettre en évidence un cancer du testicule, un varicocèle, une absence de canaux déférents ou bien une dilatation de l'épididyme. L'IRM pelvienne permet de visualiser les canaux déférents sur l'ensemble de leur trajet pelvien, donc de diagnostiquer d'éventuelles agénésies sur des portions non accessibles à l'examen clinique [33].

### 2.3.5 Bilan génétique

Il permet de diagnostiquer les anomalies chromosomiques:

- Le syndrome de Klinefelter (11 % environ) correspond à la présence d'un chromosome X surnuméraire (formule chromosomique : 47, XXY) [25].
- Les microdélétions de locis AZFa, AZFb du chromosome Y sont responsables des troubles de la spermatogenèse plus sévères (aplasie des cellules germinales: le syndrome des cellules de Sertoli seules ou arrêt de maturation) (voir figure 10) [34].

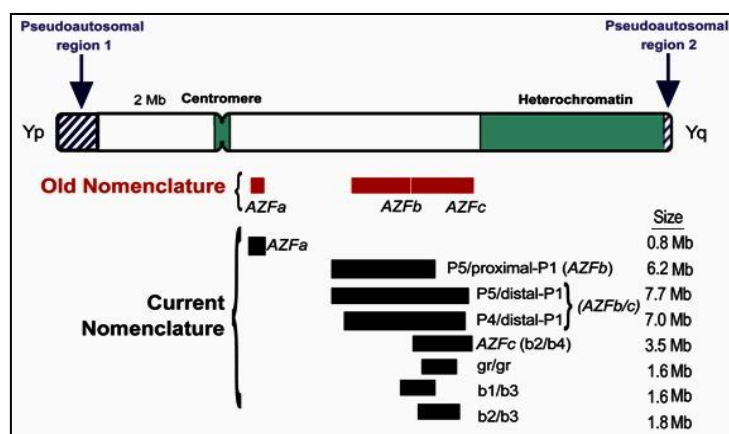


Figure 10. Schéma du chromosome Y qui indique la position approximative des microdélétions de locis AZFa et AZFb. D'après [35]

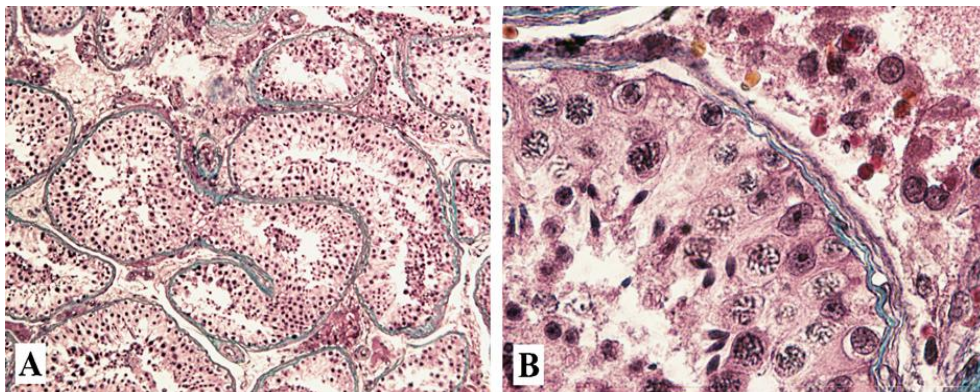
- Les mutations du gène *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (*CFTR*) sont associées aux agénésies des canaux déférents [35].
- Les mutations des gènes *KAL* (1, 2, 3, *K4* et plus récemment *KAL5* pour le syndrome de Kallmann-de Morsier), gènes *GPR54* ou du récepteur de la GnRH pour les déficits gonadotropes isolés.

## 2.3.6 Biopsie testiculaire

La biopsie testiculaire est réalisée à visée thérapeutique chez les patients présentant une azoospermie. Elle permet aussi d'affiner le diagnostic.

### 2.3.6.1 Les azoospermies obstructives

L'histologie est généralement normale et la spermatogénèse complète (Figure 11 A, B). Lorsque l'obstruction est ancienne, un tableau d'hypospermatogénèse s'installe, rendant la distinction entre une azoospermie obstructive et non obstructive difficile sur la base des seuls résultats histologiques.



**Figure 11.** Spermatogénèse normale chez l'homme. A. Plusieurs tubes séminifères de diamètre normal. B. Détail de l'épithélium germinal. Noter la maturation ordonnée des spermatogonies (contre la gaine péritubulaire), des spermatocytes, des spermatides et des spermatozoïdes vers le centre de la lumière.

D'après [36].

### 2.3.6.2 Les azoospermies sécrétoires

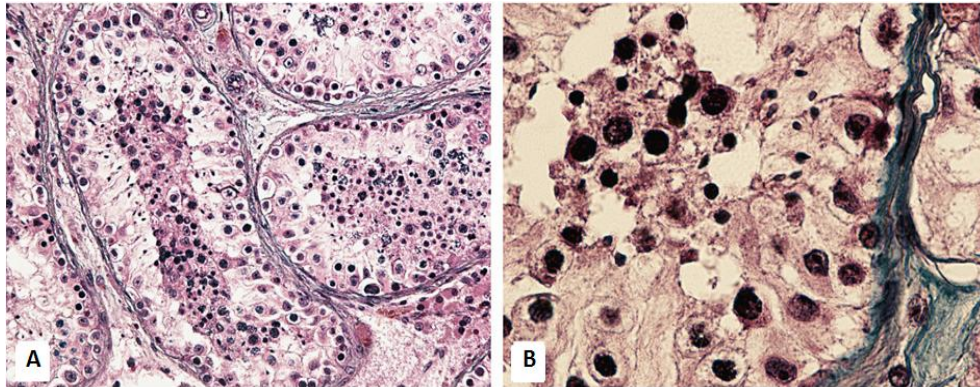
Différents phénotypes histologiques peuvent être observés, témoignant d'une altération de la spermatogénèse plus ou moins sévère:

#### 2.3.6.2.1 Hypospermatogénèse globale

Elle est définie par une diminution de l'ensemble des cellules



germinales (Figure 12 A, B). Dans une section de tube séminifère normal, on observe 17 à 35 spermatides, alors que l'on ne compte en moyenne que 4 à 6 spermatides dans le cas d'hypospermatogenèse [37].



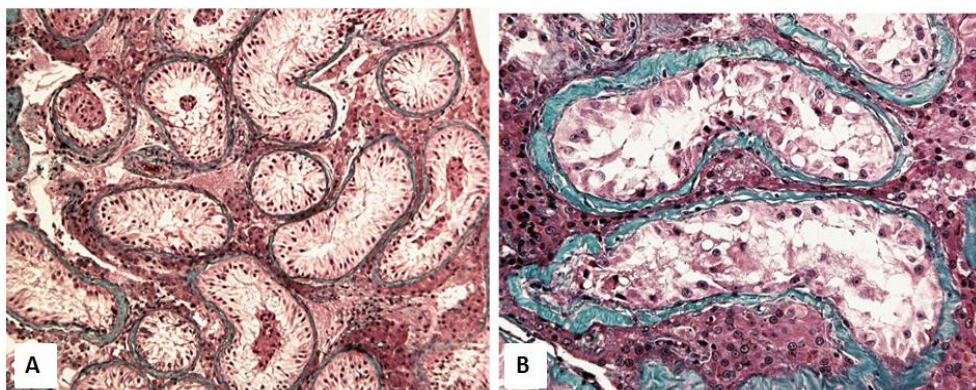
**Figure 12.** Biopsies testiculaires à hypospermatogenèse complète. A. Tubes séminifères présentant une hypospermatogenèse avec une maturation désordonnée des cellules germinales. La lumière est obstruée par des cellules germinales immatures. B. la présence de tous les stades germinaux diminués en nombre de cellules au stade spermatogonie, spermatocyte, spermatide et spermatozoïde. D'après [36].

#### 2.3.6.2 Syndrome de régression sertolienne (SCOs)

Les SCOs (Sertoli Cell Only) constituent 27 à 68 % des cas de l'azoospermie non obstructive [38]. On distingue deux formes:

##### - *Forme primitive*

Généralement, les SCOs sont des phénotypes purs dans lesquels la totalité des tubes séminifères présente des cellules de Sertoli, mais pas de cellule germinale (Figure 13. A, B).



**Figure 13.** Biopsies testiculaires avec syndrome de régression sertolienne (SCOS). A. Plusieurs tubes séminifères de diamètre diminué sans cellule germinale avec des cellules de Sertoli (SCOS). B. Détail de

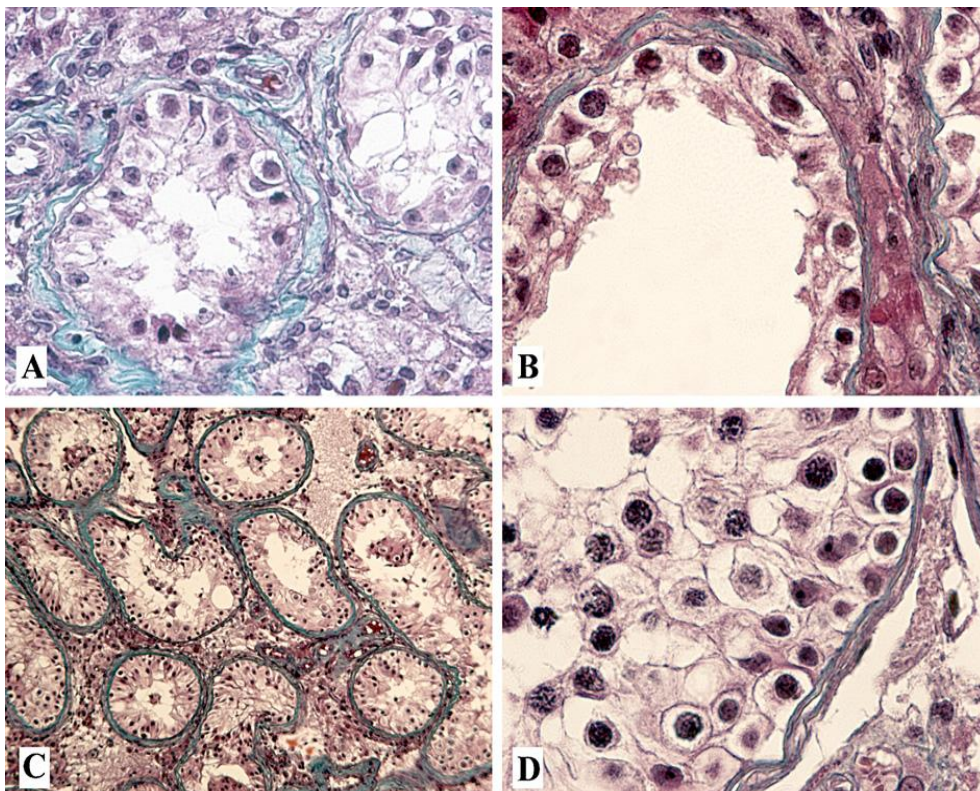
deux tubes séminifères avec des cellules de Sertoli sans cellule germinale. Noter la gaine périvitubulaire très épaisse. D'après [36].

#### - **Forme acquise dite « mixte »**

Avec parfois une spermatogénèse résiduelle. Ces SCO peuvent être associés à la présence de microdélétions de certaines régions du chromosome Y, au syndrome de Klinefelter, à des antécédents de chimio- et/ou radiothérapie et d'orchite. Des études rapportent un taux d'extraction de spermatozoïdes chez ces patients SCO variant de 16 à 33 % [39].

#### 2.3.6.2.3 **Blocage de maturation**

Ce phénotype constitue moins de 5 % des cas d'azoospermies. Selon l'histologie, les arrêts de maturation (GCAs) peuvent avoir divers aspects: arrêt au stade précoce ou tardif (spermatide ronde) (Figure.14 A, B, C, D). Dans ce dernier cas, l'histologie de la biopsie semble à première vue normale. Mais, l'examen à plus fort grossissement met en évidence une interruption de la spermatogénèse uniformément dans tous les tubes séminifères. Il semble que les GCAs précoces au stade préméiotique ont un taux sérique de FSH supérieur aux GCAs tardifs [40].





**Figure 14.** Biopsies testiculaires avec arrêts de maturation des cellules germinales au stade spermatogonie (A, B) et au stade spermatocyte (C, D). A. Le diamètre des tubes séminipares est diminué, la gaine périvitubulaire épaissie et quelques spermatogonies sont observées contre la gaine périvitubulaire. B. Détail d'un tube séminipaire montrant des spermatogonies et l'absence de cellules germinales plus matures. C. Vue d'ensemble d'une biopsie testiculaire avec arrêt de maturation. D. Détail de l'épithélium germinal. La spermatogenèse est quantitativement normale mais arrêtée au stade spermatocyte. D'après [36].

L'extraction de spermatozoïdes dans ce phénotype est faible 14 à 33 % selon les auteurs et les chances de grossesse sont très limitées [41], donc il est primordial de comprendre les causes des arrêts de maturation.

Les trois phénotypes cités ultérieurement, ils pourront être purs (aspect identique dans tous les tubes séminifères) ou mixtes (aspect bigarré selon les tubes).

### ***2.3.7 Examens complémentaires***

Les analyses complémentaires des azoospermies non obstructives sont longues et coûteuses, elles sont réservées à des cas particuliers. Parmi les approches utilisées:

#### ***- Études de la méiose***

Il a été montré dans 10 % des azoospermies non obstructives que la fréquence des anomalies de recombinaison est supérieure par rapport aux hommes qui ont une spermatogenèse normale [42]. Le recours à la technique immunocytogénétique permet de détecter les défauts d'appariements chromosomiques et de recombinaison au stade pachytène de la prophase I de la méiose (asynapsis) [43].

#### ***- Étude de l'expression des gènes spécifiques***

Plusieurs gènes spécifiques à certains stades de développement ou de la maturation des cellules germinales ont été identifiés et quantifiés. Par exemple, les protamines sont responsables de la compaction de la chromatine dans le spermatozoïde mature. Il a été montré une relation entre la condensation chromatinienne et la fertilité en particulier dans l'azoospermie non obstructive [44]. En plus, une corrélation entre le niveau d'expression faible de la protamine 1 et les échecs de FIV/ICSI a été évoquée.

## **2.4 Moyens thérapeutiques**

Le traitement de l'infertilité masculine implique, lorsque c'est possible, le traitement de la cause. Dans les autres cas, la prise en charge par l'Aide Médicale à la Procréation (AMP) permet de pallier à des altérations spermatiques plus ou moins sévères. Dans les cas les plus sévères (azoospermies), une extraction chirurgicale de spermatozoïdes peut être envisagée. Cependant, il s'agit d'un geste invasif, dont le résultat est difficilement prévisible. En effet, dans le cas des azoospermies excrétoires pures, l'exploration épидидymaire (+/- testiculaire) est de bon pronostic et permet dans la majorité des cas de retrouver des spermatozoïdes. En revanche, dans le cadre des azoospermies non obstructives, le pronostic est plus réservé : d'après la littérature, l'extraction n'est positive qu'une fois sur deux [45]. Des scores regroupant plusieurs paramètres tels que la FSH, la mesure échographique des volumes testiculaires, et l'inhibine B ont été proposés afin de mieux prédire les chances d'extraction [46]. Cependant, aucun élément ne permet à lui seul de prédire efficacement la présence de ces spermatozoïdes et de nombreux couples demeureront sans enfant à l'issue des cycles d'ICSI (une technique de micro-injection de spermatozoïde dans l'ovule).



# 3. Le concept: de l'origine développementale de pathologies adultes

## 3.1 Définition du concept

Dans les années 1980, une véritable révolution dans la compréhension des maladies chroniques de l'adulte a été initiée avec les travaux pionniers d'un épidémiologiste anglais, David Barker. L'hypothèse a été avancée que les conditions dans lesquelles un individu débute sa vie, dès la période intra-utérine influence sa santé à très long terme. Plusieurs travaux ont amené les preuves du concept de programmation foetale/néonatale de pathologies adultes [47-50]. Il est maintenant clair que les phases précoces du développement intra-utérin et les toutes premières années de vie sont des phases critiques au cours desquelles s'établit une susceptibilité à de nombreuses maladies chroniques [51-59]. Mais celles-ci ne se révèlent souvent que si l'environnement, le mode de vie au cours de l'enfance, de l'adolescence et à l'âge adulte y sont propices. Le Tableau 3 résume les causes pour lesquelles on a montré des conséquences à long terme sur la santé humaine.

Causes précoces	Conséquences à l'âge adulte
Restriction de croissance intra-utérine, faible poids de naissance	Diabète de type 2, surcharge adipeuse abdominale, hypertension artérielle, maladies cardiovasculaires, maladie rénale chronique, bronchopathies obstructives
Diabète gestationnel, obésité maternelle pendant la grossesse, prise de poids gestationnelle excessive	Obésité, insulino-résistance, diabète de type 2
Prématurité	Retard cognitif et moteur, diabète de type 2, hypertension
Croissance post natale ralentie	Diabète de type 2, maladies cardiovasculaires
Croissance post natale excessive	Obésité, cancer
Exposition de la mère et du jeune enfant à des toxiques	Retard cognitif et moteur, obésité, puberté précoce, infertilité, cancer, hypertension, maladies cardiovasculaires
Infection maternelle pendant la grossesse, infections précoces de l'enfant	Asthme, maladies cardiovasculaires, autisme, schizophrénie

Situation psychosociale dans l'enfance difficile, carence affective	Retard cognitif et moteur, troubles émotionnels et comportementaux, obésité
---	---

*Tableau 3. Relations entre causes précoces et maladies survenant à l'âge adulte décrites dans la littérature. Relations entre causes précoces et maladies survenant à l'âge adulte décrites dans la littérature. D'après ([http://www.iresp.net/iresp/files/2013/04/120925150459\\_qspn-18-dohad.pdf](http://www.iresp.net/iresp/files/2013/04/120925150459_qspn-18-dohad.pdf))*

## **3.2 Programmation des anomalies du tractus génital mâle (Syndrome de Dysgénésie Testiculaire (SDT))**

### **3.2.1 Mise en évidence du SDT**

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une augmentation des malformations de l'appareil reproducteur (hypospadias, cryptorchidies) en particulier en Europe du Nord [60]. 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 [61]. Il a été observé, aussi, une diminution de la qualité du sperme et de la fertilité dans les pays industrialisés [62]. Enfin, l'incidence du cancer testiculaire a augmenté de façon importante dans les pays industrialisés y compris en France. Au cours des vingt dernières années, l'incidence annuelle du cancer testiculaire a doublé en France mais aussi dans les pays scandinaves [63].

Au début des années 2000, Skakkebaek a mis l'hypothèse d'un syndrome associant ces trois symptômes: **(i)** malformations du tractus génital masculin (hypospadias et cryptorchidies), **(ii)** altérations de la spermatogenèse et baisse de la qualité spermatique, **(iii)** cancer du testicule. Ces trois pathologies seraient liées entre elles et constitueraient le Syndrome de Dysgénésie Testiculaire (SDT) [61].

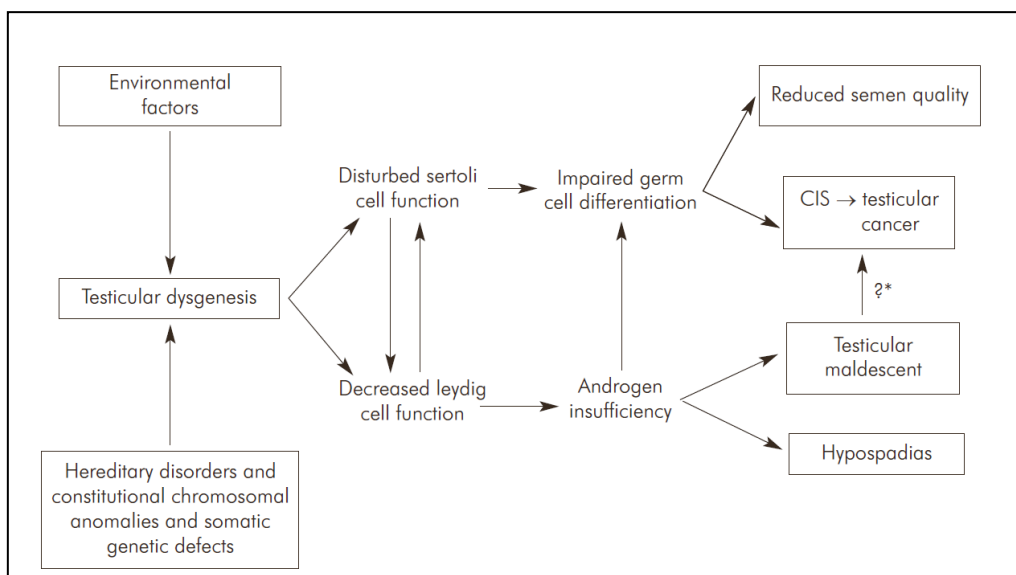
### **3.2.2 Origine du SDT**

Le SDT est une pathologie pouvant avoir plusieurs origines: génétique et environnementale (voir figure 15) :

- Les patients souffrant de formes sévères de SDT possèdent un caryotype 45X/46XY, des mutations au niveau du récepteur des androgènes ou encore des mutations du gène SRY [64].

- L'hypospadias est une anomalie caractérisé par un positionnement ventral de l'ouverture de l'urètre au niveau du pénis, ceci est lié à un défaut d'action des androgènes issus du testicule foetal [65].
- La cryptorchidie (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 [66].
- Le cancer testiculaire a été associé à des mutations au niveau du chromosome 12.

Toutefois, le taux d'augmentation du SDT dans la population générale est incompatible avec le taux de mutations spontanées. Les facteurs génétiques seuls ne peuvent pas expliquer tout les cas des SDT, car l'augmentation rapide et considérable du taux de cancers testiculaires (environ 400% en deux générations) [67], du taux d'hypospadias et de cryptorchidies [68], et des altérations de la spermatogenèse, ces dernières années évoquent une modification du mode de vie et/ou de l'environnement.



**Figure 15.** Le syndrome de dysgénésie testiculaire. CIS: carcinome in situ. D'après [69].

### 3.3 Les PEEs dans la programmation du SDT ?

Des données épidémiologiques basées sur la comparaison de l'incidence de la cryptorchidie, au cours de ces dernières années, chez les nouveau-nés dans les maternités de Berlin-Est et Ouest, renforcent ces hypothèses [70]. 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 preuves qui montrent les liens entre expositions environnementales précoces et effets à long terme sont établies dans plusieurs modèles animaux, dans des conditions environnementales variées et à des périodes de développement différentes, avec des effets souvent variables selon le sexe [71]. En effet, l'exposition fœtale et/ou néonatale des rongeurs aux PEEs (ex: phthalates, PCBs, vinclozoline) entraîne un phénotype à l'âge adulte reproduise tout ou partie des caractéristiques du SDT (altérations de la fertilité, hypospadias, cryptorchidies) à l'exception du cancer testiculaire.

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 entre l'exposition aux PEEs et le cancer testiculaire sont appuyés par le fait que :

- les cancers testiculaires sont très fréquents chez les individus cryptorchides [72].
- les hommes présentant des altérations de la fertilité ont un risque plus élevé de développer le cancer du testicule [73].
- les hommes dont la mère a été traitée par le DES durant la grossesse présentent un risque accru de développer le cancer du testicule [74].

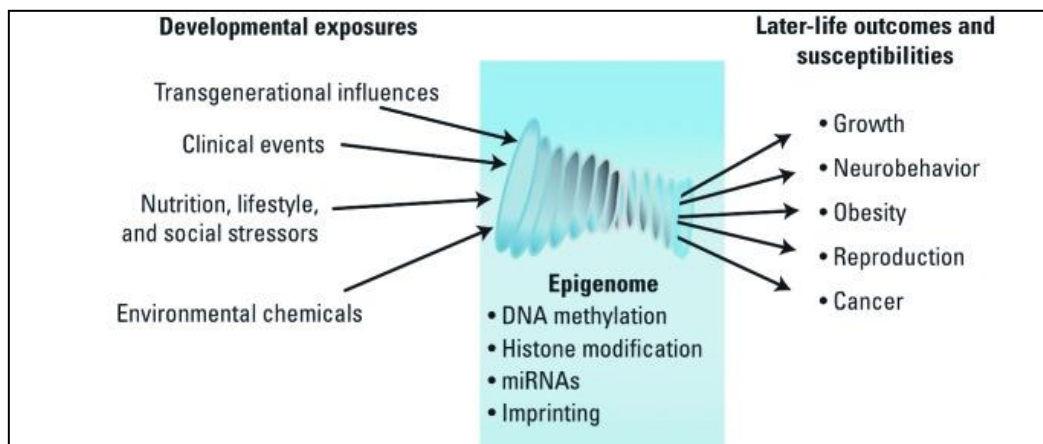
D'autres facteurs pourraient être impliqués dans le SDT et d'anomalies de fonction de la reproduction. Le tabagisme maternel pendant la grossesse provoque des altérations du développement testiculaire se traduisant par des altérations de la spermatogenèse [75]. D'autre part, il a été démontré une association entre la consommation d'alcool de la mère au cours de la grossesse et l'induction de cryptorchidies chez les fils exposés [76].

### 3.4 Mécanismes

Par quels mécanismes les stress environnementaux très précoces peuvent-ils affecter durablement le phénotype (les caractéristiques observables de l'individu)? Les modifications moléculaires induites par ce stress ne changent pas le code génétique (les gènes) mais agissent sur le niveau d'«expression» des gènes, c'est-à-dire sur la quantité de protéines produites à partir de ces gènes. L'ensemble de ces processus moléculaires qui modifient l'expression des gènes sans en changer le code s'appelle l'épigénétique (voir Figure 15). On parle de «marques épigénétiques» qui s'apposent sur les gènes et d'«épigénome» d'une cellule (l'ensemble de ses marques épigénétiques). Ce mécanisme permet d'adapter le déroulement du programme génétique à son environnement. Parmi les mécanismes épigénétiques: méthylation de l'ADN, modifications des histones ou microRNAs (voir étude bibliographique chapitre 7) [77].

Ces mécanismes épigénétiques apposent des marques caractéristiques.

- Ces marques peuvent être, à tout instant, perturbées par l'environnement, elles sont réversibles. Selon le phénomène biologique et tout particulièrement les fenêtres d'exposition au cours du développement, leurs conséquences peuvent être, elles, irréversibles.
- Ces marques épigénétiques peuvent avoir des conséquences pour la santé des années plus tard.
- Ces marques peuvent exercer des effets transgénérationnels, transmis aussi bien par la mère que par le père [78, 79].



**Figure 16.** Les mécanismes épigénétiques impliqués dans la programmation des maladies adultes. D'après [52].



# 4. Les Perturbateurs endocriniens environnementaux

## 4.1 Définition

Les perturbateurs endocriniens environnementaux (PEEs) sont définis comme des substances d'origine extérieure à l'organisme et susceptibles de modifier le fonctionnement normal du système hormonal. On les soupçonne notamment de perturber la fonction de reproduction, mais elles peuvent aussi être à l'origine de troubles métaboliques (diabète, obésité) et favoriser le développement de cancers hormono-dépendants [80].

Dans le contexte du tractus génital mâle, ce sont essentiellement des PEEs ayant une activité antiandrogénique ou estrogéno-mimétique qui ont des effets délétères. Ces substances peuvent se trouver dans l'air, l'eau, le sol, les aliments et dans un grand nombre d'objets courants. Les PEEs actifs dans le tractus génital mâle sont d'origine synthétique (ex: pesticides) ou bien naturelle (ex: mycotoxine).

## 4.2 Classification

### 4.2.1 Selon l'origine

#### 4.2.1.1 Les composés synthétiques

Les composés synthétiques ayant une activité de perturbateur endocrinien peuvent être:

- *Des substances chimiques (voir tableau 4)*

Famille chimique	Sources potentielles	Exemples
Phtalates	Plastiques, cosmétiques	Dibutyl phtalate
Alkylphénols	Détergents, plastiques, pesticides	Nonylphenol
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Sources de combustion: fumée de cigarette, émission des moteurs diesels, incendies	Benzo(a)pyrène
Polychlorobiphényles	Transformateurs électriques	PCB, Arochlor
Anciens pesticides	Résiduels de stockage, pollution rémanente	DDT, Dieldrine, Chlordane
Autres pesticides et	Agriculture, nettoyages urbains,	Atrazine, Ethylène thiourée,

fongicides	jardins particuliers	Heptachlor, Lindane, Malathion, vinclozoline
Retardateurs de flamme	Mousses pour les mobiliers, tapis, équipements électroniques	Polybromodiphényles (PBDE)
Dérivés phénoliques	désinfectants, plastiques, cosmétiques	Bisphénols A, Parabens, Halogéno-phénols

**Tableau 4.** Exemples de familles de molécules à effet perturbateur endocrinien et leurs sources potentielles. D'après (<http://www.cancer-environnement.fr/274-Perturbateurs-endocriniens.ce.aspx>)

- **Des hormones de synthèse**

Comme les contraceptifs oraux, les traitements de substitution ou encore certains additifs pour l'alimentation animale (ex: diethylstilbestrol/DES) [81].

#### **4.2.1.2 Les composés naturels**

Certains composés naturels sont dans l'alimentation humaine et animale et peuvent agir comme des PEEs. Ils sont retrouvés dans les plantes (phytoestrogènes, ex: génistéine, daidzéine) ou bien synthétisés par des microorganismes comme des moisissures (ex: zéaralénone). Ces substances métabolisées par l'organisme sont non lipophiles et ainsi accumulent peu au niveau des graisses. Ils possèdent très souvent une faible affinité pour les récepteurs hormonaux comme les ESRs. Cependant, il convient de prendre en compte leur activité PEE étant donné qu'ils sont souvent consommés chaque jour via l'alimentation.

Une étude récente ayant pour but d'étudier l'exposition humaine aux mycotoxines a utilisé 159 échantillons de céréales (le blé, le maïs et le riz) pour évaluer la présence de patuline, le déoxynivalénol, 3-acétyl-déoxynivalénol, fusarénone-X, diacétoxyscirpénol, nivalenol, néosolaniol, HT-2, T-2 et la zéaralénone dans les céréales [82]. Les quantités présentes dans les céréales sont comparées aux doses journalières tolérables (DJT). Il a été constaté que 65,4% des échantillons étaient contaminés par au moins une mycotoxine et 15,7% des échantillons analysés ont montré une contamination par plusieurs mycotoxines. Par exemple, l'exposition alimentaire aux toxines HT-2 et T-2 a été estimée à 10% et 86% de la DJT, pour l'adulte et l'enfant respectivement.

### **4.3 Mécanismes d'actions**

### ***4.3.1 Mécanisme hormonal***

Il a été proposé que les cibles des PEEs étaient l'interférence avec les récepteurs nucléaires aux hormones tels les récepteurs des estrogènes (ESRs), le récepteur des androgènes (AR), les récepteurs de la progestérone (PR), les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TRs), le récepteur des glucocorticoïdes (GR) ou encore les récepteurs des rétinoïdes [83]. De plus, les PEEs agiraient aussi via les récepteurs non nucléaires aux hormones stéroïdes (ex: ESRs 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 régulent le système hormonal ou le système reproducteur [84].

Ces PEEs ont une activité de type estrogénique, antiestrogénique ou antiandrogénique. Ils peuvent agir de différentes façons:

- en imitant l'action d'une hormone naturelle;
- en se fixant sur les récepteurs des hormones naturelles;
- en gênant ou en bloquant le mécanisme de production ou de régulation des hormones ou des récepteurs, modifiant ainsi les concentrations d'hormones présentes dans l'organisme.

### ***4.3.2 Mécanismes épigénétiques***

La capacité des produits chimiques ou naturels environnementaux d'influencer la santé humaine semble faire intervenir des mécanismes épigénétiques. Plusieurs études ont montré sur des modèles *in vitro* et *in vivo* des modifications épigénétiques provoqués par l'exposition *in utero* ou néonatale aux PEEs. Ces modifications peuvent induire des altérations de l'expression des gènes persistant tout au long de la vie [85-89]. Ainsi, les modifications épigénétiques induites par l'environnement deviennent de plus en plus pertinentes pour la santé humaine et l'étiologie des maladies [90-92]. C'est pour ces raisons que les produits chimiques largement utilisés dans la vie moderne (les plastiques et leurs molécules non liés: bisphénol A (BPA) et les phtalates) ont récemment attiré l'attention de la communauté scientifique (voir tableau 5), les organismes de réglementation et le grand public en raison de leur volume de production, l'utilisation généralisée des matières plastiques, et les effets néfastes sur la santé [93].

Un autre exemple, l'exposition in utero au DES est également associée à un risque accru de cancer du sein chez les femmes adultes. Chez la souris, elle induit des changements néoplasiques dans le tissu mammaire [94]. En effet, l'exposition in utero de souris au bisphénol-A (BPA) ou au diéthylstilbestrol (DES) induisent dans les glandes mammaires des souris exposées, la surexpression d'Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) et sa marque épigénétique: histone H3 triméthylation. Ces résultats ont été reproduits sur la lignée cellulaire de cancer de sein MCF-7. La programmation développementale d'EZH2 (une histone méthyltransférase qui impliqué dans tumorigenèse) est un nouveau mécanisme par lequel l'exposition in utero aux perturbateurs endocriniens conduit à la régulation épigénétique de la glande mammaire.

Produits chimiques	Modifications Epigénétique	Gènes	Organismes	Réf
BPA	Hypométhylation	Agouti	Souris	[95, 96]
BPA	Hypométhylation	Pde4d4	Rat	[97, 98]
BPA	Hypométhylation	Nsbp1, Hpcal1	Rat	[99]
BPA	Hyperméthylation	ESR1et 2	Rat	[100]
BPA	Hyperméthylation	Hoxa10	Souris	[101]
BPA	Hyperméthylation ou Hypométhylation	13 genes	Souris	[102]
PBA	Hyperméthylation	LAMP3	humain	[103]
BPA	modification d'histone	H3K27me3	Humain et souris	[94]
BPA	Induction de miARNs	miR-146a	Humain	[104]
BPA	modification des miARNs	37 miRNAs	Souris	[105]
Phthalate BBP	Hypométhylation	ESR1	Humain	[106]
Phthalate DEHP	Hyperméthylation	INSL3	Souris	[107]
BPA	méthylation différentiel de l'ADN. Transgénération			[92]

**Tableau 5.** Effets épigénétiques de bisphénol A (BPA) et des phtalates.

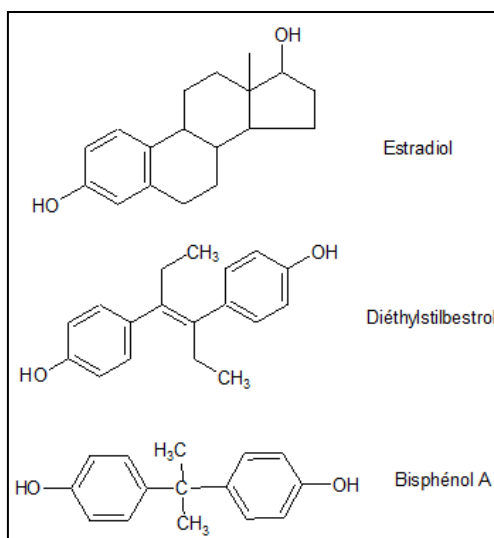
## 4.4 Effets des PE sur le testicule

### 4.4.1 Perturbateurs endocriniens synthétiques

#### 4.4.1.1 Exemples des PEEs ayant une activité estrogénomimétique

##### 4.4.1.1.1 Diéthylstilbestrol (Distilbène ou DES)

Ce médicament a une activité estrogénomimétique (figure17), il a été prescrit dans les années 1950-1960 pour éviter les avortements spontanés. Il a été interdit en France en 1977 suite à la découverte d'un lien dans les années 70 entre l'administration de DES à des femmes enceintes et la survenue de cancers du vagin, du sein et de l'utérus chez les filles des mères traitées [108]. Chez leur fils, l'exposition au DES a été associée à une augmentation du risque de développement d'hypospadias, de cryptorchidies, de kystes épидидymaires et d'inflammation testiculaire [109, 110].



**Figure 17.** Différences de structure entre l'estradiol, le diéthylstilbéstrol et le bisphénolA.

L'exposition prénatale de souris mâles au DES induit des effets néfastes comparables à ceux observés chez l'homme comme la non-descente testiculaire, des kystes épидидymaires, la rétention des canaux Mulleriens et des altérations de la spermatogenèse [111, 112]. L'exposition néonatale au DES chez le rongeur (ex: 10 µg/kg/jour chez le rat entre 1-12 jpn)



induit une chute du poids des testicules, des épидидymes, des vésicules séminales ainsi que de fortes altérations de la spermatogénèse par apoptose des cellules germinales [113-115].

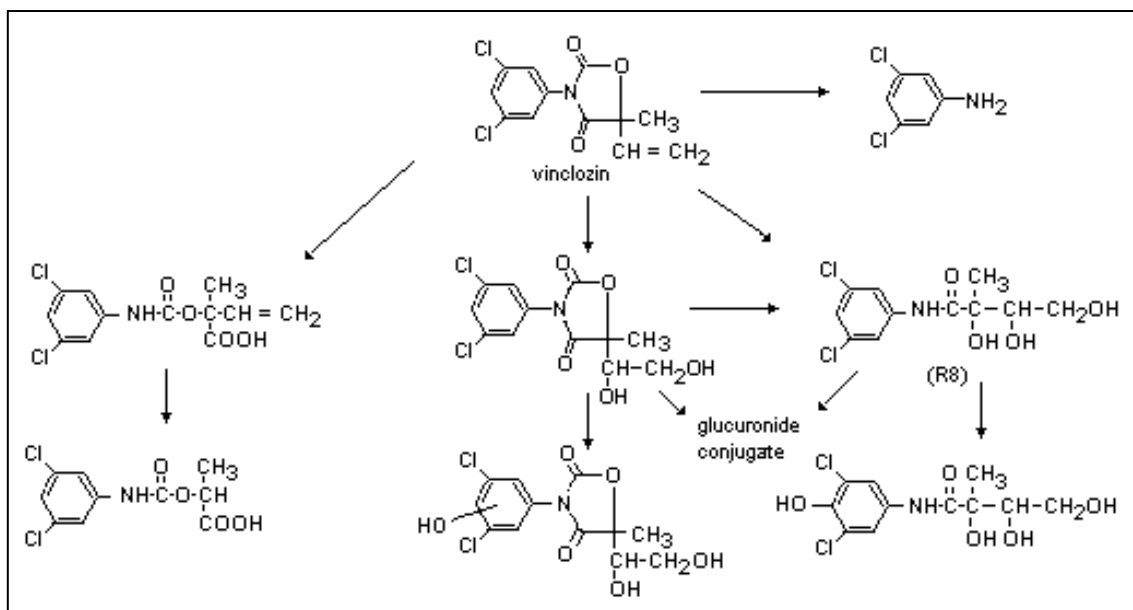
#### **4.4.1.1.2 *Le bisphenol A (BPA)***

Un autre produit à activité estrogénomimétique, est le BPA [116] (Figure 16). Cette molécule est un composé synthétique utilisé dans la production des plastiques polycarbonates et des résines époxy. On le retrouve par exemple, dans le revêtement des boites 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 [84]. Le BPA aurait la capacité de mimer l'action des estrogènes à travers des voies non génomiques impliquant les ESRs membranaires couplés aux protéines G [117]. Selon les travaux, en fonction de la voie d'administration (gavage ou injection), 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 spermatogénèse sont controversées. En effet, certains auteurs rapportent des effets délétères sur le testicule via des altérations au niveau des cellules de Sertoli et des cellules germinales [118-121], tandis que d'autres auteurs identifient des effets transitoires ou bien une absence d'altération du testicule et de la spermatogénèse [122-125].

### **4.4.1.2 *Exemple de PEEs ayant une activité antiandrogénique***

#### **4.4.1.2.1 *Vinclozoline***

La vinclozoline est un fongicide très largement utilisé dans l'agriculture (cultures viticoles, de fruits et légumes, de céréales ou pour les plantes ornementales) (voir figure 18). La vinclozoline est une molécule ayant une activité antiandrogénique. Cette molécule ainsi que ses métabolites M1 et M2 agissent en tant qu'antagonistes du récepteur des androgènes (AR) [126]. 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.



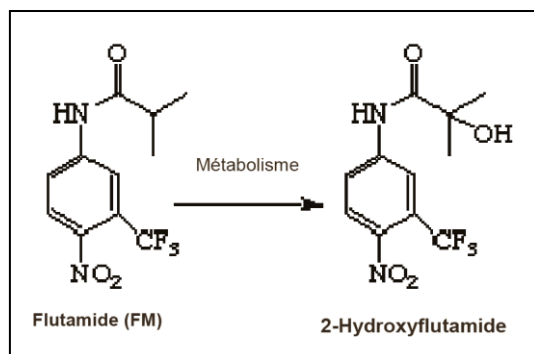
**Figure 18.** Les voies métaboliques de vinclozine chez le rat. D'après  
<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr18.htm>

L'administration de vinclozoline chez l'animal à différentes doses, par différentes voies (injections, gavages), et à différentes périodes (foetale, néonatale, puberté, adulte) engendre diverses anomalies au niveau de testicule. La période de sensibilité accrue à la vinclozoline est la période foetale dont la période la plus critique se situe aux 16<sup>ème</sup> et 17<sup>ème</sup> jours post-coïtum [127]. En effet, l'exposition foetale de rongeurs à la vinclozoline (dès 100 mg/kg/j) altère la différenciation sexuelle chez le mâle, qui se traduit à long terme chez l'individu adulte par des altérations de la spermatogenèse et de la prostate (atrophie, inflammation et hyperplasie), sans l'altération des taux plasmatique de testostérone [127-131]. Au niveau du testicule foetal, une augmentation d'apoptose des cellules germinales juste après l'arrêt du traitement a été mise en évidence [132]. Au niveau du testicule adulte, une exposition foetale à la vinclozoline induit une apoptose des cellules germinales ainsi qu'une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes [128, 131-133].

En utilisant ce même type de modèle expérimental, il a été démontré que les animaux développent également d'autres pathologies (ex: adénomes et carcinomes mammaires, anomalies des tubules rénaux) [134]. Les altérations épigénétiques qui touchent les testicules semblent transgénérationnelles et corrént avec l'infertilité masculine à l'âge adulte [129, 135].

#### 4.4.1.2.2 Flutamide

Le flutamide est un antiandrogène non stéroïdien, appartenant à la catégorie des hormones de synthèse (figure 19). Il est utilisé notamment dans le traitement des cancers de la prostate avec métastases, dans le cadre d'un traitement anti-hormonal [136, 137], en association avec une castration médicale ou chirurgicale. Il est également préconisé lors d'hirsutisme majeur chez la femme.



*Figure 19. Structure de Flutamide et son métabolite (2-Hydroxyflutamide).*

Le métabolite du flutamide, le 2-hydroxyflutamide est considéré comme l'agent actif, inhibant de façon compétitive la liaison des androgènes (testostérone et DHT) à leur récepteur [138, 139]. Le 2-hydroxyflutamide est capable de se lier à l'AR dans les cellules cibles [140], avec une affinité supérieure à celle du flutamide. Cet antiandrogène empêche ainsi la liaison du AR aux éléments de réponse des androgènes sur l'ADN et module la transcription des gènes androgéno-dépendants [141].

Le flutamide est capable de bloquer le rétrocontrôle de la testostérone au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse [142]. Ceci induit une augmentation de sécrétion de LH, provoquant une augmentation de la production et sécrétion de testostérone ainsi que la stimulation des cellules de Leydig et une hyperplasie.

Des rats mâles traités pendant leur vie fœtale par le flutamide développent une cryptorchidie, une hypospermatogénèse, une atrophie de la prostate, une diminution de la distance anogénitale et une rétention des mamelons [143-146]. L'hypospermatogénèse est caractérisée par une dégénérescence des spermatocytes, une diminution du nombre de cellules germinales (spermatocytes leptotènes, spermatides rondes et allongées), une diminution du nombre de spermatozoïdes viables, une augmentation de la fréquence de spermatozoïdes anormaux et

une altération des fonctions des cellules de Leydig sont observées dans le testicule de rats adultes traités pendant 14 jours ou 28 jours au Flutamide [142, 147-150]. Par ailleurs, des phénomènes de dégénérescence de l'épithélium séminifère ont également été décrits chez des rats adultes exposés au flutamide au cours leur vie fœtale [146, 151]. L'hypospermatogénèse observée chez ces rats adultes est liée à un phénomène d'apoptose des cellules germinales. Une augmentation de l'expression et de l'activation de caspases et de facteurs pro-apoptotiques, ainsi qu'une inhibition de facteurs anti-apoptotiques ont été identifiées ainsi qu'une altération de la fonction des cellules de Sertoli [152-154].

Chez des rats mâles adultes, l'administration de flutamide (100 mg/kg/j, pendant 28 jours) entraîne une augmentation du niveau de LH, de testostérone, de FSH et d'œstradiol, mais aussi, une diminution du poids des organes androgéno-dépendants (prostate, vésicules séminales et épидидyme), une hyperplasie des cellules de Leydig et une altération de la spermatogénèse [148, 149]. Les mêmes effets sont observés à dose plus faible [147, 155-157]. Ce phénomène apparaît néanmoins être réversible lorsque l'exposition a lieu à l'âge adulte [142]. En effet, 1 à 2 mois après l'arrêt de l'exposition au flutamide, on observe une restauration de la spermatogénèse [158].

#### 4.4.1.2.3 Prochloraz

Le prochloraz (PCZ) est un fongicide très largement utilisé en culture. Il appartient au groupe des « conozaoles » (voir figure 20). Le PCZ exerce son action fongicide en inhibant la protéine CYP51, conduisant à la fragilisation de membrane cellulaire fongique.

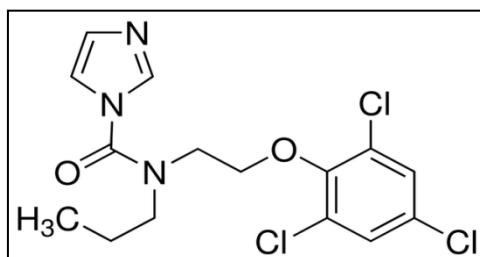


Figure 20. Structure de Prochloraz.

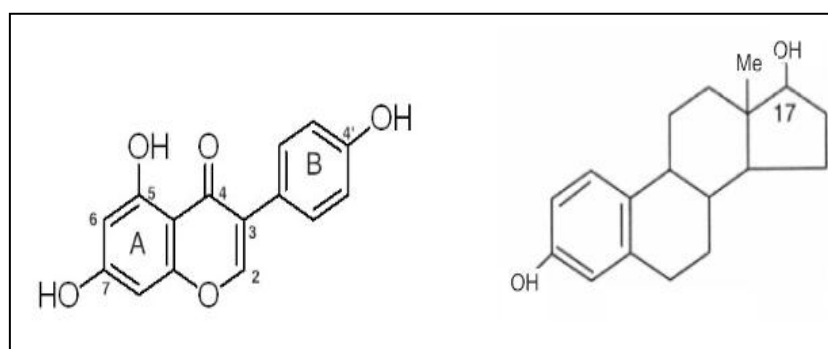
Le Prochloraz est un PEE car c'est un antagoniste d'AR [159-161], et il inhibe la stéroïdogénèse. L'exposition de rattes gestantes au PCZ, entraîne chez le fœtus, la diminution du niveau de testostérone et une augmentation du niveau de progestérone [161, 162].

De plus, le PCZ entraîne des altérations de la reproduction chez la progéniture mâles avec des anomalies du phallus, et une diminution du poids des organes reproducteurs et une rétention des mamelons [162-164]. Une étude épidémiologique suggère que les effets délétères de PCZ s'exercent chez l'homme. En effet, une augmentation du taux de cryptorchidie a été identifiée chez la descendance mâle de femmes danoises travaillant dans l'horticulture [165].

## 4.4.2 Les Perturbateurs endocriniens d'origine naturelle

### 4.4.2.1 Génistéine

La génistéine, est une isoflavone naturelle issue des plantes et appartient à la grande famille des flavonoïdes. On la retrouve principalement dans le soja mais elle est également présente à de plus faible quantité dans les pois, les lentilles ou haricot. Sa structure est très proche de celle d'un oestrogène important, le 17 $\beta$ -oestradiol (figure 21). La génistéine est classée comme un phyto-oestrogène, c'est à dire un composé issu des plantes et agissant comme les oestrogènes.



**Figure 21.** Structure moléculaire de la génistéine (à gauche) et du 17 $\beta$ -oestradiol (à droite).

Les études menées chez l'homme suggèrent sur effet protecteur des phytoestrogènes sur le développement de cancers comme le cancer du sein et de la prostate. La génistéine agit comme un estrogène non stéroïdien avec une activité estrogénique faible en se liant directement au niveau des récepteurs des estrogènes. L'utilisation de souris transgéniques (gène luciférase couplé à des éléments de réponse des estrogènes) a permis de montrer que la génistéine, administrée par voie orale ou par le lait maternel, pouvait entraîner au niveau testiculaire l'activation transcriptionnelle médiée par les ESRs [166, 167]. Des approches in

in vitro sur des spermatozoïdes humains et murins ont permis de mettre en évidence un effet positif de la génistéine qui stimulerait la capacitation et la réaction acrosomique [168]. Des expositions fœtales, durant la lactation ou encore chez l'adulte ont été réalisées, mais les résultats à ce jour restent encore équivoques. En effet, chez les rongeurs mâles, une exposition à de fortes doses de génistéine ou à une alimentation riche en soja durant la vie périnatale entraîne différentes anomalies: réduction de la distance ano-génitale, 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 [169, 170].

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 [171, 172]. 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 [173].

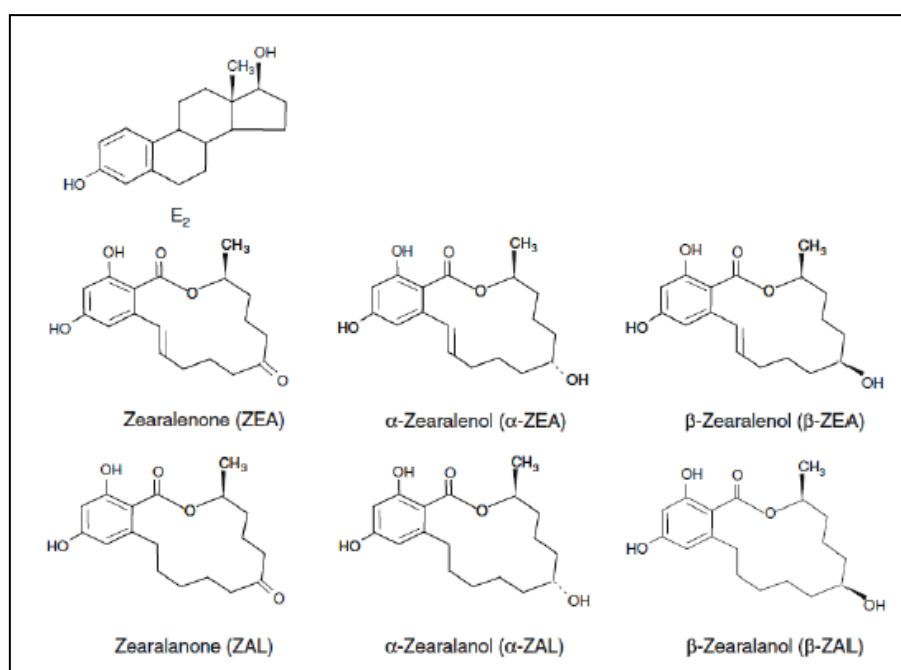
#### 4.4.2.2 Zéaralénone (ZEA)

La zéaralénone (ZEA) est une mycotoxine ayant une activité estrogénomimétique, 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) (voir tableau 6 et figure 21). La zéaralénone et un de ses métabolites  $\alpha$ - zéaralénol sont très souvent retrouvés 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 [174]. L'exposition à la ZEA pourrait entraîner 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.

Groupe de mycotoxines	Mycotoxines	Conditions d'apparition	Moisissures	Substrats
Aflatoxines	Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	Climats tropicaux et subtropicaux	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Arachide, maïs, sorgho
Ochratoxines	Ochratoxines A, B, C et D	Climats frais et tempérés	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Maïs, orge
		En cours de stockage		
Zéaralénone	Zéaralénone	Moisissures ubiquistes	<i>Fusarium</i>	Maïs, blé, sorgho

Déoxynivalénol	Vomitoxine (DON), Nivalenol, Fusarenone X (Trichothécènes B)	Moisissures ubiquistes	Fusarium	Maïs, orge, blé, avoine
	T2 toxine, HT2 toxine, Diacetoxyscirpenol (Tricho. A)			
Fumonisines	Fumonisines	Climats tempérés et climats chauds	Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum et Fusarium sp.	Maïs, orge, blé, avoine

**Tableau 6.** Présentation des différentes mycotoxines.



**Figure 22.** Structure de la zéaralénone et ses dérivés comparée à l'estradiol (E<sub>2</sub>).

La ZEA présente une action agoniste d'ESR1 et une action mixte agoniste-antagoniste au niveau d'ESR2 [175]. Par ailleurs, des approches in vitro couplées une analyse transcriptomique focalisée sur les gènes estrogénodépendants montrent que l'action estrogénique de la ZEA et de ses métabolites à faible doses serait globalement assez proche de l'action de l'estradiol [176]. 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 :  $\alpha\text{-ZOL} = \alpha\text{-ZAL} > \text{ZAL} > \text{ZEA} = \beta\text{-ZAL} > \beta\text{-ZOL}$ .

L'exposition de rongeurs à la ZEA entraîne des effets de type œstrogénique comme la diminution de fertilité, des augmentations de létalité embryonnaire, la diminution de taille des portées, des modifications des taux d'hormones sériques (progésterone, estradiol) [174, 177]. 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'œstradiol 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 [178]. Chez le rongeur adulte, l'injection de ZEA ou  $\alpha$ -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 [179, 180]. In vitro, la ZEA et le  $\alpha$ -ZOL inhibent la stéroïdogénèse au niveau de la cellule de Leydig via une répression de la transcription des gènes 3 $\beta$ -HSD, P450<sub>scc</sub> et STAR [181, 182]. Une exposition périnatale à ZEA affecte l'expression des transporteurs ABC (ABCB1, ABCC1, ABCG2, ABCC4 et ABCC5) avec délocalisation cellulaire d'ABCC4 dans le testicule. Le traitement d'une lignée de cellules de Sertoli par la ZEA modifie l'expression d'ABCB1, ABCC4 et ABCC5. L'effet de la ZEA est inhibé par de l'anti-œstrogène ICI 182,780, ce qui suggère l'implication partielle au moins de l'activité œstrogénique de la ZEA dans ces effets [183]. Chez la femelle, l'exposition à long terme à ZEA entraîne une diminution de l'expression des ESR2s dans les ovaires chez les chiennes et suggère des modifications épigénétiques comme mécanisme impliqué dans l'inhibition du développement de l'ovaire [184].

ZEA est capable de modifier plusieurs paramètres importants dans la réponse immunitaire de cellules hépatiques et suggère que la ZEA est non seulement un puissant mycotoxine œstrogène mais aussi un hépatotoxine potentiel lorsqu'il est administré par voie orale [185]. Cho ES et ces collègues ont démontré que la ZEA induit la toxicité testiculaire [186]. L'apoptose des cellules germinales est lié à la modulation de l'expression de Fas et Fas-L.





# 5. Apoptose des cellules germinales mâles

## 5.1 Apoptose et homéostasie tissulaire

L'apoptose ou mort cellulaire programmée assure l'homéostasie tissulaire. En effet, il y a un équilibre entre la prolifération et la mort des cellules constitutives d'un tissu. L'apoptose comprend trois phases (voir figure 23):

- une phase d'initiation, induite par différents stimuli exogènes ou endogènes.
- une phase effectrice où la cellule s'engage vers un point de non-retour.
- une phase de dégradation des structures cellulaires dont la plus caractéristique est la fragmentation de l'ADN.

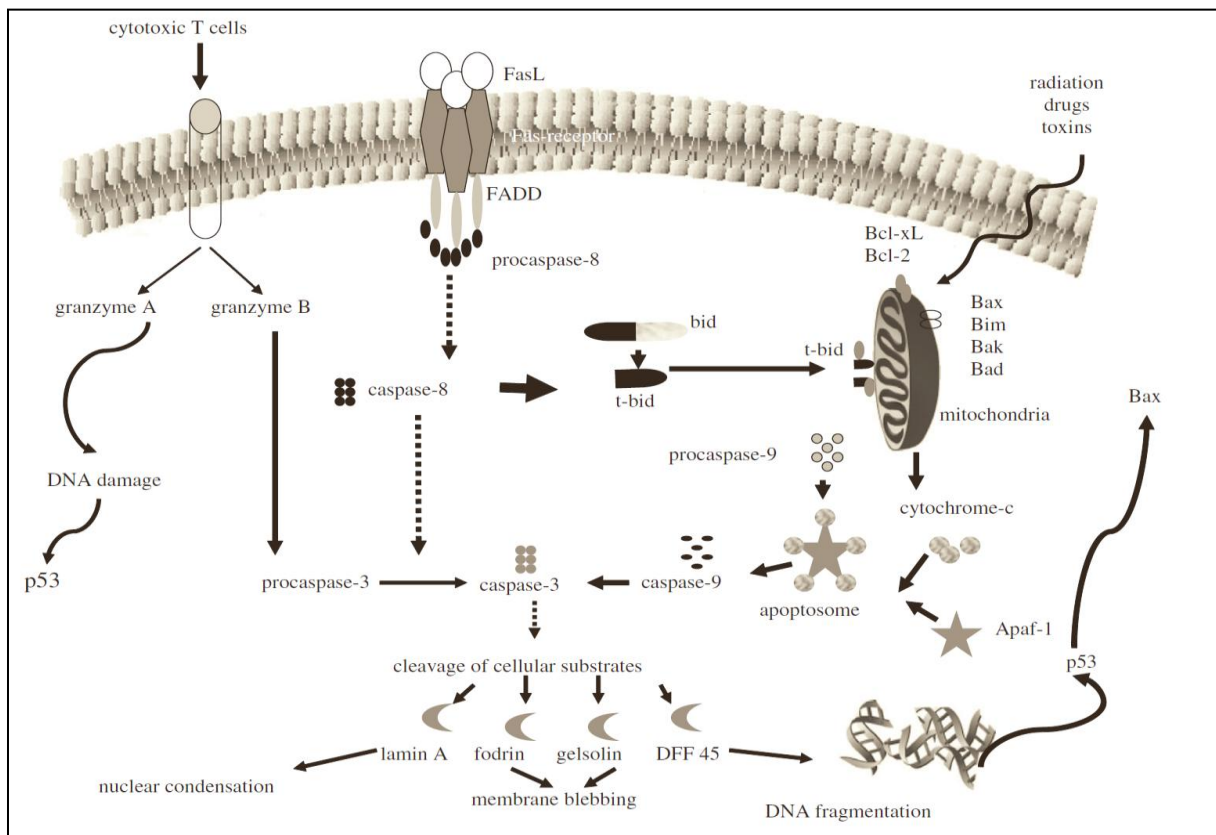


Figure 23. Les voies de l'apoptose. Schéma montrant les voies apoptotiques. D'après [187]

### ***5.1.1 Phase d'initiation***

La transduction des signaux apoptotiques s'effectue selon deux voies majeures mettant en jeu des molécules adaptatrices et des molécules effectrices: la voie des récepteurs de mort et/ou la voie mitochondriale [187, 188].

#### ***5.1.1.1 La voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque)***

Cette voie fait intervenir différents membres de la superfamille du TNF (Tumor necrosis factor), qui constituent trois systèmes principaux: Fas, TNF et TRAIL (TNF alpha related apoptosis-inducing ligand).

Les ligands FasL, sFasL (forme soluble) se fixent sur le récepteur Fas (CD95/APO-1), les ligands TNF $\alpha$  et TNF $\beta$  sur les récepteurs TNF-R1 et TNF-R2. Alors que TRAIL peut se lier à des récepteurs induisant un signal de mort (DR4, DR5) ou des récepteurs leurre. Dans la voie des récepteurs de mort, la protéine adaptatrice Fas-associated death domain (FADD) assure le recrutement d'une procaspase initiatrice (CASP8).

#### ***5.1.1.2 La voie mitochondriale (voie intrinsèque)***

Dans cette voie, les protéines intracellulaires de la famille Bcl-2 assurent la transduction du signal apoptotique. La famille Bcl-2 comportant à la fois des membres pro-apoptotiques (Bax, Bcl-x<sub>S</sub>, Bak, Bad) et des membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1). L'activation de cette voie correspond à l'activation de la protéine TP53 suite à des dommages de l'ADN ou une alteration de la mitochondrie. Cette activation induit la translocation de facteur pro-apoptotique comme Bax qui, par compétition avec les protéines anti-apoptotiques insérées dans la membrane mitochondriale externe, provoque la libération du cytochrome C et de la protéine Smac/diablo par la mitochondrie. Le cytochrome C assure le recrutement d'une procaspase initiatrice (CASP9) par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice Apaf-1.

### ***5.1.2 Phase effectrice***

Après la formation du complexe protéique (cytochrome C-Apaf-1-procaspase 9 ou FADD-procaspase 8 pour la voie de récepteur de la mort), la procaspase initiatrice est transactivée par clivage. La caspase initiatrice ainsi libérée (caspases-8, 10 ou 2 pour la voie des récepteurs de mort; caspase-9 pour la voie mitochondriale) est capable à son tour d'activer les caspases effectrices (caspases 3,6 ou 7). L'activité des caspases effectrices est régulée par

des protéines par inhibiteurs of apoptosis proteins (IAP), elles-mêmes régulées négativement par Smac.

### ***5.1.3 Phase de dégradation***

De nombreuses protéines sont des substrats des caspases effectrices parmi lesquels des composants du cytosquelette et du noyau, diverses protéases et DNases ainsi que des protéines de signalisation majeures comme la PKC, Raf1 ou MEKK [189].

Enfin, les protéases calpaïnes à activation calcium-dépendante régulent l'apoptose. Elles partagent un certain nombre de substrats avec les caspases, notamment des protéines du cytosquelette et de l'enveloppe nucléaire, des membres de la famille Bcl-2 et les procaspases elles-mêmes [190]. Cette phase aboutit à la dégradation de l'ADN et de la cellule en corps apoptotiques.

## ***5.2 L'apoptose au cours de la spermatogenèse***

Dans les tubes séminifères des testicules, la spermatogenèse est un processus dynamique et synchronisée de la maturation des spermatogonies souches en spermatozoïdes matures. Comme dans de nombreux tissus, le nombre de cellules dans les tubes séminifères du testicule est déterminé par un équilibre dynamique entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire par apoptose [191]. Lors de l'initiation de la spermatogenèse on observe une vague d'apoptose importante qui limite l'efficacité des premiers cycles spermatogénétiques. Les spermatogonies et les spermatocytes précoces sont des cibles privilégiées de cette apoptose physiologique (voir figure 24).

### ***- Protéines régulant l'apoptose des cellules germinales***

#### ***- Protéines de la famille de Bcl2 et p53***

L'apoptose qui a lieu lors du premier cycle de la spermatogenèse (entre le 10<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> jour après naissance chez le rongeur) fait intervenir les protéines de la famille Bcl2 [192]. En effet, il a été montré que la surexpression des protéines Bcl-2 [193, 194], Bclx et Bcl-w [193, 195] ou le knock-out de Bax chez la souris entraîne une forte augmentation du nombre des spermatogonies due à l'absence de la première vague de l'apoptose, et une altération des stades ultérieurs de la spermatogenèse [191, 194]. De plus, l'invalidation du gène Bcl- x chez la souris, entraîne de graves défauts dans les cellules germinales mâles en

cours développement. Des anomalies de la spermatogenèse sont aussi observées quand Bcl-2 est sélectivement surexprimé dans les cellules somatiques testiculaires [196]. Par contre, l'invalidation de Bcl-2 chez la souris n'altère pas la spermatogenèse. En revanche, les souris déficientes en Bcl-xL présentent un phénotype semblable au phénotype de surexpression de Bax avec une apoptose accrue de cellules germinales [191]. Ces résultats suggèrent que l'initiation de première vague d'apoptose des cellules germinales pendant le premier cycle de la spermatogenèse se traduit par une augmentation de l'expression des protéines Bax et Bad d'une manière dépendante de p53, entraînant le déplacement du rapport des membres pro- et anti- apoptotiques en faveur d'une signalisation mortelle [197].

#### - *Protéines BARD1*

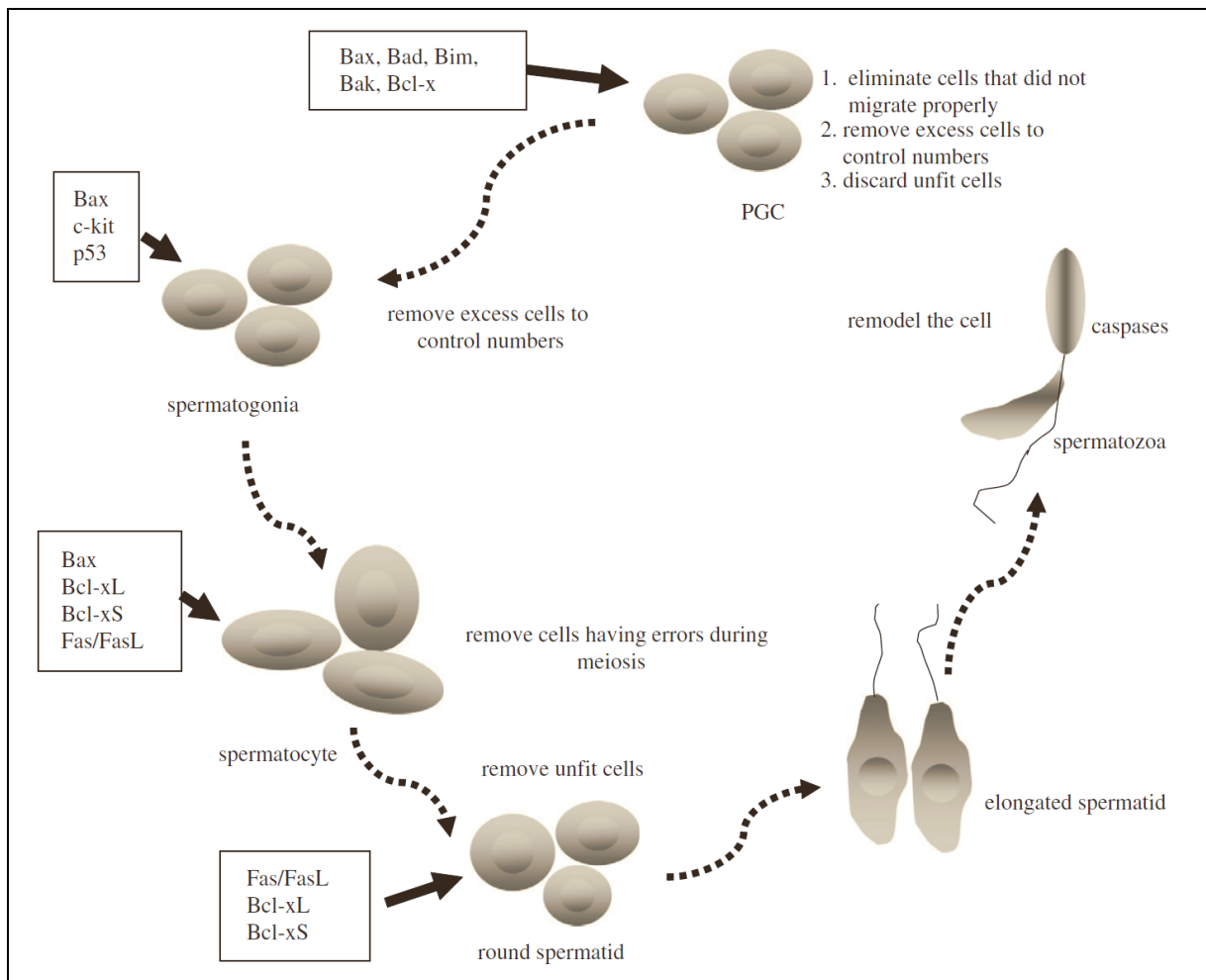
L'apoptose germinale induite par un stress fait intervenir aussi d'autres protéines. En réponse à un stress, les protéines BARD1 exprimés dans le testicule humain sont activées induisant l'apoptose [198]. Cette protéine est capable à se lier au gène BRCA1 (breast tumor suppressor gene 1) dont le produit intervient dans la réparation de l'ADN [199] et NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression des gènes de l'apoptose [200].

#### - *Protéine Survivine*

Des anomalies de l'expression de l'apoptose peuvent aussi signer des états pathologiques. Ainsi, la survivine est surexprimée dans les tumeurs testiculaires (TGCTs) [201].

#### - *Protéines Fas*

Bien que largement discuté, il semblerait que Fas, soit impliqué dans l'apoptose des cellules germinales [202]. Le récepteur Fas et son ligand sont exprimés respectivement par les cellules de Sertoli et les cellules germinales, ils assurent l'homéostasie des cellules germinales. Les spermatocytes pachytènes sont les principales cellules touchées en réponse à un apoptose induite et que la voie de signalisation Fas / FasL [203]. Fas ligand peut-être produit dans les testicules en réponse à une inflammation chronique et induit l'apoptose des cellules germinales [204]. De plus, le traitement de cultures de cellules testiculaires humaines avec un anticorps bloquant anti-Fas se traduit par une inhibition de l'apoptose des cellules germinales [205].



**Figure 24.** Schéma des niveaux où les molécules pro et anti-apoptotiques peuvent être impliquées dans la régulation de l'apoptose de cellules germinales. D'après [187].

Une autre famille de protéines a un rôle protecteur important au cours de la réponse cellulaire au stress. Ce sont les protéines de choc thermique (voir chapitre suivant). Elles semblent avoir un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose pendant la spermatogénèse.



# 6. Les protéines de choc thermique (HSPs)

## 6.1 Réponse au stress

Les cellules de tout organisme vivent dans des conditions environnementales physiologiques normalement stables mais elles peuvent être sujettes à des agressions aiguës ou chroniques. Cette situation impose une faculté d'adaptation indispensable pour la survie nécessitant la mise en œuvre de mécanismes permettant la détection du stress, quelle qu'en soit la nature, et des réponses adéquates visant à moduler les effets du stress. La première description des manifestations cellulaires de la "réponse au choc thermique" ("heat shock response") a été fournie en 1962. Ritossa observa une série d'élargissements ou renflements ("puffing") au niveau de certains des chromosomes géants des glandes salivaires de drosophiles soumises à un choc thermique. Au cours de la décennie suivante, plusieurs observations importantes ont permis de préciser la nature de ce phénomène. Il a ainsi été montré que les renflements étaient: (a) induits par plusieurs autres stress que l'hyperthermie, (b) produits quelques minutes après le stress, (c) associés à une nouvelle synthèse d'ARN, (d) trouvés dans différentes espèces de drosophiles et dans beaucoup de tissus différents, et (e) accompagnés par la régression d'autres renflements présents avant le stress [206-209]. Ces données suggéraient que ces élargissements chromosomiques correspondaient à l'induction rapide et vigoureuse de l'activité de gènes spécifiques lors de stress (les "heat shock genes"), accompagnée par la répression d'autres séquences géniques.

Les protéines de choc thermique (HSPs) sont impliquées dans le rétablissement de l'homéostasie protéique au sein de la cellule après un stress. En effet, les HSPs sont des protéines chaperones capables de prévenir des interactions inappropriées entre protéines par l'interaction avec les protéines dénaturées afin de prévenir la formation d'agrégats protéiques et d'assister les protéines pour qu'elles retrouvent leur structure tridimensionnelle native [210]. La réponse au stress est assurée par l'activation transcriptionnelle de gènes codants pour les formes inductibles des HSPs, ce qui mène à la prise en charge des protéines dénaturées. Lorsque le stress est corrigé, les HSPs retrouvent leur niveau d'expression et leur activité de base.



## 6.2 Classification et fonctions des HSPs

En fonction de leur poids moléculaire, les HSPs sont regroupées en six familles principales HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP47 et HSP25-30 kDa (small HSPs). Ces familles présentent des propriétés communes, mais chaque famille a des particularités, soit liées à leur mécanisme d'action, leur localisation intracellulaire ou bien la nature inductible de leur expression.

La famille des HSP90 englobe les protéines les plus exprimées constitutivement. Cette famille est composée de quatre membres principaux : HSP90 $\alpha$ , HSP90 $\beta$ , GP96 et TRAP1.

Les protéines de la famille des HSP60 (chaperons mitochondriaux) sont exprimées constitutivement, alors que les protéines HSP70 et HSP27 sont fortement induites lors d'un stress.

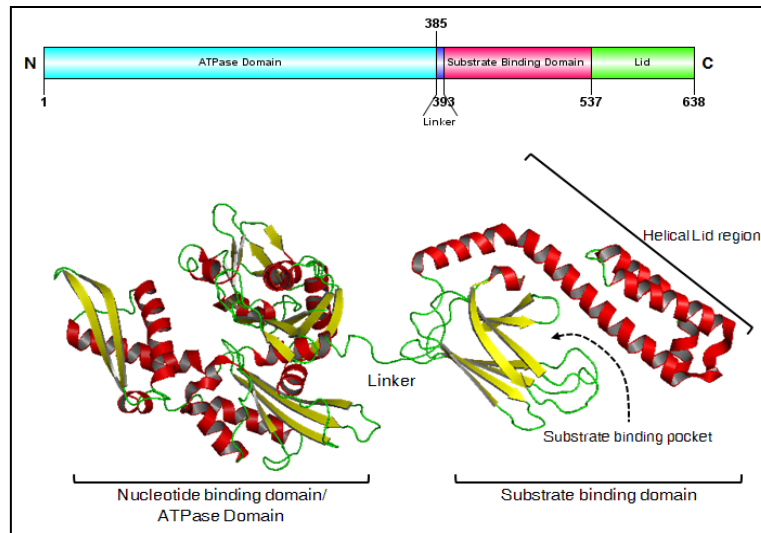
Nous ne développerons ici que les deux familles les mieux caractérisées à ce jour : HSP70 et HSP27.

### 6.2.1 La famille HSP70

Les HSP70s sont les protéines les plus étudiées, les plus abondantes et les plus conservées. Leur masse moléculaire est de 70 kDa. Les protéines de cette famille présentent un haut pourcentage d'identité de séquence avec les HSP70s d'autres organismes (50% d'homologie entre le gène humain *HSP70* et son homologue *DnaK* chez *E.coli*, et plus de 70% avec celui de la drosophile) [211]. Cette famille comprend des protéines possédant une structure commune qui contient deux domaines: une extrémité N-terminale hautement conservée portant l'activité ATPase et une extrémité C-terminale moins conservée liant des peptides (voir tableau 7 et figure 25).

	Gene name	Protein name	Old names	Human gene ID	Mouse ortholog ID
HSP A					
1	<i>HSPA1A</i>	HSPA1A	HSP70-1; HSP72; HSPA1	3303	193740
2	<i>HSPA1B</i>	HSPA1B	HSP70-2	3304	15511
3	<i>HSPA1L</i>	HSPA1L	hum70t; hum70t; Hsp-hom	3305	15482
4	<i>HSPA2</i>	HSPA2	Heat-shock 70kD protein-2	3306	15512
5	<i>HSPA5</i>	HSPA5	BIP; GRP78; MIF2	3309	14828
6	<i>HSPA6</i>	HSPA6	Heat shock 70kD protein 6 (HSP70B')	3310	X
7	<i>HSPA7<sup>a</sup></i>	HSPA7	Heat shock 70kD protein 7	3311	X
8	<i>HSPA8</i>	HSPA8	HSC70; HSC71; HSP71; HSP73	3312	15481
9	<i>HSPA9</i>	HSPA9	GRP75; HSPA9B; MOT; MOT2; PBP74; mot-2	3313	15526
10	<i>HSPA12A</i>	HSPA12A	FLJ13874; KIAA0417	259217	73442
11	<i>HSPA12B</i>	HSPA12B	RP23-32L15.1; 2700081N06Rik	116835	72630
12	<i>HSPA13<sup>b</sup></i>	HSPA13	Stch	6782	110920
13	<i>HSPA14</i>	HSPA14	HSP70-4; HSP70L1; MGC131990	51182	50497

**Tableau 7.** Les différentes protéines de la famille HSP70 (HSPA). D'après [212]



**Figure 25.** Structure et organization des domaines de Hsp70. D'après (<http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp70.php>)

Les protéines HSP70s assurent la fonction de chaperone moléculaire car elles protègent de façon transitoirement des protéines immatures ou dénaturées (mauvaise conformation) pour éviter leur agrégation ou leur perte de fonction. Grâce à leur extrémité carboxy-terminale, Les HSP70 lient des segments courts et linéaires de peptides ou de protéines non repliées [213]. Cette fonction est ATP-dépendant: les polypeptides interagissent transitoirement avec le domaine de liaison aux peptides de HSP70, ce qui stimule l'hydrolyse de l'ATP et mène à un changement de conformation de HSP70, augmentant son affinité pour le peptide. Ensuite, le peptide lié est relâché lors de l'échange de l'ADP avec un nouvel ATP [214].

### 6.2.1.1 HSPA1

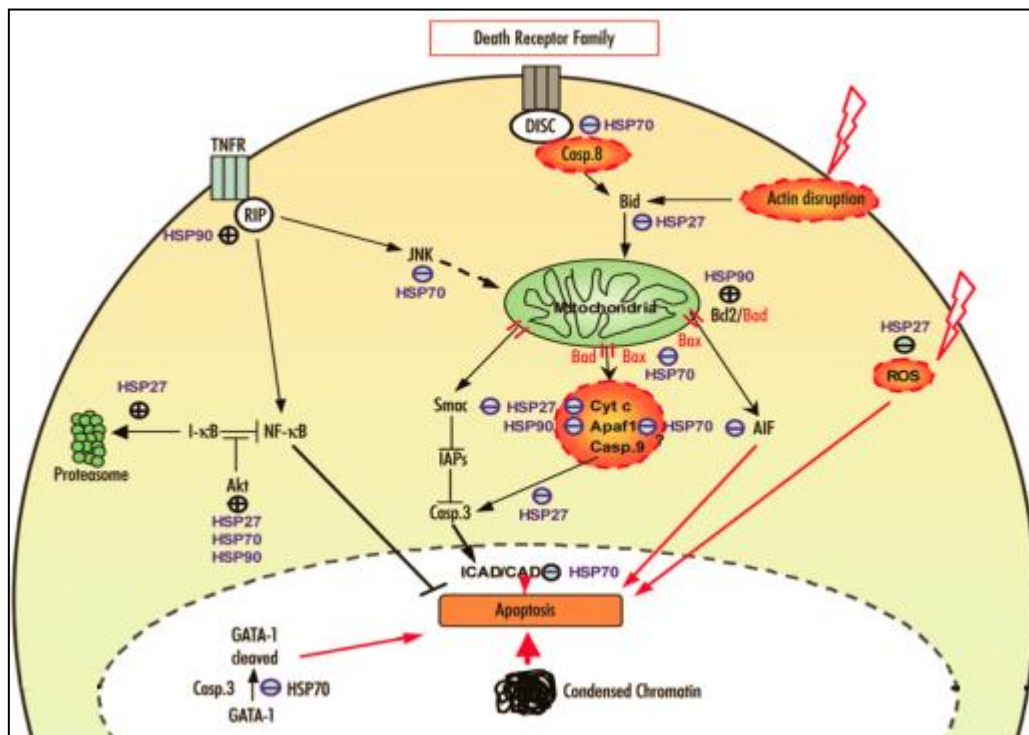
Cette protéine est codée par deux gènes voisins localisés au locus 6p21.γ : *hsp70.1* (*hspa1a*) et *hsp70.3* (*hspa1b*). La transcription des ces gènes est fortement induite en cas de stress dans tous les types cellulaires [215]. Les deux protéines HSPA1A et HSPA1B sont si proches qu'on les regroupe sous l'appellation commune d'HSP70.

#### - Rôles de la protéine HSPA1:

##### A) Rôles dans la thermotolérance

Il a été montré que HSP70 joue un rôle crucial dans la thermotolérance. La réponse au choc thermique, HSP70 est activée par plusieurs inducteurs y compris les métaux lourds, les poisons métaboliques, l'hypoxie, les radicaux libres, la déplétion d'ATP,

les radiations et les toxines [213]. Elle est nécessaire à la survie et au maintien des fonctions cellulaires lors de l'exposition à différents stress physiques ou biologiques. HSP70 montre une faible expression dans les conditions physiologiques avec une localisation cytoplasmique, où elle exerce sa fonction de chaperon moléculaire pour les protéines en cours de maturation. Lors de l'activation de la réponse au choc thermique, la fraction HSP70 déjà présente dans la cellule subit une relocalisation nucléaire, et la forme induite est exprimée dans le cytoplasme [216, 217]. En période de stress, HSP70 reconnaît et se lie aux séquences hydrophobes exposées des protéines dénaturées. HSP70 prévient de cette manière leur agrégation et peut contribuer à leur repliement adéquat dans un cycle dépendant de l'ATP [218].



**Figure 26.** Modulation de l'apoptose par les HSPs. HSP70 bloque l'apoptose par l'inhibition de JNK et translocation mitochondriale de Bax en interagissant avec AIF et/ou Apaf-1 ou en protégeant les protéines nucléaires clivées par casp-3. HSP27 peut bloquer l'activation des caspases par son action sur la F-actine, Bid, ROS ou cytochrome C. HSP27 entraîne également la dégradation des protéines I-κB par le protéasome. (→, stimulation; ⊥, inhibition) d'après [219].

### B) Rôles dans l'apoptose

HSPA1 représente l'HSPs la plus active dans la régulation de la survie cellulaire en assurant l'inhibition du processus de mort programmé par apoptose (figure 26). HSP70 agit au niveau de la voie intrinsèque de l'apoptose [220]. HSP70 empêche le

recrutement de la procaspase 9 par l'apoptosome et ainsi prévient l'activation de caspase initiateur 9 [221]. HSP70 pourrait aussi inhiber la libération du cytochrome c [222]. Hsp70 bloque l'apoptose aussi en amont de l'apoptosome. HSP70 agit sur JNK et Mcl-1 [223], en inhibant le transfert et la fixation de Bax sur la membrane mitochondriale externe, empêchant ainsi la perméabilisation et la libération dans le cytosol de cytochrome c et d'AiF [224]. HSP70 inhibe également Bax en protégeant Mcl-1 de la protéolyse.

HSP70 inhibe aussi l'apoptose indépendante des caspases [224, 225]. En effet, elle empêche la translocation nucléaire d'Apoptosis Inducing Factor (AIF) et inhibe ainsi la condensation chromatinienne. En outre, HSP70 peut aussi inhiber la perméabilisation de la membrane lysosomale, ce qui constitue un autre mécanisme de contrôle de l'apoptose [226, 227].

### **C) Rôles dans le cancer**

Une étude récente suggère que HSPA1 joue rôle extracellulaire pour assurer la croissance tumorale [228]. En effet, HSPA1 active la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B par liaison aux récepteurs Toll-like receptor 2 et 4 (TLR2 et TLR4). Grâce à sa capacité à prévenir l'apoptose, HSP70 est surexprimée dans les cellules cancéreuses, elle les protège contre la mort induite par de nombreux agents anticancéreux [229]. Son expression dans les cancers est associée à la malignité et à un faible pronostic [230].

### **D) Rôles dans la différenciation**

HSP70 joue également un rôle dans les processus de différenciation [219].

## **6.2.1.2 HSPA2**

Chez l'homme, cette protéine est codée par un gène localisé au locus 14q24.1. HSPA2 est surexprimée dans les testicules et le cerveau avec une expression très faible et constitutive dans les autres organes [231].

Dans le testicule, la régulation de HSPA2 est très active durant la phase méiotique de la spermatogenèse. L'inactivation de HSPA2 chez des souris mâles induit leur stérilité en raison d'une apoptose massive des spermatocytes [232]. Des études cliniques confirment le rôle potentiel de HSPA2 dans l'infertilité masculine humaine. En effet, le niveau de HSPA2 est plus faible dans le plasma séminal de patients infertiles que des patients fertiles [233, 234]. Le protéome du sperme des patients infertiles a révélé une diminution d'expression de HSPA2 dans les spermatozoïdes. Ceci altère l'interaction sperme-œuf [235].

### - *Régulation de l'expression de HSPA2 dans le testicule*

Outre la régulation par les facteurs de transcription HSF1 et HSF2 (voir plus loin), l'expression de HSPA2 est régulée par plusieurs protéines, en particulier par la protéine HLA-B-associated transcript3 (BAT3) [236]. En effet, l'inactivation conditionnelle de Bat3 chez la souris entraîne une apoptose généralisée des cellules germinales méiotiques et l'infertilité masculine. Les souris déficientes en BAT3 n'expriment plus la protéine HSPA2 dans les testicules et ce à tous les stades de la spermatogenèse. Toutefois, l'ARNm de HSPA2 garde son niveau normal. Une explication possible est que BAT3 induit la polyubiquitination de la protéine HSPA2, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. Une autre protéine régule l'expression protéine HSPA2. La protéine de liaison d'ARN Human antigen R (Hur) assure la régulation post-transcriptionnelle de HSPA2 au cours de la spermatogenèse [237]. Hur contrôle le stockage, la stabilité et la traduction de l'ARNm de HSPA2. En effet, l'inactivation conditionnelle de gène Hur dans les cellules germinales entraîne une diminution de l'expression de HSPA2 entraînant la stérilité chez les mâles, mais pas chez les femelles. Les mâles présentent une azoospermie en raison de la mort massive de spermatocytes méiotiques et de l'échec de l'allongement des spermatides.

#### **6.2.1.3 *HSC70t / HSPA1L***

Dans les testicules, cette protéine est exprimée par les cellules germinales, pendant la phase post-méiotique de la spermatogenèse [238]. Cette protéine est exprimée principalement dans les spermatides allongées [239]. Le rôle dans la spermatogenèse de cette protéine non inductible reste obscur, mais elle pourrait être impliquée dans le maintien du testicule à une température plus basse que le reste de l'organisme. Le seul autre tissu où l'on peut trouver HSC70t est l'épithélium olfactif murin ou humain [240].

#### **6.2.1.4 *HSC70 / HSPA8***

Cette protéine ubiquitaire est l'homologue constitutif de HSP70 (*Cognate HSP70*). Elle a une localisation cytoplasmique, mais aussi nucléaire [213]. Son expression est très peu induite par un choc thermique. Elle joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires. Hsc70 inhibe l'expression et le fonctionnement du canal sodique à la surface apicale de l'épithélium en régulant à la fois sa biogénèse et son trafic à la surface des cellules [241].

La méthylation de Hsc70 par le méthyltransferase METTL21A modifie sa fonction de protéine chaperone [242]. En effet, la triméthylation de HSPA8 (Hsc70) modifie l'affinité de

cette protéine pour les deux formes monomère et fibrillaire de la protéine  $\alpha$ -synucléine associée à la maladie de Parkinson.

HSC70 régule l'apoptose par l'interaction avec glioma pathogenesis-related protein 1 GLIPR1. Cette interaction entraîne la déstabilisation de SP1 et c-Myb, deux facteurs de transcription de deux protéines qui inhibent l'apoptose: AURKA et TPX2 [243].

Dans le testicule de lapin, le niveau de son expression ne se change pas au cours du développement. HSC70 est localisée principalement dans les spermatides aux stades VII-VIII et dans le cytoplasme de la spermatogonie [244]. HSC70 est sensible au stress [245]. En effet, l'augmentation de température entraîne la surexpression de HSC70 dans les testicules des lapins.

## 6.2.2 La Famille des petites protéines de stress (Small Hsps)

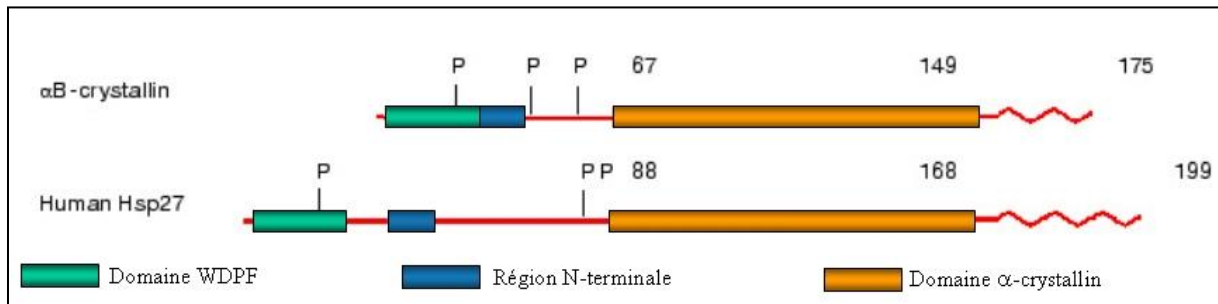
### 6.2.2.1 Généralités

Ce sont des protéines de choc thermique de faible poids moléculaire (entre 15 et 30 kDa) (voir tableau 8).

Small HSP	Class	Heat induction	Preferential tissue distribution	Transcription factor family Tissue specificity/development	Transcription factor family Stress/diseases
HSPB1/Hsp27	I	Yes	Ubiquitous	- HSF - BRN3	- HSF - ER, SP1 - ATF - LEDGF - BRN3 - HIF
HSPB5/ $\alpha$ B-crystallin	I	Yes	Lens/heart/muscle	- Pax, large Maf, BRG1/HMGA <sup>a</sup> (LSR-promoter region) - SOX - GR ( $\alpha$ BE1 <sup>b</sup> ) - AhR (edge $\alpha$ BE2 <sup>b</sup> ) - SP1 (edge $\alpha$ BE3 <sup>b</sup> ) - SRF ( $\alpha$ BE4 <sup>b</sup> ) - MyoD, USF (MRF) ?	- HSF - NFAT/HSF1 - NFAT/STAT/Nished ( $\alpha$ BE4) - ETS - LEDGF
HSPB6/Hsp20	I	No	Heart/skeletal muscle	?	
HSPB8/Hsp22	I	Yes (cell type dependent)	Heart/muscle/brain	- HSF	- HSF - ER
HSPB4/ $\alpha$ A-crystallin	II	No	Lens	- USF - Large Maf, Pax - AP1/CREB - $\alpha$ A-CRYBP	?
HSPB2/MKBP	II	No?	Heart/skeletal muscle	- GR ( $\alpha$ BE1 <sup>b</sup> )	- HSF?

**Tableau 8.** Les différentes protéines de la famille des petites protéines de choc thermique (HSPB). D'après [246].

Les protéines de cette famille sont abondantes et ubiquitaires. La famille des sHSPs est celle qui présente la plus grande hétérogénéité de structure et une plus faible homologie de séquence entre les membres de cette famille [247]. Elles sont cependant caractérisées par la présence d'une séquence commune d'une centaine d'acides aminés très conservés au sein de cette famille appelée domaine  $\alpha$ -cristallin [248] (figure 27).



**Figure 27.** Structure générale des sHSP. D'après  
(<http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/22332/ch01.html>)

Les sHSPs contribuent à la résistance au choc thermique [249] ainsi qu'à la protection d'autres stress, elles jouent ainsi un rôle crucial dans la survie cellulaire [250, 251]. Comme les autres HSPs précédemment décrites, elles assurent également la fonction de chaperon moléculaire [252, 253]. Contrairement aux autres HSPs, les sHSPs opèrent sans utiliser l'ATP.

## 6.2.2.2 HSPB1(HSP27)

### 6.2.2.2.1 Structure et expression

C'est la petite protéine de choc thermique la plus largement étudiée. C'est une protéine de 27 kDa contenant le domaine  $\alpha$ -cristalline commun à toutes les small HSP et des régions C et N terminales différentes. Le domaine  $\alpha$ -cristalline comprend notamment une région située entre les résidus 133 et 144 essentielle au contact entre les monomères. Dans cette région, le résidu Cys137 contribue à la stabilité des dimères par formation de ponts disulfures [254]. L'extrémité N-terminale, en particulier le motif WDPF, assure la stabilisation des oligomères [255]. La queue C-terminale participe aussi à la



stabilisation des complexes par des interactions polaires dues à ses charges négatives [256]. Elle est fortement induite en réponse à un stress cellulaire et s'accumule plus lentement que HSPA, ce qui fait d'elle une HSP dite « tardive » [257]. HSP27 est ubiquitaire. Son niveau d'expression basal est relativement faible, mais présente une grande variabilité selon le type cellulaire.

#### **6.2.2.2 Activation de HSPB1**

En absence de stress, HSPB1 a une distribution cytoplasmique [258]. Elle semble cependant être majoritairement concentrée dans la région périnucléaire [251]. Lors d'un stress, elle peut être transportée vers le noyau de manière transitoire [259]. En réponse à un choc thermique, le facteur de transcription HSF-1 est activé pour se lier aux HSE (*Heat Shock Element*) d'HSPB1 entraînant son activation sous la forme d'oligomères dont la taille varie de 50 à 800 kDa [260].

La protéine HSP27 humaine peut être phosphorylée au niveau de trois résidus sérine distincts: Ser15, Ser78 et Ser82 [261]. Un autre site mineur de phosphorylation, le résidu Thr143 a été également identifié [262]. La phosphorylation d'HSPB1 est assurée principalement par la voie de la p38 MAP kinase. Les trois résidus sérine d'HSPB1 sont phosphorylés par les kinases MAPKAP2 et MAPKAP3, elles-mêmes activées par phosphorylation par la MAPK p38 [261, 263, 264]. La phosphorylation d'HSPB1 par la voie p38 peut être induite par de nombreux stimuli, dont le stress thermique, le stress oxydatif et l'exposition à des agents chimiques.

L'exposition à un stress induit une phosphorylation rapide d'HSPB1 et des changements dans son état d'oligomérisation suivie d'une accumulation de la protéine sous forme de petites oligomères [265]. Mais *in vivo*, coexistent des structures oligomériques de diverses tailles, ce qui suggère que d'autres mécanismes pourraient réguler l'oligomérisation d'HSPB1 [266].

#### **6.2.2.3 Fonctions**

##### **- Rôle de protéine chaperonne**

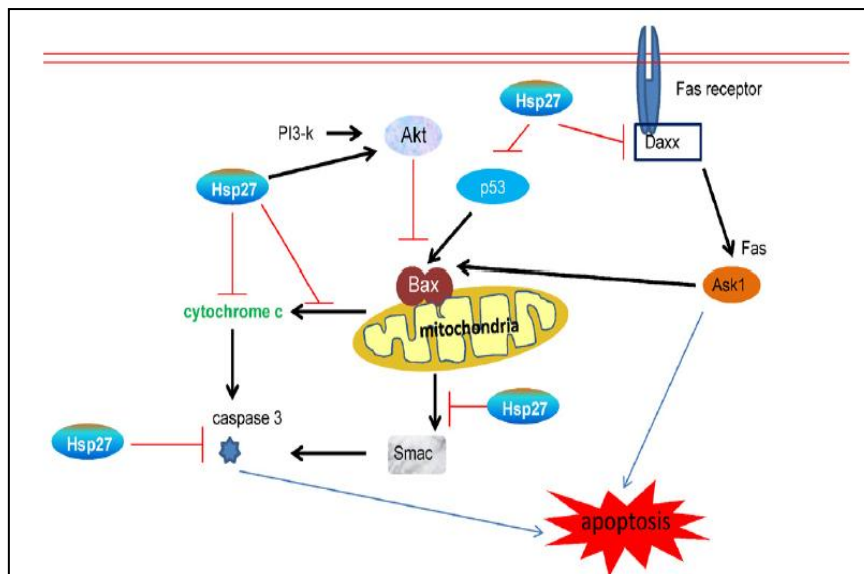
HSPB1 joue un rôle de chaperon moléculaire lui permet de lier un grand nombre de protéines dénaturées, et donc de prévenir la toxicité due à la formation d'agrégats protéiques [258]. Elle protège le cytosquelette, et plus précisément les microfilaments d'actine [267]. Plusieurs études ont montré que la surexpression d'HSPB1 en conditions de stress telles que l'hyperthermie ou l'exposition à des agents oxydants, conduit à la stabilisation des filaments de F-actine, et donc à la protection de l'architecture cellulaire [268].



En plus de son activité de protéine chaperonne, HSPB1 empêche l'apoptose en protégeant la cellule contre différents stimuli apoptotiques.

- **Régulation de l'apoptose par HSPB1** (figure 28)

HSPB1 régule négativement l'apoptose [229, 269]. En effet, l'inhibition d'HSPB1 dans des cellules de cancer de la prostate induit l'apoptose *via* l'activation de la caspase 3 [270]. HSPB1 peut interagir avec la voie intrinsèque, mais aussi la voie extrinsèque de l'apoptose. Dans la voie intrinsèque, HSPB1 se lie au cytochrome c et bloque ainsi la formation de l'apoptosome [271, 272]. HSPB1 inhiberait la libération du cytochrome c, en empêchant la relocalisation du facteur proapoptotique BAX vers la mitochondrie [273, 274]. Une autre étude suggère qu'HSPB1 prévient l'activation de caspase 3 [275]. Le mode d'action d'HSPB1 vis-à-vis de cette voie apoptotique reste controversé, puisque des résultats contradictoires montrent que l' $\alpha$ B-crystallin peut interagir avec le cytochrome c, mais pas HSPB1 [276].



**Figure 28.** Modulation de l'apoptose par HSPB1 (HSP27). D'après [277]

HSPB1 empêche l'activation de Bax par interaction avec la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) et activation de la kinase Akt [278]. Au niveau de la mitochondrie, HSPB1 inhibe également la libération la molécule proapoptotique Smac, qui est un inhibiteur des

protéines IAPs (*Inhibitor of apoptosis proteins*) [279]. HSPB1 agit aussi au niveau de la voie extrinsèque de l'apoptose par inhibition de la liaison de FasL à son récepteur [280].

HSPB1 s'associe à la protéine Daxx empêchant ainsi la liaison d'ASK1 avec Fas [279, 281]. HSP27 a une fonction antioxydante capable de réduire le taux de ROS (*Reactive oxygen species*) et de neutraliser les effets toxiques des protéines oxydées suite à un stress oxydant [282].

## 1.4 Les motifs consensus Heat Shock Element-HSE

L'utilisation de la technique d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP) et des outils bioinformatiques ont permis de définir le motif HSE lié par HSF1: nnTTCnnGAAnnTTC (Figure. 31) [283]. Ces travaux indiquent que la guanidine dans le triplet nGAAn constitue le nucléotide le plus conservé du motif. De même, le triplet de nucléotide TTC en 5' est séparé du GAA par une paire de pyrimidine-purine. Le triplet de nucléotide TTC en aval du GAA est précédé de deux nucléotides non conservés. L'organisation en cluster et la proximité du site initiation de la transcription de ces HSE varient selon les Hsps.

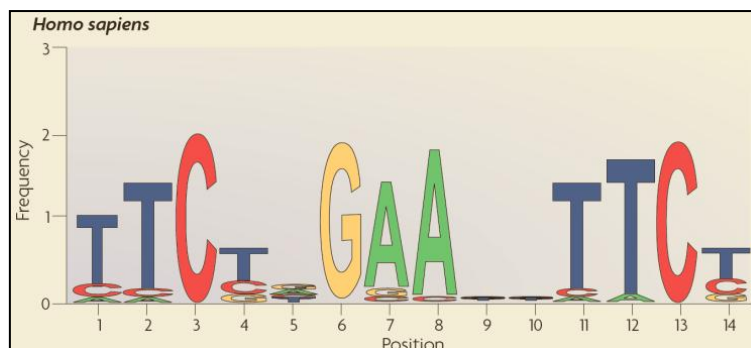


Figure 29. Représentation du motif HSE. D'après [284].

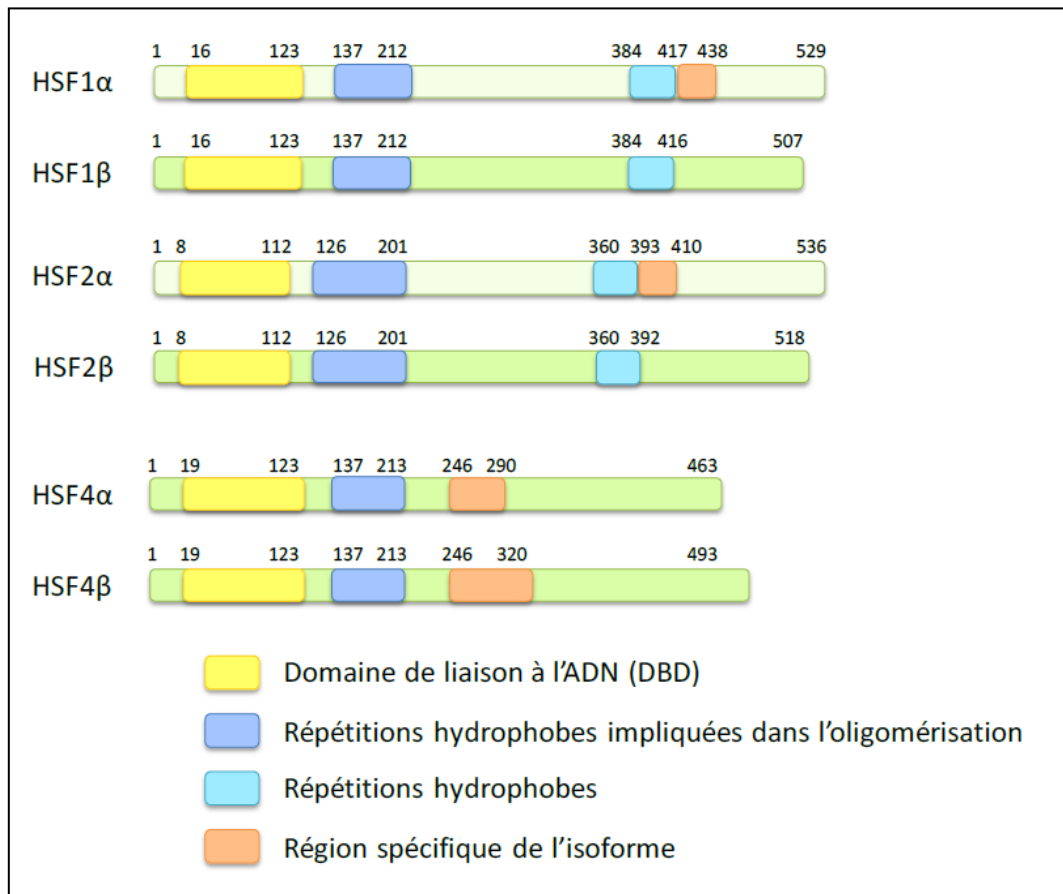
## 1.5 Les facteurs de transcription du choc thermique

Le mécanisme de régulation inductible en réponse à un stress est conservé de la bactérie à l'homme. L'identification de facteur de transcription du choc thermique chez la levure a permis d'isoler les orthologues chez la drosophile puis chez les mammifères et les

plantes. Un seul Heat shock factor (HSF) a été identifié dans le génome d'espèces telles que la drosophile, la levure ou le ver.

En revanche, quatre gènes HSF ont été clonés chez les vertébrés: HSF1, HSF2, HSF 3 et HSF4. Les facteurs HSF1 et HSF2 sont exprimés de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus et types cellulaires. HSF3 est connu jusqu'à présent uniquement dans des cellules aviaires [285]. Ces dernières années, deux autres facteurs, HSF4 et HSF5, ont été identifiés dans le génome des mammifères [286]. Enfin, chez les plantes, la famille des HSFs comprend de nombreux membres et variants [287].

Les HSFs sont relativement bien conservés au cours de l'évolution. Leur structure contient plusieurs domaines principaux [288] (Figure 30):



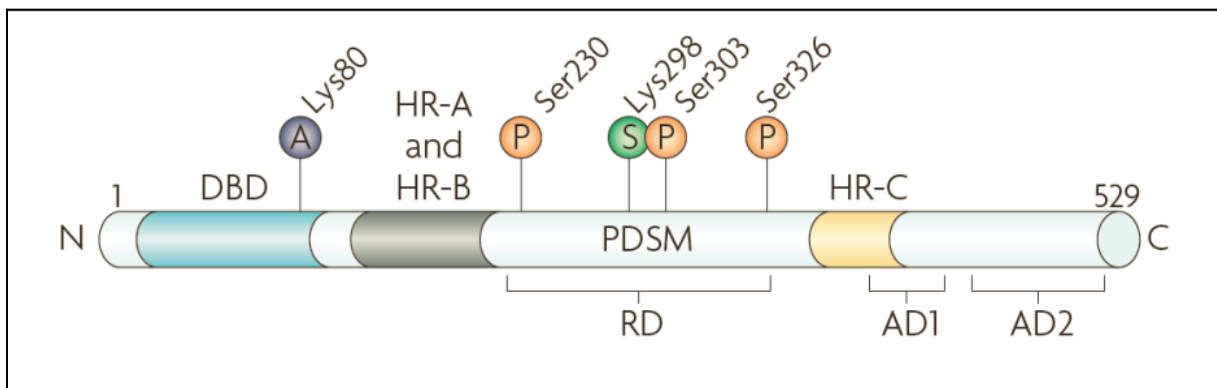
**Figure 30.** Structure des différents HSFs humains. Adapté d'après [288].

## 6.2.3 La protéine HSF1

### 6.2.3.1 Structure

En réponse au stress, HSF1 semble le principal facteur d'activation transcriptionnel chez les mammifères. En effet, la déficience pour le gène *Hsf1* abolit totalement l'induction de l'expression des principales HSPs après un choc thermique ainsi que la thermotolérance [289, 290].

HSF1 est composé de plusieurs domaines auxquels une fonction spécifique est attribuée : un domaine de liaison à l'ADN, un second responsable de la trimérisation de HSF qui est une étape nécessaire à son activation, un troisième permettant l'activation transcriptionnelle et, adjacent à ce dernier, une séquence dont le rôle semble être de supprimer l'activité de HSF par le biais d'une liaison avec le domaine de trimérisation [291](figure 31).



**Figure 31.** Structure de HSF1 et ces différents sites de phosphorylation. Domaine de liaison à l'ADN (DBD), domaine de trimérisation ((HR A, B et C), domaines de transactivation (RD et AD1/2). Toutes les modifications post-traductionnelles connues sont indiquées. Une phosphorylation en position 303 (Ser) dépendant de la sumoylation. D'après [284].

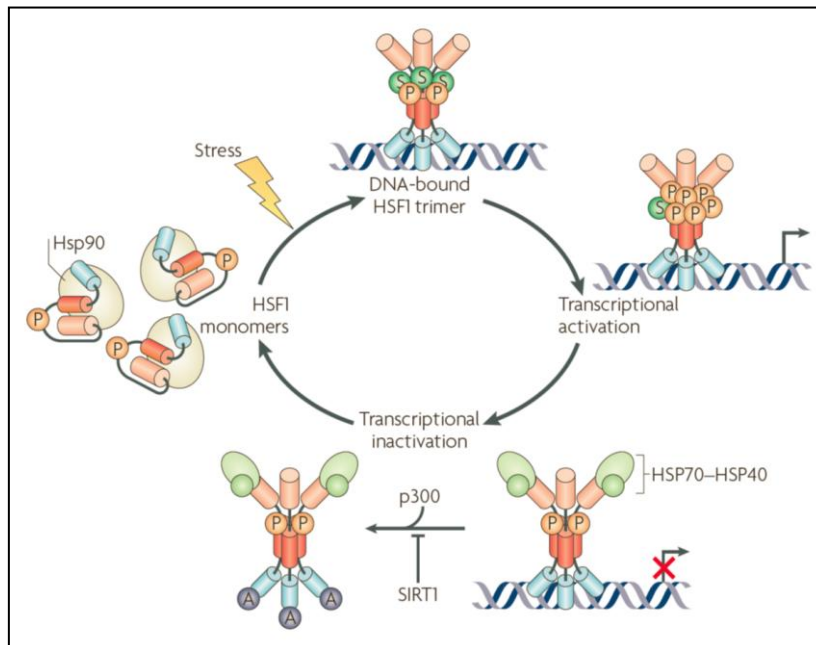
### 6.2.3.2 Régulation du facteur HSF1

La compréhension des événements régissant le cycle d'activation-désactivation de HSF1 a révélé que les chaperons moléculaires tels que les Hsp70 semblent jouer un rôle direct dans la régulation de leur propre expression [292]. Ainsi, la forme monomérique de HSF1 est titrée dans le cytoplasme par différents facteurs cellulaires. Cette idée repose sur le fait que la surexpression de HSF1 dans des cellules en culture, active de

manière constitutive la réponse au choc thermique [293]. Un rétrocontrôle négatif a été établi impliquant le complexe de HSP70/HSP40 sur la base de recherche d'interactions protéine/protéine.

Une protéine chaperone exprimée de manière abondante et ubiquitaire, HSP90, est également associée à ce complexe multichaperone répresseur de l'activité HSF1 (figure 32).

D'autres facteurs intervenant également dans ce cycle de régulation ont été décrits, tel le facteur HSBP1 (heat shock factor binding protein 1) [294]. Les connaissances portant sur les facteurs de régulation négative de HSF1 évoluent rapidement, mais celles concernant les activateurs sont peu avancées.



**Figure 32.** Modèle de régulation du facteur HSF1. En condition physiologique, HSF1 est sous forme de monomères et son activité est réprimée par les sites phosphorylés: Ser303, Ser307, Ser363. Suite à l'induction d'un stress, l'état de phosphorylation du site Ser230, induit l'activité transactivatrice de HSF1. D'après [284].

### 6.2.3.3 Modifications post-traductionnelles de HSF1

Les modifications post-traductionnelles observées au niveau de la protéine HSF1 sont impliquées dans le maintien d'HSF1 soit sous forme de monomère à l'état inactif dans le cytoplasme, soit sous forme de trimère à l'état actif (lié au motif HSE) dans le noyau.

La forme activée de HSF1 a été corrélée à des modifications post traductionnelles importantes, notamment par phosphorylation [295]. Le groupe de Léa Sistonen [284, 296] a montré que la capacité à se fixer sur l'ADN d'HSF1 et son activité transcriptionnelle était liée à la lysine 298. La sumoylation de ce site est dépendante de la phosphorylation de deux Sérines, Ser303 et 307 qui se trouvent à proximité de la Lys298. La Serine 230 phosphorylée a été identifiée comme un site activateur de HSF1 [296, 297]. Néanmoins, l'introduction d'une mutation ponctuelle remplaçant la serine 230 par la lysine dans des fibroblastes Hsf1 -/- n'abolit pas complètement l'activité de la protéine. Ces données suggèrent que d'autres modifications post- traductionnelles puissent être impliquées dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur HSF1. D'autres modifications post-traductionnelles de HSF1 sont mentionnées dans le tableau 9.

Modification	Enzyme	Effect	References
Ac-K80	p300/SIRT1	Inhibitory	98
Ac-K116	p300/SIRT1	?	98
Ac-K118	p300/SIRT1	?	98
Ph-S121	MAPKAPK2	Inhibitory (promotes Hsp90 binding)	83, 164
Ac-K126	p300/SIRT1	?	98
Ph-T142	CK2	Inhibitory	84
Ac-K148	p300/SIRT1	?	98
Ac-K157	p300/SIRT1	?	98
Ac-K208	p300/SIRT1	?	98
Ph-S216	Plk1	Promotes mitotic progression	86
Ac-K224	p300/SIRT1	?	98
Ph-S230	CamKII	Stimulatory	90
Ph-S292	?	?	83
Su-K298	Ubc9	Inhibitory	94, 95, 165
Ac-K298	p300/SIRT1	?	98
Ph-S303	MAPK GSK3 $\beta$	Inhibitory (promotes K298 sumoylation)	82, 166, 167
Ph-S307	MAPK	?	82, 91, 168
Ph-S314	?	?	83
Ph-S319	?	?	83
Ph-S320	?	?	85
Ph-T323	?	?	85, 87
Ph-S326	?	Stimulatory (promotes Daxx binding)	89
Ph-S344	?	?	83
Ph-S363	PKC, JNK	Inhibitory	167, 169
Ph-T367	?	?	88
Ph-S368	?	?	88
Ph-T369	?	?	88
Ph-S419	PLK1	Stimulatory	170
Ph-S444	?	?	83
O-glycosylation	?	?	171

**Tableau 9.** Les régulations post-traductionnelles de HSF1. D'après [296].

#### **6.2.3.4 HSF1 et les processus biologiques**

La fonction de HSF1 chez la souris dans la réponse au stress, a été démontrée grâce à la génération de souris KO et transgéniques. Ces différents modèles génétiques générés par différents groupes [290, 298, 299] ont, notamment, révélé la fonction de HSF1 dans la croissance cellulaire, le développement embryonnaire et la reproduction.

##### **- HSF1 dans le testicule**

Dans la majorité de types cellulaires, la surexpression d'HSF1 protège ces cellules contre la mort par apoptose. Paradoxalement, HSF1 joue un rôle inverse dans le testicule. En effet, l'activation constitutive de HSF1 dans les cellules germinales mâles induit l'infertilité masculine résultant soit d'une action directe HSF sur la mort des cellules germinales [300-302] ou via une diminution d'expression de HSPA2 [303].

##### **a) Effet direct de HSF1 dans l'apoptose des cellules germinales**

HSF1 induit la mort des cellules germinales en modifiant l'expression de plusieurs protéines comme celles de la famille Bcl2 (BAD, BAX), TP53, caspase-3, caspase-8 ainsi que les protéines qui interagissent avec récepteurs de mort (ex: FADD) [301]. Les cellules germinales méiotiques chez les souris transgéniques HSF1 sont arrêtées au stade pachytène avec une augmentation significative de leur apoptose. Chez les souris de type sauvage, une exposition à la chaleur provoque l'activation de HSF1 et des modifications histologiques similaires à celle des souris mâles transgénique. L'analyse histologique du testicule des souris surexprimant HSF1a montré une dégénérescence massive de l'épithélium séminifère. La lumière des tubules est dépourvue de spermatides et des spermatozoïdes [302].

##### **b) Effet indirect de HSF1 dans l'apoptose des cellules germinales**

Il est possible que la surexpression de HSF1 entraîne l'infertilité indirectement en diminuant l'expression de HSPA2 et Hsc70t ainsi que d'autres protéines importantes pour le bon déroulement de la spermatogénèse: histone H1t (H1t), pyruvate dehydrogenase E1 alpha 2 (Pdha2), lactate dehydrogenase C (Ldhc), proacrosin (Acr), phosphoglycerate kinase 2 (Pgk2), sperm 1 POU-domain transcription factor (Sprm1), cyclin A1 (Ccna1) [303].

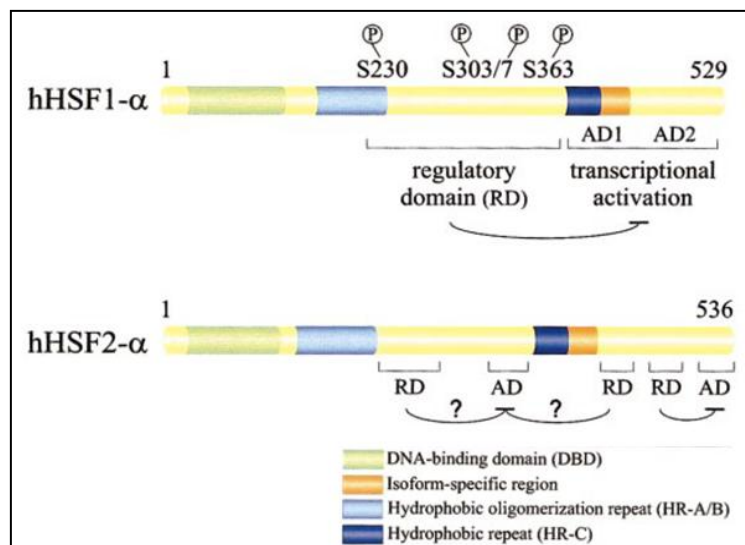
En utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) combinée avec des puces de promoteur (ChIP on chip), l'équipe de Widlak a montré que la mort cellulaire associée à l'induction d'HSF1 est provoquée par la répression simultanée de plusieurs gènes

nécessaires à la spermatogenèse, parmi lesquelles, des gènes codant pour des protéines nécessaires à la division cellulaire, impliquées dans la maturation des ARN et la biogenèse de piARNs [304]. Ce mécanisme permettrait l'élimination des cellules endommagées lors d'un stress. La dérégulation de l'expression des piARNs entraîne la surexpression des rétrotransposons (principalement Line-1) [305, 306] et ainsi une instabilité chromosomique.

## 6.2.4 La protéine HSF2

### 6.2.4.1 Structure

HSF2 possède un domaine d'activation relativement fort à l'extrémité carboxy-terminale, qui est régulé négativement par un domaine adjacent. Des domaines de régulation supplémentaires faibles d'activation ont été trouvés dans la région interne de HSF2 [288] (voir figure 33).



**Figure 33.** Structure de HSF1 et HSF2. D'après [288].

### 6.2.4.2 HSF2 et les processus biologiques

HSF2 joue un rôle important lors du développement embryonnaire, durant la différenciation cellulaire et l'inhibition du protéasome dépendant de l'ubiquitine [291]. HSF2 est actif pendant l'embryogenèse et la spermatogenèse. L'invalidation d'HSF2 chez la souris n'entraîne pas la létalité embryonnaire, mais les souris mâles HSF2 (-/-)



souffrent de défauts de fertilité avec une apoptose des spermatocytes en développement et une diminution de la taille des testicules. Les femelles HSF2 (-/-) montrent des défauts graves de fertilité: une production d'ovocytes anormaux, une réduction du nombre des follicules ovariens, la présence de follicules kystiques hémorragiques et des défauts de réponse aux hormones [307, 308].

Une mutation (R502H) dans la séquence de HSF2, a pour conséquence la perte complète de sa fonction chez les patients atteints d'azoospermie entraînant la diminution d'expression de HSPA2 [309]. Ces résultats confirment l'implication d'HSF2 dans la pathogenèse de l'azoospermie. HSF2 pourrait être une cible thérapeutique potentielle.

Le groupe de Léa Sistonen a montré que la voie de miR18a-HSF2 pourrait jouer un rôle clé au cours de la maturation physiologique des cellules germinales [310]. En effet, l'expression de HSF2 et de miR-18a présentent une corrélation inverse au cours de la spermatogenèse. L'inhibition de l'expression de miR-18a dans les tubes séminifères entraîne une augmentation de l'expression de la protéine HSF2 et une altération de l'expression de ses gènes cibles. MiR-18a et HSF2 sont co-localisés dans les spermatocytes pachytènes au début de la méiose et dans les spermatides rondes post-méiotiques.

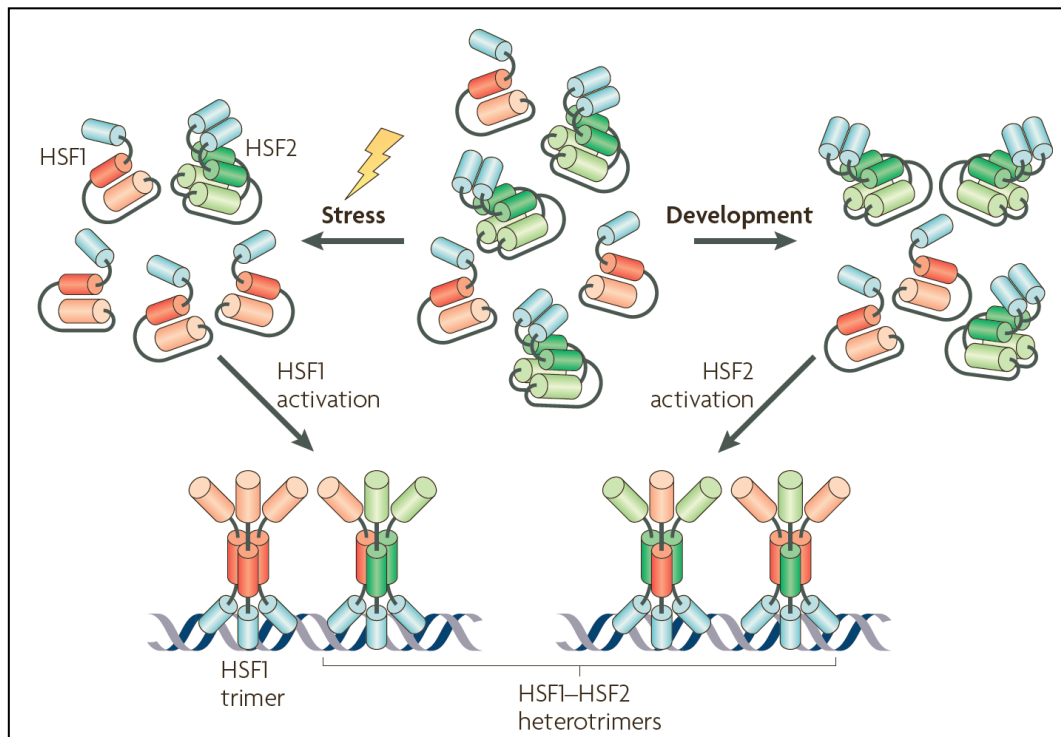
#### - *Régulation du choc thermique par HSF2*

HSF2 participe à la régulation transcriptionnelle de la réponse au choc thermique. En effet, certains gènes des cellules en mitose gardent leurs régions promotrices non compactées, un phénomène appelé: « bookmarking ». Parmi ces gènes HSP70, grâce à la fixation d' HSF2 sur son promoteur, garde sa chromatine dans un état décondensé [311]. Ce processus est nécessaire afin que HSF1 atteigne des niveaux maximaux d'occupation du promoteur de HSP70 [312]. HSF2 est aussi capable de moduler l'expression des gènes HSPs par l'intermédiaire de HSF1.

## **1.6 Interactions fonctionnelles entre les HSFs**

Dans la lignée germinale mâle, il existe une « coopération » entre HSF1 et HSF2 (voir figure 34). Une mutation unique de HSF1 ou de HSF2 n'entraîne pas de trouble majeur de la spermatogenèse et n'affecte pas la fertilité des mâles [307, 308]. En revanche, dans le contexte du double knock-out Hsf1/Hsf2 [313], on observe une dégénérescence sévère des

tubes séminifères. Ces animaux déficients pour les deux facteurs sont stériles et ne produisent plus de spermatozoïdes. La nature de la coopération entre HSF1 et HSF2 reste à définir. Il reste à déterminer si les HSFs interagissent ou s'antagonisent pour réguler la spermatogenèse.



**Figure 34.** Les différentes interactions entre HSFs aboutissent à des régulations transcriptionnelles distinctes. En réponse au stress, HSF1 est activé entraînant la formation d'un hétérotrimère HSF1-HSF2. Lors de stress dû au choc thermique, le niveau de HSF2 est diminué ce qui limite la formation de l'hétérotrimère par faible disponibilité de HSF2. L'activation de HSF2 est réalisée par la conversion d'un dimère en trimère. Dans certains processus de développement, tels que la spermatogenèse, les niveaux d'expression de HSF2 sont élevés dans des cellules spécifiques, conduisant à l'activation de HSF2. La surexpression de HSF2 induit alors la formation d'un hétérotrimère avec HSF1. Il a été suggéré que la hétérotrimérisation HSF1-HSF2 constitue un interrupteur qui intègre l'activation transcriptionnelle en réponse à stimuli spécifique. D'après [277].



# 7. Les effecteurs épigénétiques

## 7.1 Généralités

La première définition du terme épigénétique fut donnée en 1942 par Conrad Waddington, professeur de génétique à l'Université de Aberdeen : « Si l'on compare l'élaboration d'un être vivant à la construction d'une maison, les gènes permettent la synthèse des briques (..) mais l'agencement de ces briques, le nombre de briques à fabriquer à un moment donné ne sont pas le ressort du code génétique, et dépendent de processus cellulaires interactifs. »

### 7.1.1 L'épigénétique

L'épigénétique désigne l'étude : « des modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant pas de changements des séquences nucléotidiques ». Elle ne remet pas en cause l'importance de la génétique mais la complète. L'ADN reste le vecteur essentiel de transmission héréditaire mais les modifications épigénétiques régulent l'expression ou l'inactivation du code génétique et peuvent, elles aussi, se transmettre d'une génération à l'autre (épigénétique trans-générationnelle). La découverte et la compréhension de l'épigénétique est cruciale dans la compréhension du fonctionnement du vivant.

### 7.1.2 Les différentes formes de régulation épigénétique

Il existe trois grands types de régulations épigénétiques (figure 35) :

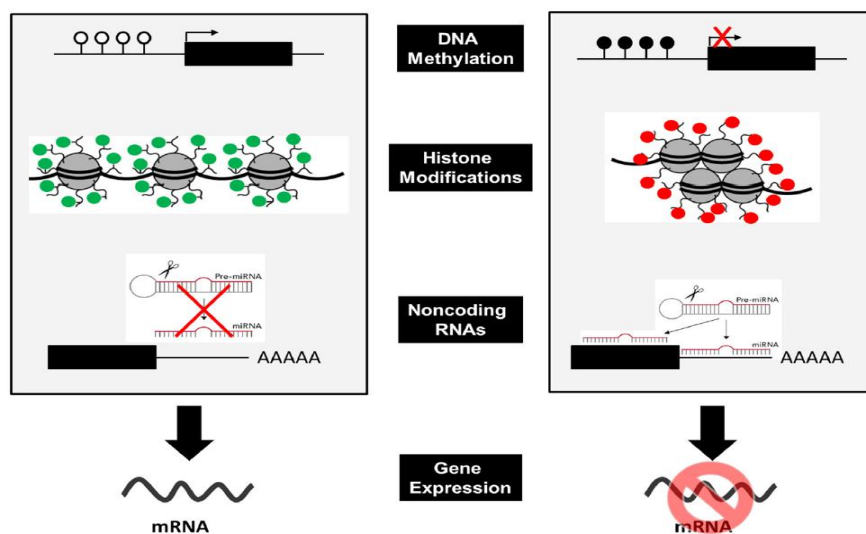


Figure 35. Les différentes formes de régulation épigénétique. D'après [314].

Les deux premiers mécanismes influencent directement sur la structure de la chromatine (la structure nucléoprotéique contenant l'ADN;

- i) Le premier est constitué par les modifications directes de l'ADN : la méthylation de l'ADN
- ii) Le second est constitué par des modifications post-traductionnelles au niveau des queues des protéines histones (ex. acétylation, méthylation, sumoylation, ubiquitination)
- iii) Le troisième mécanisme régule l'expression du gène après sa transcription, il s'agit des microARNs. Ces petits ARNs entraînent la dégradation des transcrits ou la répression de sa traduction.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis focalisé sur l'étude des microARNs dans le testicule. Dans ce chapitre bibliographique, je ne développerai que cet aspect des régulations épigénétiques.

### 7.1.3 Les Petits ARN (non codants) régulateurs

Le transcriptome des mammifères est très complexe incluant un grand nombre de petits (sncRNA) et de grands (lncRNA) RNA non codants [315], c'est-à-dire ne codant apparemment pour aucune protéine. Ces ARNs ont une taille de 20 à 300 nucléotides et sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que:

**sncRNA** : répression génique, protection du génome contre les virus et les transposons.

**lncRNA** : régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes, régulation de l'expression des gènes tissu spécifique, régulation de la distribution subcellulaire des gènes et de la régulation de l'expression lors du développement.

Les petits ARN (sncRNA) ont une taille entre 18 et 32 nucléotides. Ils sont classés en trois groupes selon leur fonction et leur biogenèse (tableau 10).

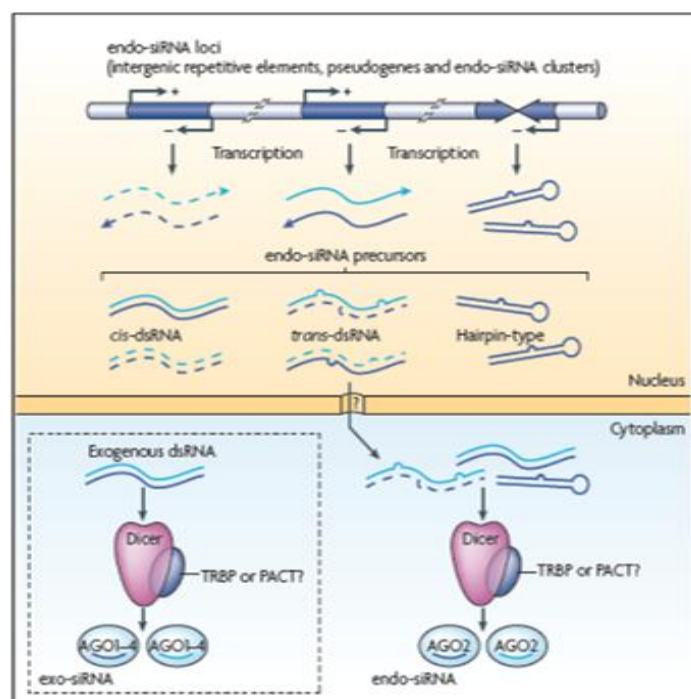
	mi-RNA	Endo-siRNA	Pi-RNA
Fonction	Suppression de la traduction de la cible mRNA	Clivage et déstabilisation des mRNA cibles	Régulation des éléments transposables
Taille (nucléotides)	20-30	20-30	24-31
Précurseur	Précurseur RNA de 70 nucléotides simple	Grand précurseur double brin formé soit	Long ARN sens et anti-sens provenant des

	brin replié en épingle à cheveux (pri-miR)	par hybridation inter moléculaire de deux brins d'ARN complémentaires ou intra moléculaire	régions riches en séquences répétitives
Biogenèse	Dépendante de DROSHA Dépendante de DICER	Indépendante de DROSHA Dépendante de DICER	Indépendante de DROSHA Indépendante de DICER

**Tableau 10.** Classement des petits ARN (sncRNA).

### 7.1.3.1 Les ARNs interférents (siARNs)

Les siARNs (small interfering RNA) sont des petits ARN double-brin d'environ 21 nucléotides dont les deux brins sont parfaitement complémentaires sur environ 19 nucléotides. Ils comportent 2 nucléotides libres à chacune de leur extrémité 3'. Le nucléotide situé à l'extrémité 5' est phosphorylé pour permettre son interaction avec les protéines Ago (protéines appartenant à la famille Argonaute), les seuls facteurs qui interagissent directement avec les siARNs et miARNs [316, 317]. Un siARN mature est illustré par la Figure 36.

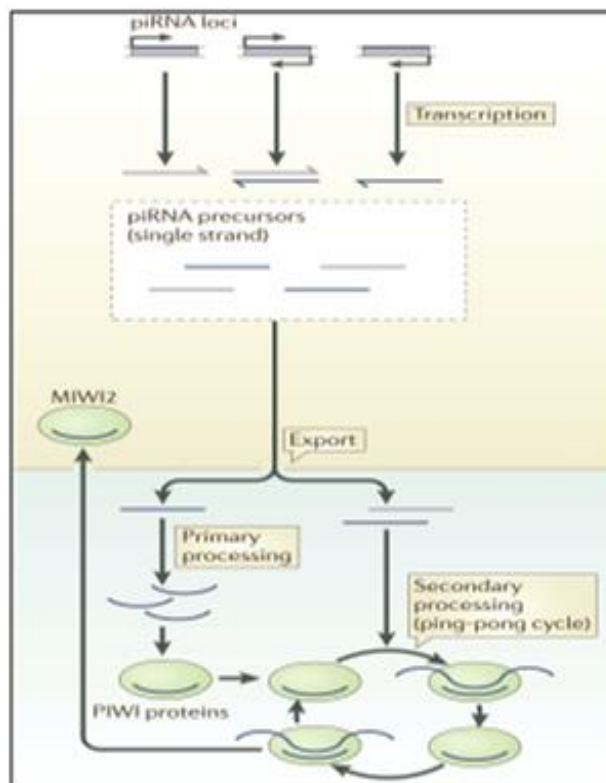


**Figure 36.** La voie de la biogénèse des siARNs. D'après [318]. Les longs ARNdb sont clivés en siRNAs par la Rnase III Dicer au sein d'un complexe protéique contenant également TRBP et/ou PACT. Le recrutement

d'AGO2 ou sa présence préalable au sein du complexe Dicer-TRBP et/ou PACT, permet de former le complexe pre-RISC qui est activé par le clivage du brin « passager » par AGO2, initiant son élimination du complexe. Le complexe RISC activé s'associe à l'ARNm cible grâce à l'appariement du brin guide du siRNA au niveau de la séquence complémentaire de l'ARNm. AGO2 clive l'ARNm cible au centre de la région appariée entre le siRNA et l'ARNm.

### 7.1.3.2 Les piARNs

Une deuxième catégorie majeure de petits ARN régulateurs est celle des piARN (PIWI Interacting RNA, ici PIWI signifie **P**-element **I**nduced **W**impy testis). Plusieurs aspects de leur genèse et de leur mode d'action font que les piARNs constituent un groupe nettement distinct des deux autres groupes (siARN et miARN). Leur taille est plus grande, elle varie de 21 à 31 nucléotides. Leur voie de biogenèse ne dépend pas de la protéine Dicer, mais des protéines PIWI, une sous-famille de la famille Argonaute qui n'existe que dans le règne animal et dont l'expression est restreinte aux lignées germinales chez les mammifères (figure 37). La fonction des piRNAs dépend aussi des protéines PIWI et ils sont impliqués dans l'inhibition des éléments transposables dans les lignées germinales [319].



**Figure 37.** Schéma de la biogenèse des piARNs. D'après [319]. Les précurseurs simple-brin des piARN sont transcrits à partir des clusters de piARN riches en séquences d'éléments transposables, ils sont ensuite exportés dans le cytoplasme où ils interagissent avec les différentes protéines membres de la sous-famille

*PIWI afin de dégrader les transcrits sens et antisens des éléments transposables par le cycle Ping-Pong et de s'amplifier en même temps. Chez la souris, les complexes des piARN et protéines PIWI, ont été décrits comme facilitent la méthylation des rétrotransposons [320, 321].*

La régulation par les piARNs est considérée comme un mécanisme de défense contre les éléments transposables afin de maintenir l'intégrité du génome dans les lignées germinales.

### **7.1.3.3 Les miARNs**

#### **7.1.3.3.1 Découverte des miARNs**

Les miARNs ont été découverts en 1993 [322]. Un criblage génétique chez le vers *C.elegans* avait permis d'identifier le gène Lin-4 comme étant un répresseur de lin-41, un facteur essentiel dans le développement embryonnaire. Malgré sa fonction évidente, Lin-4 ne codait pas pour une protéine, mais plutôt pour deux petits ARN. L'un mesurait 22 nucléotides et l'autre, qui semblait être le précurseur mesurait 61 nucléotides de long. Le mécanisme d'inhibition était de type antisens, puisque la séquence de 22 nucléotides avait une certaine complémentarité pour la région 3' nontraduite (3'NTR) de l'ARNm codant pour Lin-41. Le phénomène d'interférence par de petits ARN semblait être spécifique de *C.elegans*. Sept ans plus tard, l'équipe de Dr. Ruvkun identifia let-7, qui était aussi un petit ARN de 21 nucléotides [323]. Toutefois, ce petit ARN était conservé à travers différentes espèces, incluant les vertébrés et, plus spécifiquement, la Drosophile et le poisson zébré [324]. Puis, l'analyse à grande échelle du génome a permis d'identifier des petits ARN endogènes chez nombreuses espèces et de montrer l'universalité des miARNs. Depuis, la version 19 de logiciel miRBase a recensé des données pour 25141 séquences de miARNs matures pour 193 espèces d'organismes [325].

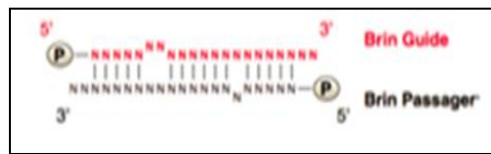
Aujourd'hui, nous avons une idée plus précise de la fonction et du rôle miARNs dans la régulation de l'expression des gènes nécessaires à plusieurs processus physiologiques.

#### **7.1.3.3.2 Définition des miARNs**

Les miARNs (microARNs) sont une autre population de petits ARN régulateurs qui est similaire à celle des siARNs en terme de structure biochimique mais diffère par leur biogenèse et leur mode d'action. Globalement, un duplex miARNs mature présente une région appariée d'une vingtaine de nucléotides, des extrémités 5' phosphorylées



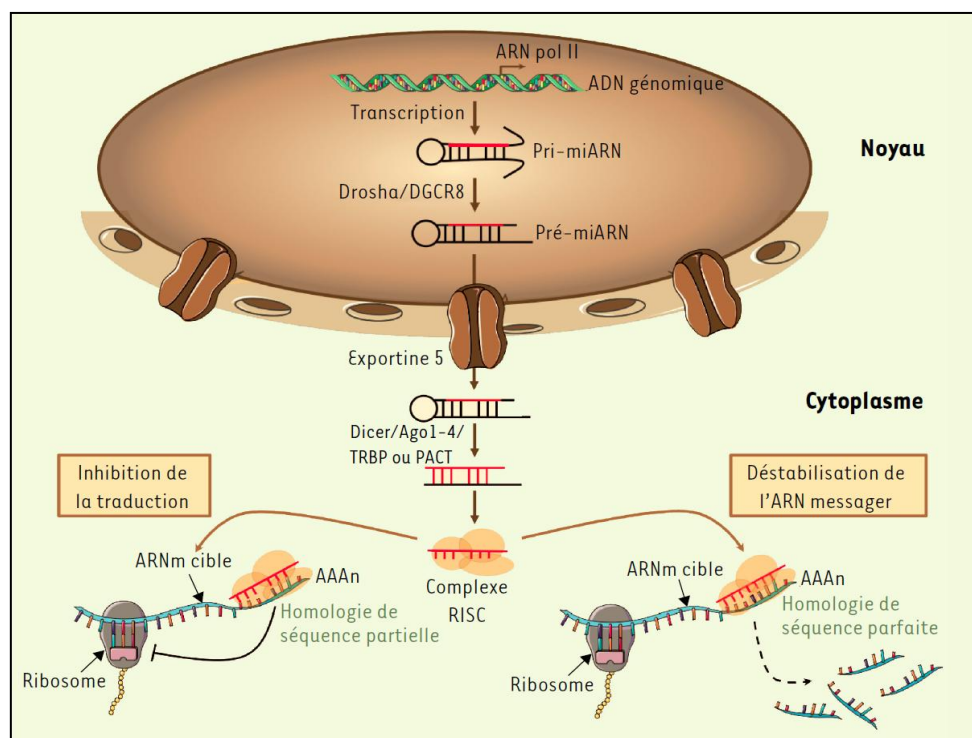
et deux nucléotides libres en 3' de chaque brin. Toutefois des mésappariements sont presque toujours présents au sein de la structure double-brin (Figure 38).



**Figure 38.** Représentation de la structure d'un duplexe miARN. L'hybridation entre les 2 brins d'un miARN n'est pas complète, des mésappariements existent.

### 7.1.3.3 Biogenèse des miARNs

La biogenèse des miARNs englobe une série d'étapes permettant de convertir un précurseur miARN (pri-miARN / miR primaire) en un miARN mature biologiquement actif [318, 326] (Figure 39). La biogénèse nécessite la transcription du précurseur pri-miARN qui est transformé dans le noyau en une structure plus petite le pré-miARN [327]. Le pré-miARN est ensuite exporté dans le cytoplasme [328], où il serait transformé en miR mature qui pourra exercer sa fonction [329, 330]. Nous verrons cela en détail dans les paragraphes suivants.



**Figure 39.** Biogenèse des miARNs. D'après [331]

## 7.2 Synthèse des miARNs

### 7.2.1 Transcription des miARNs

La majorité des pri-miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) [332], cependant, un sous-ensemble de pri-miARN, y compris les pri-miARNs viraux, sont transcrits par la Pol III [333]. Comme les ARNs, les pri-miARN synthétisés par Pol II possèdent une coiffe à leur extrémité 5' et une queue de poly (A) à leur extrémité 3'.

### 7.2.2 Maturation du pri-miARN

#### 7.2.2.1 Voie canonique

Les pri-miARNs ont la caractéristique de se replier en une tige-boucle (épingle à cheveux) par complémentarité de séquence intramoléculaire (figure 40). La structure en tige-boucle des pri-miARN est généralement formée d'une tige d'environ 33 paires de bases, d'une boucle, ainsi que de régions simples brins adjacentes à la tige. Cette structure permet l'entrée des pri-miARNs dans la voie de maturation.

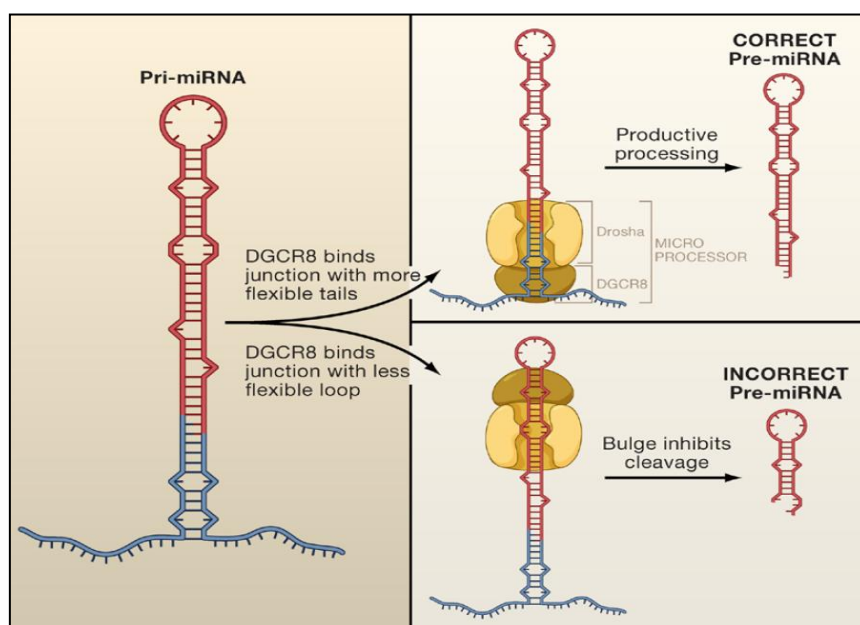


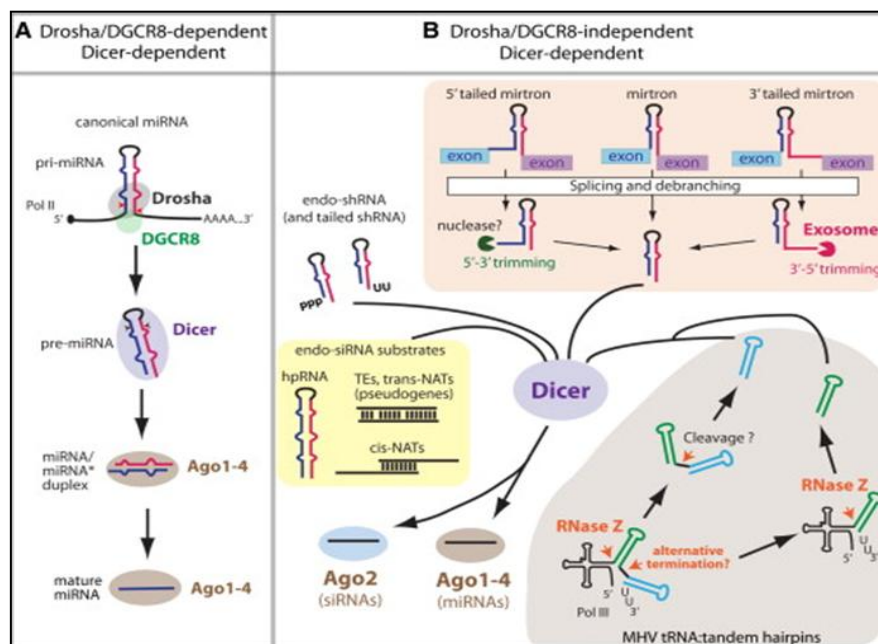
Figure 40. Maturation du pri-miARN (voie canonique). D'après [334].

La première étape est nucléaire et implique un complexe protéique catalytique nommé Microprocesseur. Ce complexe contient deux protéines principales: DROSHA ET DGCR8

((DiGeorge critical region 8, également connu sous le nom Pacha). Le clivage du pri-miARN est induit par la protéine Drosha, une ribonucléase de type III. Bien que Drosha qui possède l'activité catalytique, DGCR8 est aussi essentielle à la maturation [335]. Ensemble, ces deux protéines constituent le minimum de composants du complexe microprocesseur (Figure 37). Ainsi, la jonction appariée/non-appariée à la base de la tige du pri-miARN serait reconnue par DGCR8, ce qui permettrait le positionnement de Drosha à environ 11 nucléotides de cette jonction [336]. Le clivage à cette position libère le précurseur du miARN (pré-miARN), une tige-boucle d'environ 65 à 70 nucléotides possédant la signature de clivage d'une RNase de type III, soit un groupement phosphate en 5' et une extrémité 3'OH sortante de 2 nucléotides [327].

### 7.2.2.2 Voie non canonique

En plus de la voie canonique de biogenèse, certains miARN sont maturés par des voies indépendantes de Drosha [337] (Figure 41 B).



**Figure 41. Les différentes voies de la biogenèse des miARNs.** A) La voie classique de la biogenèse des miARN impliquant Drosha et Dicer. B) La voie de biogenèse indépendante de Drosha. D'après [337].

Il a été montré que certains pri-miARNs présents dans les introns, nommés mirtrons, contournent la voie de maturation par le microprocesseur classique. Ces pri-miARNs utilisent

plutôt la machinerie d'épissage classique et ne nécessitent pas de clivage par Drosha [338-340]. Les extrémités 5' et 3' sont définies par des sites donateurs et accepteurs d'épissage, mais dans certains cas comprennent des queues 3' non structurées supplémentaires [341, 342]. Chez la drosophile, la biogenèse des mirtrons à queue 3' nécessite la présence d'ARN d'exosomes, l'équivalent des 3'-5' exoribonucléases chez les eucaryotes [343]. En effet, il existe une superposition d'action entre les facteurs impliqués dans la biogenèse des miARNs et la voie de maturation des ARNs.

### ***7.2.3 Export cytoplasmique***

Une fois produit, le pré-miARN est transporté vers le cytoplasme à travers un pore nucléaire par l'Exportin-5. C'est un transfert actif qui nécessite le cofacteur RanGTP [344, 345]. Les analyses structurales suggèrent que la longueur du pré-miARN et la présence de l'extrémité 3' sont importantes pour la reconnaissance par l'Exportin-5 [346].

### ***7.2.4 Maturation du pré-miARN***

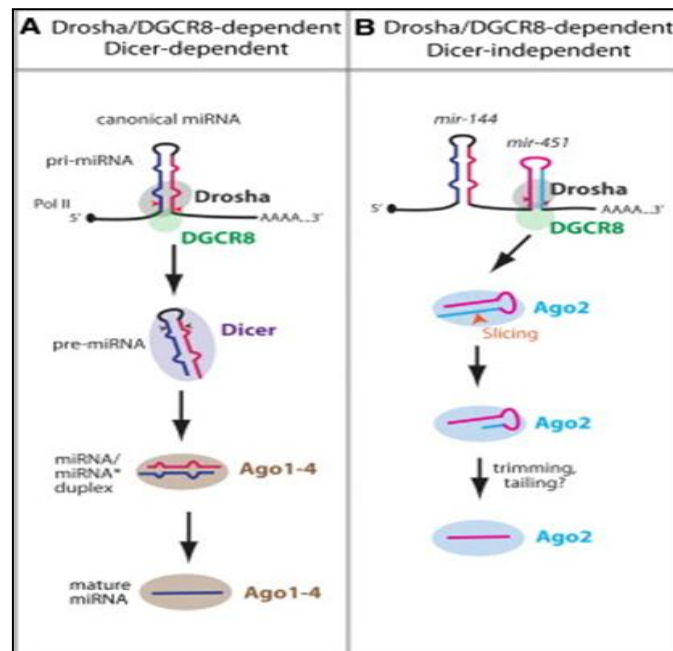
#### ***7.2.4.1 Maturation Dicer dépendant***

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARNs est clivé près de sa boucle terminale par une RNase type III nommée DICER incluse dans un complexe multiprotéique nommé RISC (RNA-induced silencing complex) pour former un miARN mature double brin de 22 nucléotides [347, 348]. Chez les mammifères, Dicer s'associe avec les protéines TRBP (TAR RNA Binding Protein) et PACT (protein activator of PKR) [349, 350], ce qui augmente la stabilité de Dicer et son activité catalytique. Puis, un des brins du miRNA (le brin passager) est ôté, tandis que l'autre brin (le brin guide) reste dans le complexe RISC pour former le complexe RISC mature qui est capable de capturer l'ARNm (ARN messenger) cible. Le brin dont l'extrémité 5' est la moins stable avec des bases appariées est le plus fréquemment retenu, alors que l'autre brin pourrait être détruit [351]. Dans le cas le plus général, le complexe RISC réprime l'expression de gène cible au niveau post transcriptionnel.

#### ***7.2.4.2 Maturation Dicer indépendant***

En plus de la voie canonique de biogenèse, certains miARN sont maturés par des voies indépendantes de Dicer (Figure 42 B) [337]. Dicer est généralement

considérée comme essentielle pour la biogenèse des miARN, mais au moins un miRNA hautement conservée chez l'homme, la souris et le poisson zèbre est produit par un mécanisme indépendant de Dicer: le mir-451 [352, 353]. Par sa structure le pré-miARN 451 se lie directement aux protéines Ago (Figure 37B). Ago1 et Ago3 lient activement le pré-mir-451 mais seule Ago2 peut le cliver grâce à son activité d'endonucléase [354]. Dans des cellules déficientes en Drosha et Dicer, les pré-miARNs pourraient être conçus et clivés par le ``complexe intégrateur`` grâce à l'activité de clivage d'Ago2 [355].



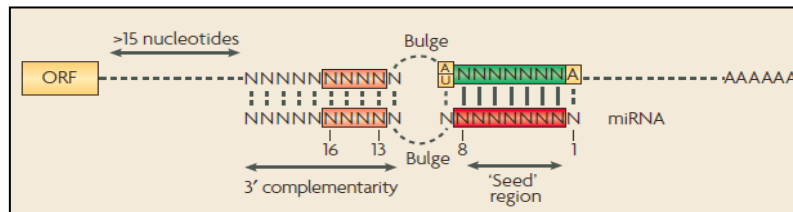
**Figure 42.** Les différentes voies de la biogenèse des miARNs. **A)** La voie classique de la biogenèse des miARN impliquant Drosha et Dicer. **B)** La voie de biogenèse des miARN indépendante de Dicer. D'après [337].

## 7.2.5 Modes d'actions de miARNs

### 7.2.5.1 Appariement à l'ARNm cible

Les miARNs régulent spécifiquement leurs cibles grâce à l'appariement du miRNA mature avec une séquence partiellement complémentaire de l'ARNm cible située généralement dans la région 3'UTR. Chez metazoaires, les miARNs se lient à l'ARNm cible de manière imparfaite suivant un schéma précis de reconnaissance: 1) le respect de la complémentarité stricte au niveau de la séquence de seed (encadrée rouge), 2) la présence d'un boucle ou mésappariement dans la partie centrale du miARN, 3) une complémentarité

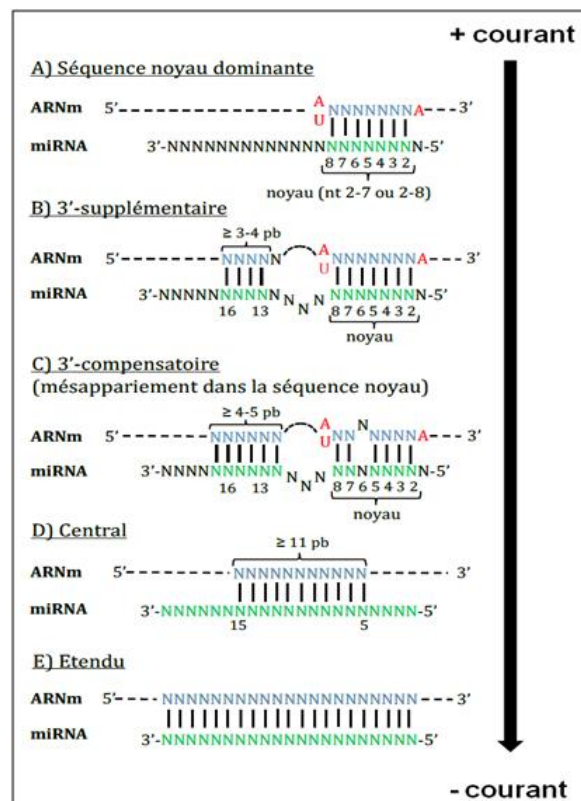
suffisante dans la partie 3' du miARN surtout au niveau des résidus 13-16 (encadrée orange). D'après [356] (figure 43).



**Figure 43.** Principes de l'interaction miARN/ARNm. Les miARNs se lient à l'ARNm cible par appariement de bases. D'après [356]

### 7.2.5.1.1 Les critères d'appariement

Le critère le plus important est un appariement parfait entre l'ARNm cible et les nucléotides qui constituent la séquence noyau (seed) du miARN appelées MREs pour *miRNA Recognition Elements* [356, 357]. Ceci correspond à la région de l'interaction entre le miARNs et l'ARNm cible (figure 44).



**Figure 44.** Appariements entre miARNs et ARNm cibles. Types d'appariements possibles entre un miRNA et un ARNm cible du plus courant (A) au moins courant (E). Schéma réalisé d'après [356, 358, 359].



Cet appariement est généralement imparfait et suit les règles suivantes validés par des analyses informatiques et expérimentales:

A- L'hybridation entre le miARN et l'ARNm doit être parfaite en 5' de la séquence du miARN, entre les nucleotides 2 et 8 du miARN. Tout mésappariement, ou appariement de type G:U à ce niveau, affecte l'efficacité de la régulation par le miARN [360]. De plus, l'efficacité de la répression suite à la liaison du microARN à l'ARNm augmente lorsque c'est un résidu A en position 1 de la séquence « seed » du miARN, et /ou un résidu A/U en position 9 de cette séquence [361].

B- La présence d'un petit mésappariement, dans la région centrale du duplexe miARN-ARNm, préviendrait le clivage endonucléolytique catalysé par AGO2.

C- La complémentarité d'appariement entre le miARN et l'ARNm dans la deuxième moitié du miARN participe à stabiliser le duplexe miARN-ARNm. L'hybridation dans cette région n'est pas aussi exigeante qu'au niveau de la région « seed », puisque des mésappariements sont possibles [362].

En plus de ces règles, l'efficacité de la répression due à la liaison du miARN à l'ARNm peut être influencée par d'autres facteurs, tels que:

- La richesse en dinucléotides AU à proximité du site de liaison du miARN.
- La proximité de site de liaison du miARN avec le codon stop (le site de liaison soit situé au moins 15 bases en aval du codon stop)
- La proximité du site de liaison avec d'autres sites de liaison pour d'autres miARNs, ce qui entraînerait une coopération et/ou une concurrence entre des miARNs pour la répression de la traduction d'un ARNm [362].

Toutefois, il existe des exceptions de ces règles et de plus en plus de données remettent en cause ces principes [363]. Ainsi, les miARNs lin-4 et let-7, présentent un mésappariement dans leur région « seed ». Pour lin-4, une faible complémentarité dans la région 3' est néanmoins efficace. De même, des miARNs comme ciblent des sites dans la séquence codante d'ARNm. C'est le cas des ARNm des facteurs de transcription des cellules souches (Nanog, Oct4 et Sox2) [364].

#### ***7.2.5.1.2 Les logiciels de prédiction des cibles des miRNAs***

Les logiciels de prédiction des cibles des miRNAs (TargetScan, miRanda, PicTar...) permettent l'identification de sites fonctionnels, mais des validations

expérimentales sont nécessaires dans chaque cas pour montrer qu'une cible prédite est bien une cible du miARN in vivo. Ces techniques reposent généralement sur une approche de surexpression et/ou inhibition du miRNA considéré et la mesure de l'effet sur l'expression de la cible endogène d'une part et sur l'utilisation de gènes rapporteurs comme la luciférase, fusionnée au 3'UTR du gène cible étudié d'autre part. Les logiciels de prédiction de cibles utilisent des paramètres et algorithmes quelque peu différents [365], d'où l'intérêt de croiser les prédictions obtenues par plusieurs d'entre eux.

### **7.2.5.2 *Fonctionnement des miARNs***

Les modalités d'action du complexe miRISC dépendent de la qualité du duplex miARN-ARNm mis en jeu. Si la complémentarité est parfaite, le complexe induit alors un clivage au milieu de l'hybride miARN-ARNm entraînant la dégradation rapide de l'ARNm [366, 367]. Les miARN peuvent ainsi entraîner la dégradation de l'ARNm cible par un mécanisme semblable au siARN (figure 45). Dans la situation où la complémentarité est imparfaite (présence de mésappariements dans le duplex miARN-ARNm), il y a inhibition de la traduction sans dégradation de l'ARNm cible.

#### **7.2.5.2.1 *Inhibition de la traduction par les miARNs***

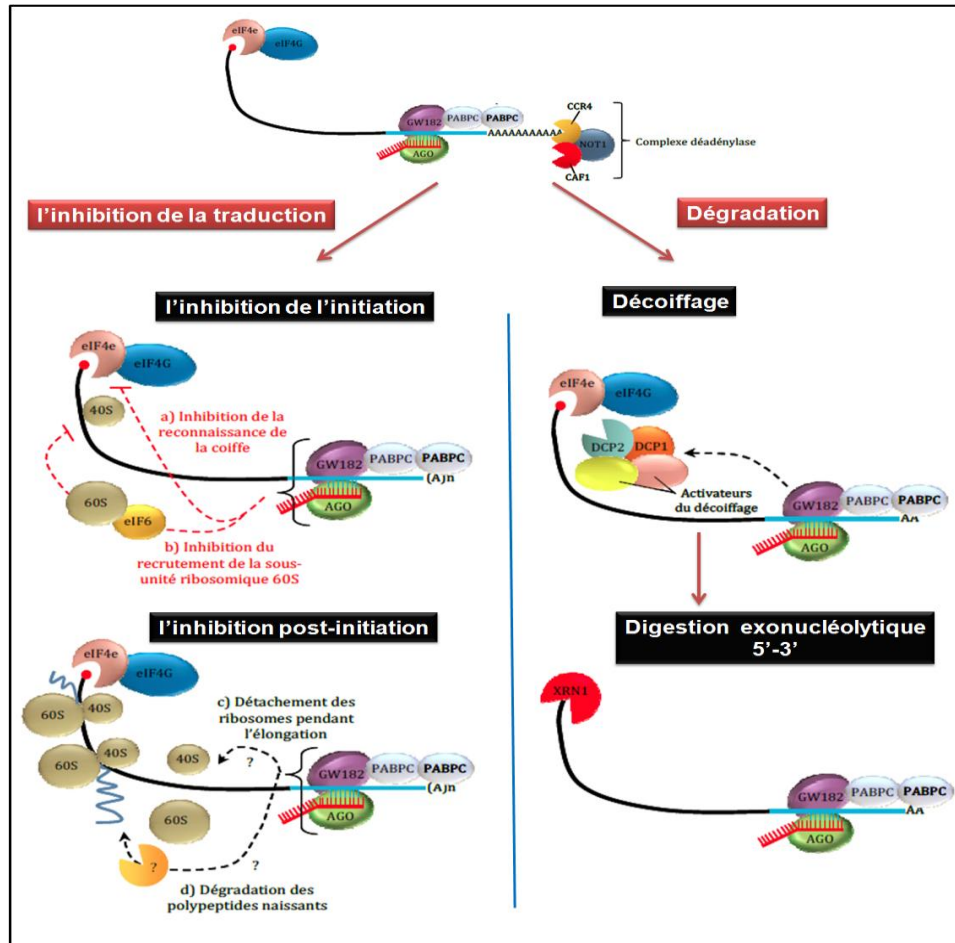
##### **- *Régulation de l'initiation de la traduction***

Les ARNm eucaryotes possèdent une structure coiffe (cap) à leur extrémité 5' qui joue un rôle important dans l'initiation de la traduction et les protège contre la dégradation. Cette coiffe est formée d'une guanosine modifiée par ajout d'un méthyle en position 7 (m7G). L'inhibition de la traduction par les miARNs nécessite la présence de la coiffe et de la queue poly A des ARNm cibles [368-370] (Figure 45). Par une approche de gène rapporteur, en utilisant une construction d'un ARNm cible de let-7, il a été montré que la fixation de let-7 au niveau la région 3'UTR empêche le recrutement des ribosomes au niveau de cet ARNm [371]. En revanche, l'addition du complexe d'initiation de la traduction eIF4F, qui se fixe sur la coiffe [372, 373], lève l'inhibition. Ces études suggèrent que la coiffe est le siège de l'inhibition. Cette inhibition passe par la compétition entre le complexe RISC mature (miRISC) et les facteurs d'initiation de la traduction pour se fixer sur l'extrémité 3'UTR de l'ARNm.



## - Répression post-initiation

Différents rapports suggèrent que les miARNs régulent la traduction au stade de l'élongation [374, 375]. Toutefois, certains miARNs sont capables d'inhiber la liaison des ribosomes sur l'ARNm cible [376] (voir figure 45).



**Figure 45.** Mécanismes de la répression des ARNm cibles induite par les miARNs. L'interaction de GW182 du complexe miRISC avec PABPC entraîne soit l'inhibition de la traduction, tout en exposant la queue poly(A) au complexe déadénylase. GW182 et/ou PABPC interviennent dans le recrutement du complexe déadénylase CCR4, NOT et CAF1. Cette déadénylation peut contribuer à l'inhibition de la traduction induite les miRNAs par plusieurs mécanismes: (a) une inhibition de la reconnaissance de la coiffe, un mécanisme d'interaction de AGO avec la coiffe ayant été proposé, entrant ainsi en compétition avec eIF4E ; ou par (b) l'inhibition de recrutement de la sous-unité ribosomique 60S via le recrutement du facteur eIF6. L'inhibition des étapes post-initiation peut se faire par deux mécanismes possibles (c) le détachement prématuré des ribosomes en cours d'élongation, ou (d) la dégradation co-traductionnelle des polypeptides naissants par une protéase inconnue. La déadénylation est supposée précéder la dégradation de l'ARNm grâce au décoiffage par le complexe DCP1 :DCP2 (accompagné d'activateurs du décoiffage), et enfin grâce à la digestion 5'-3' de l'ARNm cible par XRN1. (Figure adapté d'après [356, 377].

### 7.2.5.2.2 *Dégradation d'ARNm cible*

Chez les mammifères, la dégradation des ARNm cibles est moins fréquente que l'inhibition de la traduction induite par le miARN. En effet, la majorité des miARN affecte le niveau de protéines sans diminuer le niveau d'ARNm [378]. Toutefois, dans le cas où la complémentarité avec l'ARNm cible est parfaite, le miARN peut induire sa dégradation [360, 366, 379], par le clivage entre les nucléotides 10 et 11 du miARN [366, 380, 381] (figure 45).

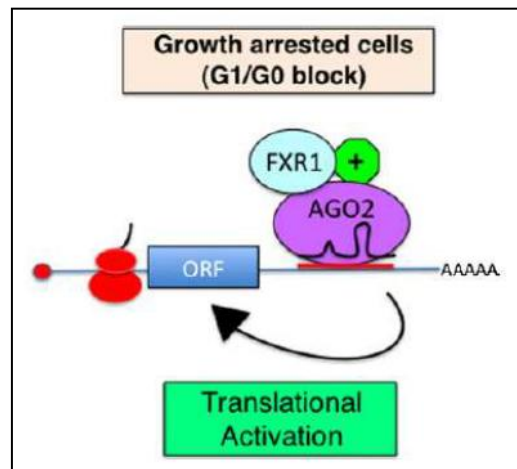
Il existe une cinétique des différents événements. En effet, l'inhibition de la traduction est un événement précoce alors que la dégradation de l'ARNm peut être une étape secondaire [371]. L'utilisation de plasmide permettant la transcription d'un ARNm rapporteur possédant dans sa séquence 3' UTR des séquences spécifiques du miARN let-7, a montré que la traduction est arrêtée et le niveau d'ARNm rapporteur ne variait pas dans un premier temps, mais diminuait ultérieurement et ce de façon dépendante de let-7. Il semble que la structure du duplex miARN-ARNm conditionne l'avenir de l'ARNm. En effet, le duplex contenant une boucle sortante conduit à une inhibition de la traduction mais ne déstabilise pas l'ARNm cible, alors lorsque le duplex contenant deux boucles opposées, conduit à une dégradation de l'ARNm cible [382, 383].

### 7.2.5.2.3 *Activation de la traduction par les miARNs*

La fonction principale du miARN est d'inhiber la traduction des ARNm cibles, mais dans certains cas, un rôle d'activateur traductionnel des miARNs a été rapporté. En effet, les miARNs pourraient être des activateurs de traduction selon les phases du cycle cellulaire [384, 385]. Ainsi, le miR-369-3 active la traduction de l'ARNm de TNF $\alpha$ , via sa liaison aux séquences AREs (AU-rich elements) dans la région 3' UTR, dans des conditions de privation de sérum. La privation de sérum entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1, et le recrutement du complexe AGO2-FXR1 (*fragile X mental retardation-related protein 1*) au niveau des séquences AREs de l'ARNm du TNF $\alpha$ , ceci entraîne l'activation de sa traduction (voir figure 46).

De même, Let-7 peut stimuler la traduction de sa cible HMGA2 (*High Mobility Group Gene A2*) qui contient 4 sites de liaison à ce miARN. Lors d'une privation de sérum, le complexe AGO2-FXR1 est recruté et active la traduction de HMGA2 de façon dépendante de Let-7 [384].

D'autres miARNs comme miR-10a ou encore miR-122 pourrait être impliqués dans l'activation de la traduction [386].



**Figure 46.** Modèle d'activation de traduction de certains miARNs spécifique du cycle cellulaire. D'après [387]. Dans une situation d'arrêt du cycle cellulaire en G1/G0 (ex. cellules sans sérum), le complexe miARN-AGO2 recrute FXR1 et d'autres facteurs activateurs (en vert) afin de stimuler la traduction à partir de l'ARNm

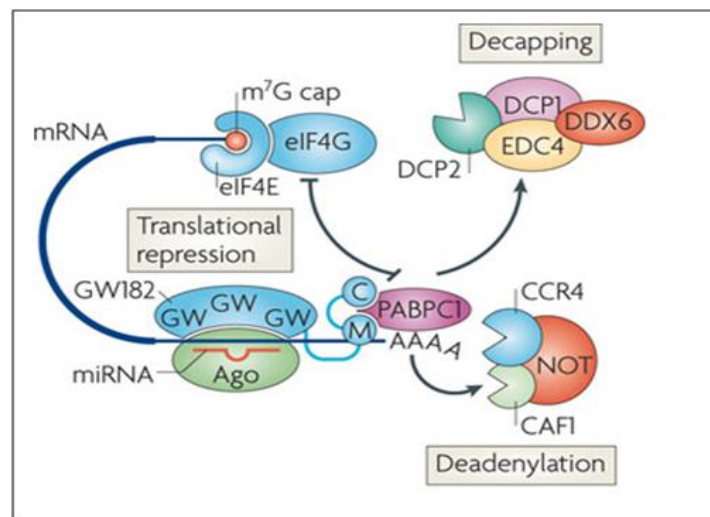
Ces études *in vitro* basées sur les constructions contenant des gènes rapporteurs avec des AREs artificiels ou isolés sont très utiles pour comprendre les mécanismes de régulation par les miARNs, mais pourraient ne pas refléter *in vivo* la fonction de miARNs. En effet, la séquence 3' UTR native d'un ARNm donné pourrait contenir, en plus des AREs, des sites de liaison à des co-facteurs importants dans la régulation de la traduction par les miARNs.

### 7.2.5.3 Protéines impliquées dans le fonctionnement des miARNs

#### 7.2.5.3.1 Rôle des protéines Argonautes

Les protéines AGO contiennent deux motifs caractéristiques PAZ et PIWI retrouvés chez de nombreuses espèces. Leur taille moléculaire est 95kDa [388]. Les AGOs sont les protéines principales du complexe miRISC. La cristallographie a montré que le domaine PIWI a une activité ribonucléase H [389-391] et qu'AGO2 possède une activité endonucléase qui catalyse le clivage du duplex miARN-ARNm [367, 392]. Cependant

d'autres études proposent que les protéines AGO induisent un blocage de la traduction mais pas une dégradation de l'ARNm cibles [382, 393, 394]. En effet, la protéine AGO2 contient également un domaine de liaison à la coiffe m7G, permettant au complexe miRISC d'entrer en compétition avec le facteur d'initiation eIF4E afin de bloquer l'initiation de la traduction (Figure 47).



**Figure 47.** Coordination de déadénylation par GW182 et Ago. D'après [395].

### 7.2.5.3.2 Rôle des protéines GW182

Les protéines GW182 constitue une famille de protéines de 182 kDa contenant des répétitions glycine-tryptophane et un motif RRM (*RNA Recognition Motif*) permettant de reconnaître les ARN. Chez *D. melanogaster*, il n'existe qu'une seule protéine GW182, en revanche chez les mammifères, il existe trois paralogues de GW182 (TNRC6A, TNRC6B et TNRC6C). Les protéines GW182s sont capables de s'associer aux protéines AGO et font ainsi partie du complexe miRISC.

GW182 est capable de recruter des enzymes de déadénylation, qui hydrolysent la queue polyA des ARNm. La lignée HEK293 surexprime AGO2 et GW182. Dans cette lignée, l'utilisation d'ARNm biotinylés, cappés, polyadénylés et contenant des sites spécifiques pour let-7, permet de montrer que les protéines AGO2 et GW182 agissent en synergie pour réaliser la répression de la traduction par la deadénylation de l'ARNm [396]. L'inhibition de l'expression de la protéine GW182 par des siARNs entraîne une diminution de la répression de la traduction dépendante des miARNs [397, 398]. Les protéines GW182s en association

avec les protéines AGO participent à la formation de *processing bodies* (P-Bodies) [397] (figure 47).

### **7.2.5.3.3 Rôle des Processing Bodies (P-Bodies)**

Les P-Bodies sont des structures de stockage cytoplasmiques des ARNm [399]. Leur nombre et leur taille dépendent de l'activité traductionnelle de la cellule. Ces structures contiennent des enzymes inhibitrices de la traduction, de déadénylation, du decapping et de la dégradation des ARNm (voir figure 47). Elles permettent aux protéines et aux ARNm d'entrer et de sortir continuellement. Dans les P-Bodies, l'ARNm peut y être décappé et dégradé. Ces structures interviennent aussi dans le métabolisme des miARNs. En effet, l'inhibition de la traduction de l'ARNm ciblée par les miARNs passe par sa séquestration dans les P-Bodies [394, 400, 401].

## **7.2.6 Régulation de la biogenèse des miARNs**

### **7.2.6.1 Régulation au niveau transcriptionnel**

#### **7.2.6.1.1 Facteurs de transcription et mécanismes épigénétiques**

Le premier niveau de régulation de l'abondance des miARNs a lieu au stade de la transcription des pri-miARNs. Les gènes de miRNA sont dispersés dans tout le génome, soit dans les introns de gènes codant pour des protéines, soit dans les introns ou les exons d'ARN non codants, soit dans des unités de transcription indépendantes (intergénique). La majorité des miARNs introniques sont transcrits à partir du même promoteur que le gène hôte. Toutefois, environ un tiers des miARNs introniques sont transcrits à partir de promoteurs indépendants, ce qui permet un contrôle séparé de leur transcription [402, 403].

La plupart des propriétés qui dictent la régulation transcriptionnelle des miARNs sont les mêmes que les gènes codants. En effet, l'organisation de la région promotrice de miARNs autonomes est similaire à celle des gènes codant pour des protéines. La présence d'ilôts CpG, de séquences consensus telles que la boîte TATA ainsi que la modification d'histones indiquent que les promoteurs des gènes des miARNs sont contrôlés, en trans, par des facteurs activateurs ou répresseurs de transcription et en *cis*, par des modifications de la structure de la chromatine. Plusieurs facteurs de transcription régulent l'expression de miARNs de manière positive ou négative [404, 405].

### 7.2.6.1.2 Régulation par le polymorphisme

Les variations de séquence naturelle de pri-miARN, pré-miARN ou miARN matures peuvent influencer la maturation, la stabilité et la sélection des cibles. Ces variations de séquences proviennent de changements dans la séquence codante d'ADN ou de modifications post-transcriptionnelles de l'ARN [406, 407]. Chez les humains, des différences de maturation par Drosha ont été observées pour différents allèles de miR-125a, miR-126, miR-146a, miR-502, miR-510, miR-890 et miR-892b [407, 408], tandis qu'une variation de l'efficacité de la maturation par Dicer a été décrite pour les SNPs (single nucleotide polymorphisms) de la séquence de miR-196a [409]. Une variante de miR-934 s'est révélé contenir une mutation dans le premier nucléotide de son pré-miARN, ce qui affecte la sélection du brin pour l'incorporation dans le complexe RISC [409].

### 7.2.6.2 Régulation au niveau post-transcriptionnel

Le clivage d'un pri-miARN en pré-miARN est régulé par une variété de protéines appelées des cofacteurs qui sont soit recrutées dans le microprocesseur soit par des interactions protéine-protéine soit par des interactions directes avec les pri-miARNs (voir figure 48).

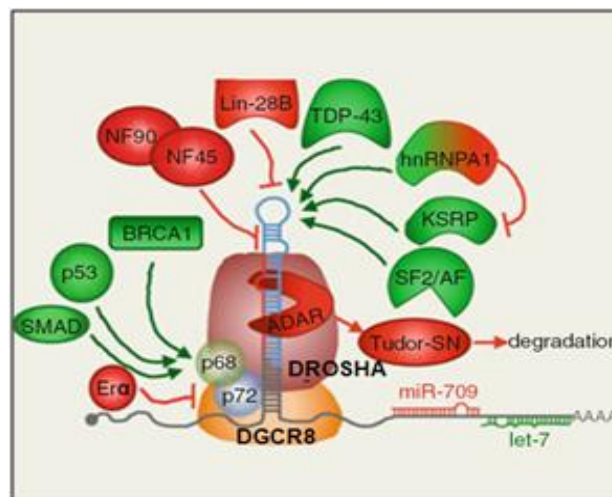


Figure 48. Les protéines qui interagissent avec le microprocesseur. D'après [410].

#### 7.2.6.2.1 Reconnaissance d'une séquence spécifique du pri-miARN

L'analyse comparative des séquences des pri-miARN montre que 14% des pri-miARN humains ont une séquence conservée au niveau de leurs boucles terminales,



ce qui permet les interactions avec certaines protéines régulatrices (Figure 49, 50, 51). Les protéines régulatrices modifient positivement ou négativement la maturation des pri-miARNs.

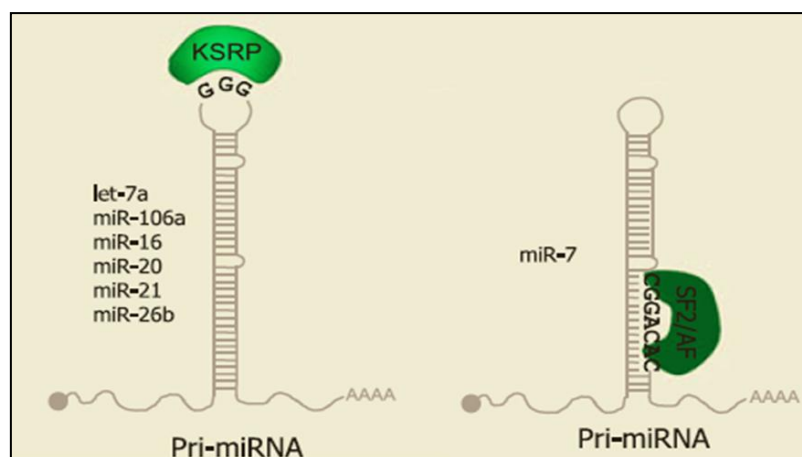
A) **Protéines régulant positivement la maturation des pri-miARNs**

- **La protéine KSRP (KH-type splicing regulatory protein)**

Le KSRP régule positivement la maturation de pri-miRNA auxquels elle est directement liée. Il a été proposé que deux ou trois guanidines séquentielles de boucle de pri-miARNs soient nécessaires pour la reconnaissance par la protéine KSRP [411] (figure 49). De plus, l'activité de KSRP est modulée par son état de phosphorylation, d'une part par ATM en réponse au dommage de l'ADN [412], d'autre part par la voie de signalisation PI3K/Akt [413].

- **Les protéines TDP-43 et SF2/ASF**

D'autres protéines peuvent se lier aux pri-miARNs pour promouvoir leur biogenèse (figure 49). C'est le cas de TDP-43 (TAR DNA-binding protein-43) [414] et SF2/ASF (serine/arginine-rich SR). Il a été proposé que SF2/ASF se lie à un motif dans la tige de pri-miR-7 et modifie sa structure, dans un mécanisme semblable à celui de hnRNP-A1 [415]. SF2/ASF et miR-7 participent à une boucle simple de rétrocontrôle négative qui permet de réguler le niveau d'expression de ce miARN. Dans ce schéma de régulation SF2/ASF stimule la transcription de miR-7 qui a son tour, va inhiber la traduction de l'ARNm de SF2/ASF.



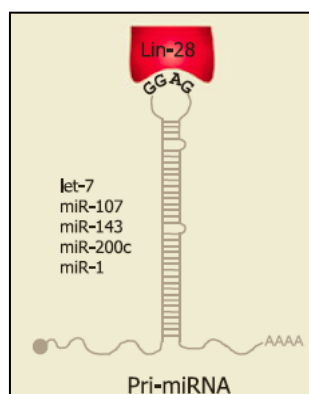
**Figure 49.** Exemples de protéine régulant positivement la maturation des pri-miARN. D'après [410].

## B) Protéines régulant négativement la maturation des pri-miARNs

### - La protéine LIN-28

L'une des protéines clés impliquées dans la régulation négative de la biogénèse des miARN est LIN-28 (abnormal cell lineage factor 28) (voir figure 50), qui agit non seulement sur la maturation du pri-miARN [416, 417] mais également sur celle du pré-miARN [418, 419]. En effet, le miARN let-7 mature n'est pas synthétisé dans les cellules souches embryonnaires malgré une forte transcription du pri-let-7. LIN-28 se fixe sur la boucle terminale du pri-let-7, ce qui interfère avec le clivage dépendant de Drosha [420]. La répression exercée par LIN-28 est spécifique de la famille des miARN let-7.

Le système de régulation LIN-28 / let-7 est hautement conservé et joue un rôle important dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires. Il a été proposé que Lin28B bloque la maturation de let-7 en séquestrant le pri-let-7 dans les nucléoles loin du microprocesseur [419], suggérant un nouveau mécanisme par lequel des protéines liant l'ARN peuvent inhiber la maturation des pri-miARNs.



**Figure 50.** Exemple de protéine régulant négativement la maturation des pri-miARNs.

D'après [410].

### - La famille des protéines ADAR

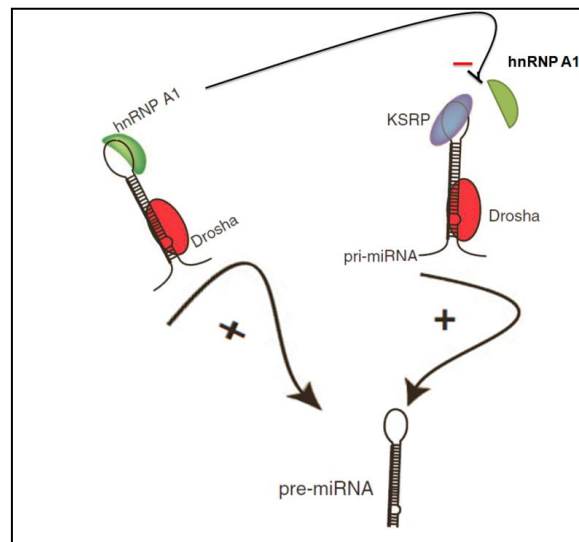
L'équipe de Blow et al [421] a séquencé 99 miARNs de 10 tissus humains et a pu identifier 6% des transcrits pri-miARN présentant une conversion d'adénosine (A) en Inosine (I) dans au moins de l'un des tissus analysés. Cette conversion d'adénosine en Inosine dans la séquence de pri-miR-142 réduit considérablement le clivage par Drosha et conduit à un clivage par d'autre ribonucléase spécifique des ARN double brin contenant l'inosine: Tudor-SN (Tudor staphylococcal nuclease), une composante de RISC



[422, 423]. Ce mécanisme semble particulièrement important pour les pré-miARNs (voir plus loin)

### C) *HnRNP-A1 régule positivement et négativement la maturation*

L'une des premières protéines identifiées pour fonctionner de cette manière était hnRNP-A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) (voir figure 51). HnRNP-A1 se fixe sur la boucle terminale du pri-miR-18a et facilite sa maturation par l'altération de la structure de sa tige [424, 425]. Cette protéine peut également interagir avec le pri-let-7a, mais dans ce cas, il régule négativement son maturation [426]. Cet effet inhibiteur semble dû à la compétition entre hnRNP-A1 et la protéine KSRP (KH-type splicing regulatory protein) pour se lier à la tige-boucle de pri-let-7a.



**Figure 51.** *hnRNP A1 régulent positivement et négativement la maturation des pri-miARNs.*

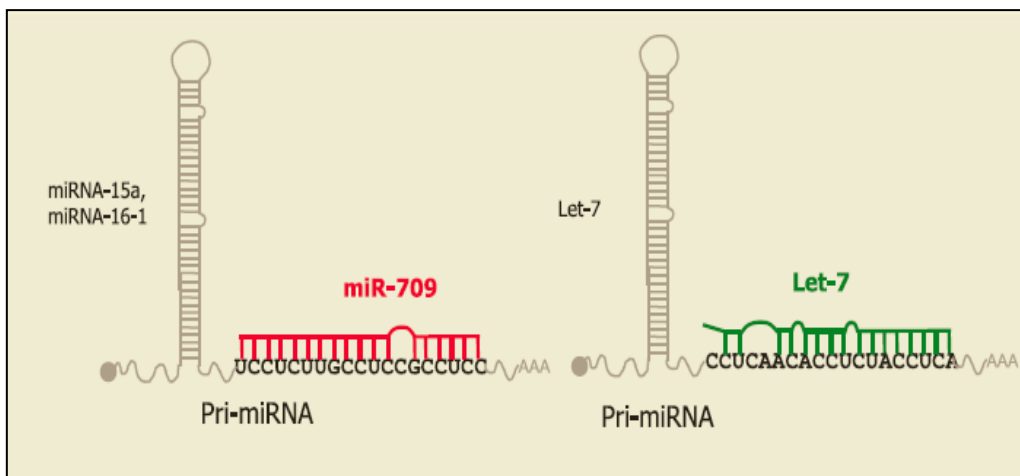
*Figure adapté d'après [410, 427].*

#### 7.2.6.2.2 *Régulation de la maturation du pri-miARN par miARN*

Une étude récente de Zisoulis et ses collègues [428] a montré que la maturation de pri-let-7 est contrôlée par son let-7 mature, c'est le premier exemple d'une boucle d'autorégulation directe dans la biogénèse de miARNs (Figure 52). En effet, chez *C. elegans*, après la transcription de pri-let-7, le Let-7 mature se fixe sur un site spécifique de pri-let-7 favorisant la liaison de la protéine ALG-1 (Argonaute-like protéine-1) à l'extrémité 3' de pri-let-7 ce qui permet le promouvoir de sa maturation.

Une deuxième étude a montré que l'interaction d'un miARN mature avec un pri-miARN peuvent avoir un effet inhibiteur sur la maturation (figure 52). Par exemple, le miR-709 empêche la maturation de pri-miR-15a et de pri-miR-16-1 par la liaison à une séquence spécifique de 19 nucléotides de ces pri-miR, conduisant à une diminution de niveau de miR-15a/miR-16-1 mature [429]. Les facteurs qui conditionnent la localisation nucléaire de miR-709 reste inconnues mais cela semble être associée à un stimulus apoptotique, et peut être un mécanisme dynamique pour modifier le niveau de miR-15a/16 en réponse à des signaux externes. Dans les cellules transfectées par du miR-709 synthétique, ce dernier prend une localisation nucléaire, ce qui indique que le signal de localisation est contenu dans sa séquence mature. Il semble que miR-709 et son site de liaison à pri-miR-15a/16 sont spécifiques à la souris.

La localisation nucléaire des miARNs a été rapportée aussi pour le miR-29b mature, une hexa nucléotide spécifique dans sa séquence dirige son transport nucléaire [430]. Toutefois, cette séquence n'est pas présente dans le miR-709 mature, donc le mécanisme de son transport nucléaire reste inconnu.



**Figure 52.** Exemples de régulation de maturation des pri-miARNs par miARNs mature.  
D'après [410].

### 7.2.6.2.3 Régulation au niveau du microprocesseur

Le niveau de Drosha et DGCR8 dans la cellule au sein du microprocesseur est contrôlé précisément, ceci joue un rôle majeur dans la régulation de la

maturation des pri-miRNA. Différentes expériences ont montré l'importance d'une régulation fine des niveaux respectifs de Drosha et DGCR8 dans le microprocesseur [431].

- Ainsi, une augmentation de 2 à 7 fois de l'expression de Drosha provoque une augmentation uniquement de miR-31 et une diminution des autres miRNA.
- Une délétion dans le gène de DGCR8 chez l'homme provoque une maladie cardiaque connue sous le nom de syndrome de DiGeorges.
- L'inactivation du gène chez la souris à l'état hétérozygote provoque une diminution modeste du taux de protéines cellulaires alors que le taux de DGCR8 est diminué de 50%.
- Enfin, in vitro, un excès de 3 fois en DGCR8 par rapport à Drosha provoque une inhibition drastique de l'activité de Drosha [427].

Ces résultats pourraient être expliqués par une boucle de rétrocontrôle de l'expression des protéines Drosha et DGCR8 par le microprocesseur. En effet, Drosha est capable de cliver, outre les pri-miRNA, des mRNA comme celui de DGCR8 pour en contrôler le niveau d'expression. Ainsi, Drosha maintient des taux élevés de DGCR8 dans le microprocesseur à travers la régulation du clivage de son mRNA. En retour, DGCR8 stabilise Drosha et assure le couplage étroit des protéines au cœur du complexe microprocesseur.

- **Les protéines qui interagissent avec le microprocesseur**

De nombreuses protéines interagissent avec Drosha. Ces protéines favorisent ou inhibent la maturation des pri-miARNs (voir figure 53).

- ***La protéine p68 et p72***

Les protéines hélicases, p68 (également connu sous le nom DDX5) et p72 (DDX17) sont responsables de la maturation d'un tiers des pri-miARNs chez la souris. Dans des cellules déficientes en p68 ou p72, les niveaux de pré-miARNs, mais pas ceux des pri-miARN, sont significativement réduits, ceci est dû à une diminution de la fixation de Drosha sur les pri-miARNs [335, 432]. Ces deux protéines (p68 et p72) interagissent avec un large spectre de protéines afin de promouvoir la maturation des pri-miARN.

- ***La protéine Smad***

Par exemple, pour la maturation du pri-miR-21, les protéines SMAD (appartenant à la voie de signalisation TGF $\beta$  et BMP4) s'associent avec p68 et Drosha. Ce complexe permet une augmentation du niveau de miR-21. En effet, Smad 1 et 5 peuvent

s'associer à une séquence consensus au niveau de pri-miR-21, ceci a pour effet d'activer rapidement la maturation du pri-miR-21 en pré-miR-21 [433-435].

- **La protéine p53**

De façon similaire, une interaction entre p68 et le gène suppresseur de tumeur p53 est observée lors de la maturation des pri-miR-16-1, pri-miR-143 et pri-miR-145, en réponse à un dommage à l'ADN dans des cellules cancéreuses [436].

- **La protéine BRCA1**

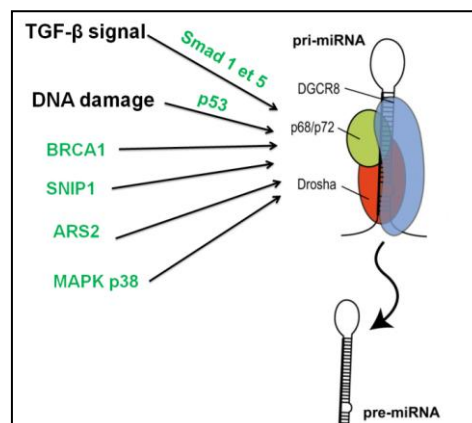
Un autre suppresseur de tumeur, BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1), peut interagir également avec Drosha, p68, p53 et SMAD3 pour accélérer la maturation de certaines pri-miARN associés au cancer [437].

- **Les protéines SNIP1 et ARS2**

Ces protéines peuvent aussi s'associer avec Drosha et réguler positivement la maturation des pri-miARNs, ce sont SNIP1 (SMAD nuclear interacting protein) [438] et ARS2 (arsénite de résistance à la protéine-2) [439].

- **La protéine p38**

Enfin, une étude récente a montré que la voie de signalisation MAPK p38-MK2 (MAPK-activated protein kinase 2) facilite la localisation nucléaire de p68, ce qui favorise la biogenèse de miR-145 [440]. En effet, dans une lignée de cellules de cancer du sein (MCF7), l'inhibition de MAPK p38 entraîne la suppression de la biogenèse du miR-145 et la surexpression de sa cible c-Myc.



**Figure 53.** Protéines régulant positivement la maturation des pri-miARNs. Figure adaptée d'après [410, 427].

D'autres protéines sont des régulateurs négatifs de la biogénèse des miARNs (voir figure 54).

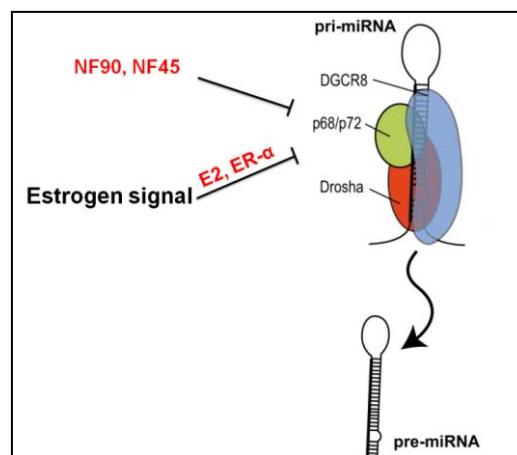
- **La protéine ESR1**

Le récepteur des estrogènes ESR1, inhibe la maturation des pri-miARNs via des interactions avec p68/p72 [441]. Cette interaction induit la dissociation du complexe microprocesseur des pri-miARNs.

- **La protéine NF90 et NF45**

NF90 et NF45 (nuclear factor 90 and 45) peuvent également interagir avec le microprocesseur et inhiber la maturation de plusieurs membres de la famille let-7 [442]. A la différence des SMAD1 et 5 citées plus haut, aucune séquence consensus n'a été identifiée dans les pri-miARNs régulés par ces molécules.

Les mécanismes régulateurs négatifs sont encore mal compris.



**Figure 54.** Exemples des protéines régulant négativement la maturation des pri-miARN.

Figure adapté d'après [410, 427].

### 7.2.6.3 Régulation de l'export des pré-miARNs

- L'Exportin-5 peut interagir avec NF90, également connu sous le nom ILF-3 (interleukin enhancer-binding factor3) [443], une protéine du complexe microprocesseur. Il est possible qu'il y ait une coordination entre le clivage du pri-miARN et son exportation, mais cela n'a pas été encore démontré. La surexpression d'ARN courts en

tige-boucle (shRNA) chez les animaux peut être toxique en raison de la saturation de l'Exportin-5, entraînant l'inhibition de l'exportation des pré-miARN [444].

- Une autre boucle de rétrocontrôle de miARNs existe au niveau de leur exportation. En effet, l'Exportin-5 peut interagir avec l'ARNm de DICER (enzyme responsable de la maturation de miARNs). Ceci entraîne une rétention de l'ARN de DICER dans le noyau lorsque le niveau de pré-miRNA ou de substrat de DICER sont trop élevé [445].

- L'équipe de Nothnick et ses collègues ont montré que l'Exportin-5 et Dicer1 sont régulées par les stéroïdes. En effet, l'œstrogène et la progestérone augmentent l'expression de l'ARNm d'Exportin-5, tandis que la progestérone augmente l'expression de Dicer1 [446].

#### **7.2.6.4 Régulation de la maturation cytoplasmique de pré-miARN**

Le clivage des pré-miARNs par Dicer est soumis à des régulations par des cofacteurs qui interagissent avec Dicer et par des protéines liant l'ARN qui reconnaissent des séquences spécifiques dans les pré-miARNs.

##### **7.2.6.4.1 Rôles des cofacteurs (TRBP et PACT)**

Dicer est une protéine conservée au cours de l'évolution. De façon comparable à DROSHA, Dicer agit avec des protéines associées: TRBP (TAR RNA binding protein), la protéine qui lie des ARNs double brin et PACT (protein activator of PKR). La protéine Dicer peut catalyser seule le clivage du pré-miARN, cependant, la spécificité de clivage est renforcée par TRBP et PACT [447].

L'association de TRBP, PACT et DICER augmente la stabilité et l'activité de Dicer. Le niveau total de DICER est un point de contrôle important de la biogénèse des miARNs. Ainsi, l'analyse de l'extrémité 5'UTR de DICER montre la présence d'un exon leader d'épissage multiple qui est exprimé de façon tissu dépendante. Cet épissage différentiel modifie in vitro l'expression de DICER. De plus, la diminution d'expression de TRBP ou PACT diminue le niveau d'expression et la stabilité Dicer [349, 350]. L'expression de Dicer peut être aussi modulée par la voie de signalisation MAPK (mitogenactivated protein kinase) / Erk

(extracellular signal regulated protein). En effet, cette voie favorise la phosphorylation de TRBP qui alors augmente la stabilité de DICER [448].

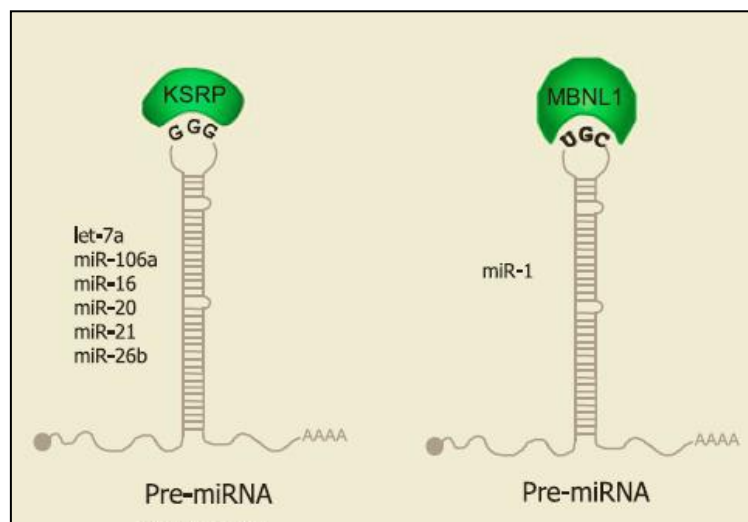
#### 7.2.6.4.2 Les protéines interagissent avec le pré-miARN

- **Les protéines KSRP et TDP-43**

KSRP et TDP-43 sont également impliqués dans la biogénèse des miARNs, ils permettent de promouvoir à la fois la maturation des pri-et des pré-miARN (Figure 52) [411, 414]. Ces résultats suggèrent que la structure tige-boucle des miARNs est une plate-forme importante pour moduler leurs niveaux d'expression et par conséquent la régulation des gènes [449]. KSRP peut interagir avec des activateurs et/ou des répresseurs.

- **Les protéines MBNL1**

La protéine liant l'ARN: MBNL1 (muscle blind-like splicing regulatory protein 1) inhibe la dégradation du pré-miR-1 à cause de son uridylation contrôlée par Lin28. MBNL1 se lie au pré-miR-1 par la reconnaissance de la séquence UGC qui se chevauche avec un site de liaison pour Lin28 (Figure 55) [450].



**Figure 55.** Exemple de protéine régulant positivement la maturation des pré-miARNs.

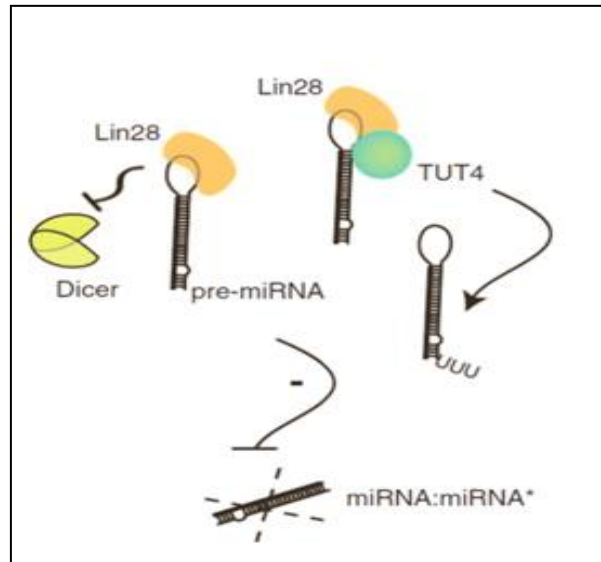
D'après [410].

D'autres protéines entraînent l'inhibition du clivage des pré-miARNs par Dicer (voir Figure 53):

- **La protéine Lin28**

L'isoforme cytoplasmique de Lin28A se lie la séquence de tétranucléotides (GGAG) du pré-miR let-7, ceci entraîne le recrutement de la protéine TUT4 (terminal uridylyl transferase-4, également connue sous le nom ZCCHC11) (voir figure 56). Cette enzyme ajoute une queue poly(U) au pré-let-7, inhibant le clivage par Dicer. Cette queue poly(U) constitue aussi un signal de dégradation du pré-miRNA par les 3'-5' exonucléases. D'autres pré-miARNs comme miR-107, miR-143 et miR-200c possèdent aussi la séquence GGAG dans leurs tige-boucles. Ils sont aussi la cible de Lin28 [418, 451]. TUT4 et Lin28 apparaissent aussi comme des suppresseurs spécifiques de la biogenèse des miARNs.

Récemment, Kim et ses collègues ont montré que l'ajout d'un seul uridine à l'extrémité 3' des pré-miARNs par TUT4, mais aussi par TUT2 et TUT7, est indépendant de Lin28A. En effet, jusqu'à 30% des membres de la famille des let-7 ont une uridine à leur extrémité 3' dans les cellules n'exprimant pas Lin28A [452, 453].



**Figure 56.** Exemple de protéines régulant négativement la maturation de pré-miARN.

D'après [427].

- **La protéine BCDIN3D**

Le clivage des pré-miARNs par Dicer peut être régulé par l'ARN-méthyltransférase humaine: BCDIN3D [454]. BCDIN3D ajoute deux groupes méthyles au



phosphate de l'extrémité 5' du pré-miR-145 in vitro et in vivo. Cette modification inhibe la maturation car Dicer reconnaît spécifiquement l'extrémité monophosphate 5' [455].

- ***La protéine MCPIP1***

MCPIP1 (monocyte chemoattractant protein induced protein-1) est une ribonucléase qui inhibe la biogenèse des miARN en entrant en compétition avec Dicer pour le clivage de la tige-boucle de certains pré-miARNs [456].

- ***La famille de protéines ADAR***

Des nombreuses études ont aussi montré que les miARNs subissent des modifications post-transcriptionnelles par les membres de la famille ADAR (adenosine deaminase RNA proteins). Ces protéines convertissent les bases adenosine en inosine [457]. Les structures en tige-boucle des pré-miARNs sont des substrats favorables pour les protéines ADARs, qui reconnaissent l'ARN double brin. Par exemple, l'inosination de pri-miR-151 par ADAR1 n'affecte pas le clivage de pri-miARN mais interfère avec le clivage pré-miARN par Dicer, entraînant l'accumulation de pre-miR-151 modifié [458].

La conversion de l'adenosine en inosine dans les miARNs matures peut donner aux miARNs modifiés un nouvel ensemble d'ARNm cibles. Par exemple, l'inosination de la séquence « seed » du miR-376 modifie son répertoire de cibles à la fois in vitro et in vivo [459].

Les enzymes ADAR peuvent influencer la maturation de miRNA indépendamment de leur activité catalytique, ce qui suggère que, dans certains cas, la liaison des protéines ADAR seule pourrait être suffisante pour interférer avec la maturation de miARNs [459].

#### ***7.2.6.4.3 ARN régulant la maturation de pré-miARN***

Il a été montré, chez *C. elegans*, qu'un ARN non codant d'environ 800 nucléotides peut inhiber la maturation d'un pré-miARN: RNCS-1 (RNA noncoding, starvation up-regulated), cet ARN entre en compétition avec les ARNs double brin (dsRNAs) endogènes pour se lier à Dicer ou des protéines accessoires qui lient les dsRNAs [460].

#### ***7.2.6.4.4 Rôle des protéines Argonautes***

Les protéines Argonautes (Ago) jouent un rôle important dans la biogénèse et la fonction des miARNs. En effet, les protéines Ago sont un composant important du complexe RISC.

Le génome humain exprime huit protéines Ago: Ago 1 à 4 et Piwi 1 à 4 [461]. Alors que toutes les protéines Ago ont la capacité d'interagir avec les miARNs et les siARNs, la protéine Ago2 est la seule qui possède une activité de clivage des ARNs et joue potentiellement un rôle majeur dans la répression des ARNs induits par les miARNs. De plus, le niveau d'expression des protéines AGO semble lié au niveau d'expression des miARNs dans la cellule. Par exemple, l'expression ectopique des protéines Ago (Ago1-4) améliore l'expression des miARNs dans des conditions où la machinerie des miARNs endogène est saturée. Dans des fibroblastes embryonnaires de souris knock-out Ago2, le niveau de miARN endogènes est réduit [462].

Les protéines Ago sont également soumises à diverses régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles qui pourraient donc avoir un impact sur l'expression des miARN. Par exemple, la protéine Ago2 est surexprimée dans le cancer du sein ESR1-négatif, ce qui améliore l'activité des miARNs. Cette surexpression d'Ago2 est sous le contrôle de voie de signalisation de l'EGFR / MAPK [463].

De plus, la phosphorylation d'Ago2 au niveau de sa poche de liaison à l'ARN, inhibe la liaison de petits ARN influençant ainsi la stabilité de miARNs [464]. Ago2 semble une protéine majeure dans la régulation et la biogenèse des miARNs puisqu'elle assure leur stabilisation, ainsi que le clivage de certains pré-miARN [461]. Le clivage se produit à l'intérieur du bras 3' d'un pré-miARN de telle sorte que seuls les petits ARN générés à partir du bras 5' peuvent être fonctionnels.

## ***7.2.7 La stabilité des miARNs***

### ***7.2.7.1 Demi-vie des miARNs***

Généralement, il est considéré qu'un miARN mature est stable, une fois incorporé dans le complexe RISC. En effet, lors de l'inactivation de transcription ou la maturation des miARNs dans des lignées cellulaires humaines et de rongeurs, ces miARNs matures ont des demi-vies de l'ordre de plusieurs heures à quelques jours [465, 466]. Cependant, il a été récemment montré des différences de stabilité de certains miARNs, ce qui suggère que la régulation de la dégradation de ces miARNs est une façon physiologique pour moduler leur expression [467]. Par exemple, la chute du niveau des miARNs actifs semble

jouer un rôle important dans les neurones. Dans les cellules de rétine de souris, les miARNs spécifiques des neurones sensoriels (cluster miR-183/96/182, miR-204 et miR-211) sont exprimés de manière différentielle en réponse à la lumière. Les miARNs matures sont rapidement diminués pour l'adaptation à l'obscurité en raison de la dégradation active par une enzyme encore non identifiée [468].

Plusieurs autres miARNs dans le cerveau ont des demi-vies courtes à la fois dans des cultures primaires de cellules neuronales humaines et dans du tissu cérébral post mortem [469]. Étonnamment, le blocage des potentiels d'action dans les cellules neurales par inhibition des canaux sodiques empêche la dégradation des miARN sélectionnés, ce qui indique que l'activation des neurones est nécessaire à la régulation de la dégradation de certains miARNs neuronaux [468]. En accord avec cette observation, une approche de séquençage de haut débit de petits ARN, a permis d'identifier plusieurs miARNs diminués dans le cerveau de l'escargot marin *Aplysia* après exposition transitoire au neurotransmetteur sérotonine [470].

### **7.2.7.2 Régulation de la stabilité des miARNs**

Les modifications chimiques des miARNs matures jouent un rôle crucial dans la régulation de leur stabilité.

#### **7.2.7.2.1 Rôle de la séquence « seed »**

Les miARNs sont jusqu'à 10 fois plus stable que l'ARN messager. Dans les fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en *Dicer1*, les miARNs ont une demi-vie plus courte [466]. Ceci suggère que des éléments cis dans les séquences des miRNAs matures conditionnent leurs processus de dégradation. Par exemple, le miR-503 et d'autres membres de la famille de miR-16 sont constitutivement instables dans les cellules NIH-3T3 [471]. MiR-503 est diminué rapidement au début cycle cellulaire mais s'accumule pendant l'arrêt du cycle induit par une privation de cellules de sérum.

Les études de séquence de miARN suggeraient que la séquence « seed » à l'extrémité 3' du miARN, pourrait être nécessaire à sa dégradation. En effet, le miR-382 est instable dans les cellules HEK293. Des mutations dans sa séquence « seed » augmente sa stabilité *in vitro* [465].

Des études sur des miARNs co-transcrits (d'un même cluster) suggèrent aussi le rôle de la séquence du miARN dans sa dégradation. La famille de miR-29 fournit un exemple: le miR-29b est instable dans le cycle cellulaire et ne s'accumule que au cours de la mitose alors que miR-29a est stable tout au long de cycle cellulaire [430, 461]. Les miR-29a et miR-29b partagent la même séquence « seed », mais ils se distinguent par un C à la place de U en position 10. De plus, le miR-29b contient un motif de hexanucléotide (AGUGUU) à son extrémité 3' qui est responsable de sa localisation nucléaire. Toutefois, ce motif n'est pas responsable de sa dégradation accélérée. En revanche, l'uridine en position 10 dans la séquence de miR-29b semble responsable de sa déstabilisation. De nombreux miARNs mais pas tous, qui contiennent une base uridine dans cette position sont présentent des niveaux de stabilité semblable au miR-29b [472].

#### 7.2.7.2.2 Modifications de l'extrémité 3' des miARNs

- *la méthyltransférase HEN1*

Chez les plantes, la méthyltransférase HEN1 (Hua enhancer 1) ajoute un groupement méthyle au groupement hydroxyle de l'extrémité 3' du miARN [473]. Cette méthylation protège l'extrémité 3' terminale des miARNs de la dégradation due à l'uridylation par HESO1 (HEN1 suppressor 1) [474]. La diminution de la stabilité des piRNAs, siARN et ARNm est également associée à l'uridylation de leur extrémité 3' [475, 476]. Généralement, les miARNs chez les animaux n'ont pas du groupement méthyle protecteur à leur extrémité 3'. Toutefois, l'addition d'une matrice indépendante de nucléotides les protègent de la dégradation. Deux mécanismes existent: l'adénylation ou l'uridylation [477]. Plusieurs enzymes, y compris MTPAP, PAPD4/GLD2, PAPD5, ZCCHC6, TUT4/ZCCHC11 et PAPD2/TUT1 ont une activité de type nucléotide transférase 3' terminale comme montré par des expériences d'invalidation [477, 478].

Toutefois, les implications fonctionnelles n'ont été décrites pour quelques enzymes.

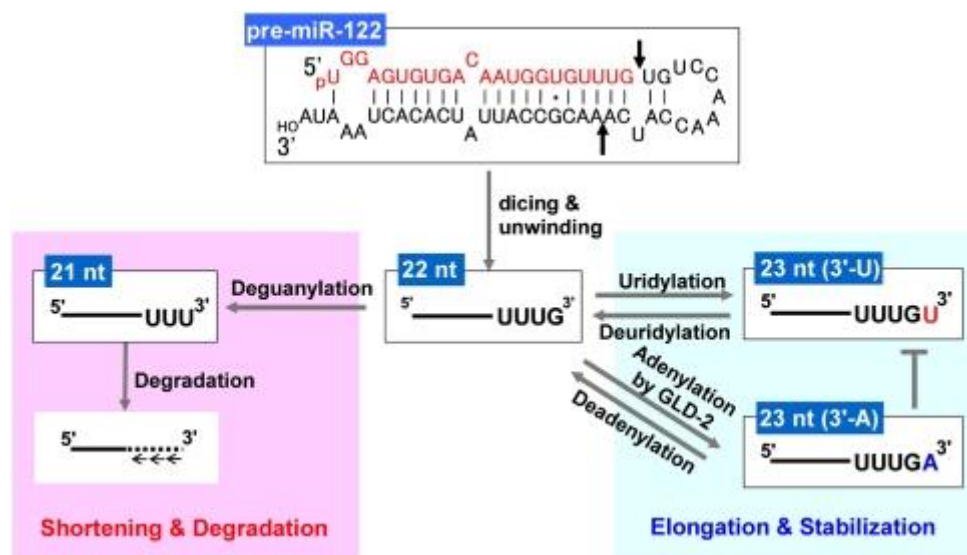
- *L'enzyme TUT4*

Par exemple, TUT4 [450, 476, 479] modifie les niveaux de cytokines par uridylation des membres de la famille de miR-26 [480]. Le Knockdown de TUT4 se traduit par une diminution de l'uridylation de miR-26a associé à une diminution de l'expression

d'IL6. Le knockdown de TUT4 n'augmente pas le niveau d'expression de miR-26, indiquant que l'uridylation de ce miARN n'affecte que son activité et pas son expression.

- **L'enzyme GLD2**

L'Adénylation de l'extrémité 3' du miARN peut-être associée soit au renforcement, soit à une diminution de leur stabilité (voir figure 57) [481]. Par exemple, le miARN le plus fortement exprimé dans le foie : miR-122, est monoadenylé par la polymérase cytoplasmique poly (A) GLD2 (germline development defective-2). Chez les souris knock-out GLD2, le miR-122 est sélectivement déstabilisé, alors que les niveaux de 10 autres miARNs restent inchangés. La stabilité des précurseurs de miR-122 n'est pas affectée par knock-out de GLD2, ce qui suggère un rôle dans la modulation de stabilité de la forme mature du miR-122 par l'adénylation.



**Figure 57.** Modèle de la stabilisation sélective de miR-122 par GLD2. D'après [481].

- **La protéine VACV**

Un autre exemple du rôle du polyadénylation du miARNs dans leur stabilité est la protéine VACV (une polymérase virale poly A). Elle induit la polyadénylation des miARNs endogènes au cours de l'infection [482]. L'infection des fibroblastes embryonnaires de souris par VACV entraîne une diminution de l'ordre de 30 fois du niveau de miARNs endogènes, dû à la polyadénylation. La polyadénylation des miARNs est assurée

par un produit d'un gène viral, alors que leur dégradation est due à une protéine cellulaire encore non définie.

Dans les années à venir, il sera important de mieux caractériser les enzymes qui sont responsables de ces modifications et comprendre leur impact sur la stabilité et la fonction de miARNs.

### **7.2.7.2.3 Enzymes régulant la stabilité des miARNs**

#### **- Les enzymes SDN1**

Ces enzymes appartiennent à la famille des exoribonucléases. Chez *Arabidopsis*, SDN1 (small RNA degrading nuclease 1) possède une activité 3'-5' exonucléase sur les petits ARN dont les miARNs. SDN1 dégrade spécifiquement l'ARN simple brin mais pas le double brin. La méthylation 2' O présente sur l'extrémité 3' nucléotidique des miARNs de plantes joue un rôle protecteur contre l'activité SDN1 [483]. Fait intéressant, ces protéines sont conservées chez les eucaryotes et il semble probable que les homologues animaux des SDNs ont des fonctions similaires, mais ceci n'a pas encore été rapporté [484].

#### **- Les enzymes XRN**

la famille des enzymes XRN jouent un rôle dans la stabilité des miARN: chez *Arabidopsis*, XRN2 et XRN3 sont impliqués dans la dégradation de la séquence de la boucle de pré-miARN [485], dans les cellules de mammifères, XRN2 dégrade le pré-miARN après par la maturation par Droscha [486]. Chez *C. elegans*, XRN2 dégrade les miARNs matures une fois libérés du complexe RISC et peut également influencer sur la vitesse à laquelle ils sont libérés [487]. Fait intéressant, la présence de l'ARN cible interfère avec la dégradation des miARNs par XRN2 à la fois *in vitro* et *in vivo* [487, 488]. Cela est dû à la concurrence directe entre l'ARN cible et XRN2 pour la liaison au miARN ou par un autre mécanisme moléculaire qui n'est pas encore connu.

#### **- Rrp42**

Rrp42 (ribosomal RNA-processing protein-42) et l'exoribonucléase XRN1 sont proposées pour participer à la dégradation de miR-382 dans les cellules HEK293. En effet, le knock-down de ces facteurs augmente sélectivement le niveau d'expression de miR-382 [465].

#### **- hPNPaseold-35**

Dans une lignée de cellules de mélanome humain, l'expression ectopique de hPNPase<sup>old-35</sup> (human polynucleotide phosphorylase protein) conduit à la diminution sélective de plusieurs miARNs (miR-221, miR-222 et miR-106b). Les études d'immunoprécipitation montrent que cette 3'-5' exoribonucléase est directement associée avec ces miARNs, ce qui provoque leur dégradation in vitro. hPNPase<sup>old-35</sup> est un gène stimulé par l'interféron et il est impliqué dans la diminution de niveau de miR-221 induit par la stimulation par IFN- $\beta$ . Une des cibles directes de miR-221 est le suppresseur de cycle cellulaire p27kip1. Par conséquent, la surexpression de miR-221 et le knockdown de hPNPase<sup>old-35</sup> protègent les cellules de mélanome humain par l'arrêt de croissance induit par IFN- $\beta$ , indiquant un rôle central de la stabilité de miARN dans la prolifération cellulaire [489].

- ***Eri1***

Il a été montré récemment que le 3'-5' exoribonucléase Eri1 est impliquée dans la régulation de stabilité des miARNs dans les lymphocytes de souris. En effet, il a été observé dans les cellules NK et T de souris knock-out Eri1, une augmentation globale des niveaux de miARNs étudiés [490]. La régulation des niveaux de miARNs par Eri1 semble être nécessaire pour le développement des cellules NK et l'immunité antivirale, mais son mécanisme d'action reste à établir.

- ***La famille des protéines STAR***

D'autres protéines liant l'ARN peuvent également jouer un rôle dans la stabilité des miARNs matures. Par exemple, un membre de la famille STAR (signal transduction and activation of RNA) est surexprimé en réponse à la signalisation de p53 ce qui stabilise le miR-20a mature [491]. L'identification des protéines qui stabilise et/ou déstabilise les miARNs matures suggère que la régulation de la dégradation des miARNs est importante dans le contrôle du répertoire des miARNs de la cellule. Enfin, il reste encore à comprendre les mécanismes impliqués dans la dégradation ou la stabilisation de miARNs.

#### ***7.2.7.2.4 La dégradation des miARNs par les ARNs cibles***

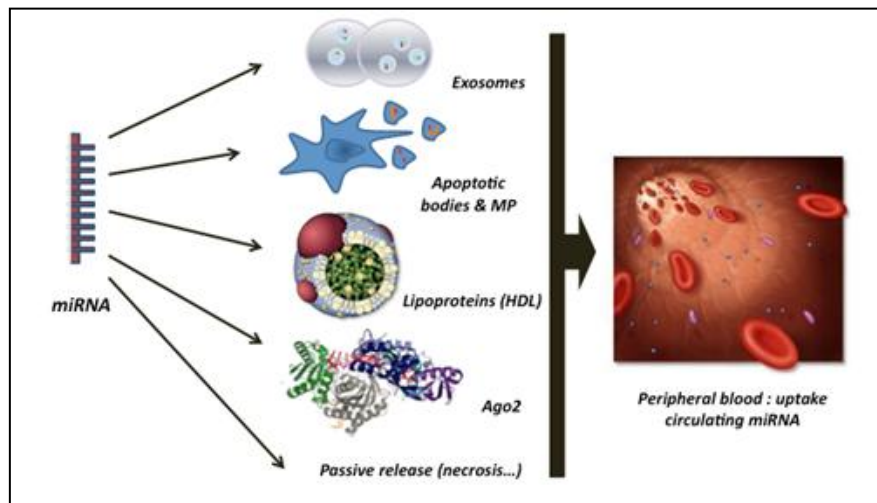
Chez *C. elegans*, la stabilisation des miARNs est assurée par la cible ARNm. En effet, la liaison des miARNs aux ARNs cibles peut favoriser la dégradation des miARNs chez la drosophile et les mammifères. Chez les mouches, la plupart des miARNs sont incorporés dans le complexe RISC contenant Ago1 [492]. Les miARNs qui s'associent à



Ago2 sont méthylés, et ainsi protégés contre la dégradation. Dans les cellules humaines, les miARNs sont également soumis à cette déstabilisation dirigée par la cible ARNm [493]. Ainsi l'hybridation à la cible ARNm favorise la modification post-transcriptionnelle des miARNs (surtout uridylation 3') qui cause leur dégradation, et ce qui limite le recyclage des miARNs [494]. Chez l'homme, on ne sait pas encore quelles sont les caractéristiques de l'ARN cible qui régulent la modification post-transcriptionnelle d'un miARN. Toutes fois, le mécanisme de la complémentarité parfaite tel que proposé chez les mouches pourrait être une piste [493].

### 7.2.8 Transport de miARNs

Les transporteurs de miARNs sont: les microvésicules, les exosomes, les corps apoptotiques, les lipoprotéines de haute densité (HDL) et les protéines Ago (figure 58):



**Figure 58.** Mécanismes de transport des miARNs de cellules dans la circulation sanguine périphérique et vers les cellules cibles. **MP:** Microparticles; **HDL:** High Density Lipoprotein; **Ago2:** Argonaute 2

#### - Les exosomes

Les exosomes sont des vésicules membranaires de 40 à 100 nm de diamètre issues de l'endosome qui permettent la communication intercellulaire par le transfert d'ARNm et de miARNs [495]. L'exosome est initialement formé par la membrane plasmique naissant vers l'intérieur dans les organes multi-vésiculaires des endosomes. Les exosomes et leur contenu en miARNs sont libérés dans le compartiment extracellulaire lors de la fusion des endosomes avec la membrane plasmique [496-498].



### - *Les microparticules*

Ce sont des vésicules plus grandes que les exosomes (100 à 1000 nm de diamètre). Elles représentent une population hétérogène de vésicules qui sont libérées par bourgeonnement au niveau de membrane plasmique [499, 500]. Les microparticules présentent à leur surface un large éventail de substances et des récepteurs et contiennent un ensemble concentré de cytokines, protéines de signalisation, les ARNm et les miARNs. Au cours de l'apoptose, les cellules se fractionnent en corps apoptotiques qui transportent également des miARNs.

### - *Lipoprotéine*

En particulier les lipoprotéines de haute densité peuvent transporter des miARNs endogènes et les livrer aux cellules réceptrices avec d'éventuelles capacités de ciblage fonctionnel. Cette exportation cellulaire est régulée par sphingomyelinase neutre [501].

### - *Les protéines d'Argonaute 2*

La plupart des miARNs extracellulaires dans le plasma sanguin et la culture cellulaire sont indépendants des exosomes et sont associés aux protéines Argonaute 2 (Ago2), une protéine du complexe RISC [502]. Les miARNs extracellulaires, dans la plupart des cas sont des sous-produits de cellules mortes qui restent dans l'espace extracellulaire en raison de la grande stabilité de la protéine Ago2 et complexe Ago2-miARNs.

Les transporteurs des miARNs 29, miR-18, miR-101, miR-130 sont mentionnés dans le tableau 11.

Ago2 dépendant	miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-101, miR-18a-5p	plasma, sérum	[503]
	miR-130a, miR-130b	plasma	[502]
Exosome dépendant	miR-101, miR-130b, miR-29a, miR-29b, miR-18a-5p	plasma, sérum	[504]
	miR-29a	plasma	[505]
	miR-101, miR-130a, miR-130b, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-18a-5p	sérum, cellules T, B et dendritique	[506]
	miR-18a-5p		[502]
	miR-101	sérum	[507]
	miR-130b		[508]
	miR-29b	cellules neuronales	[509]

*Tableau 11. Classement de miARNs selon leurs transports.*



# 8. Les miARNs dans des évènements biologiques

## 8.1 Généralités

### 8.1.1 Les miARNs dans les processus biologiques

Les miARNs ont un rôle très important dans un grand nombre de processus biologiques nécessitant une régulation précise, incluant le développement embryonnaire, la prolifération, la différenciation et la reproduction, mais également dans des processus cellulaires comme l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire et le métabolisme...

Des exemples de régulation de développement embryonnaire par les miRNAs sont mentionnés dans la figure 59 et le tableau 12.

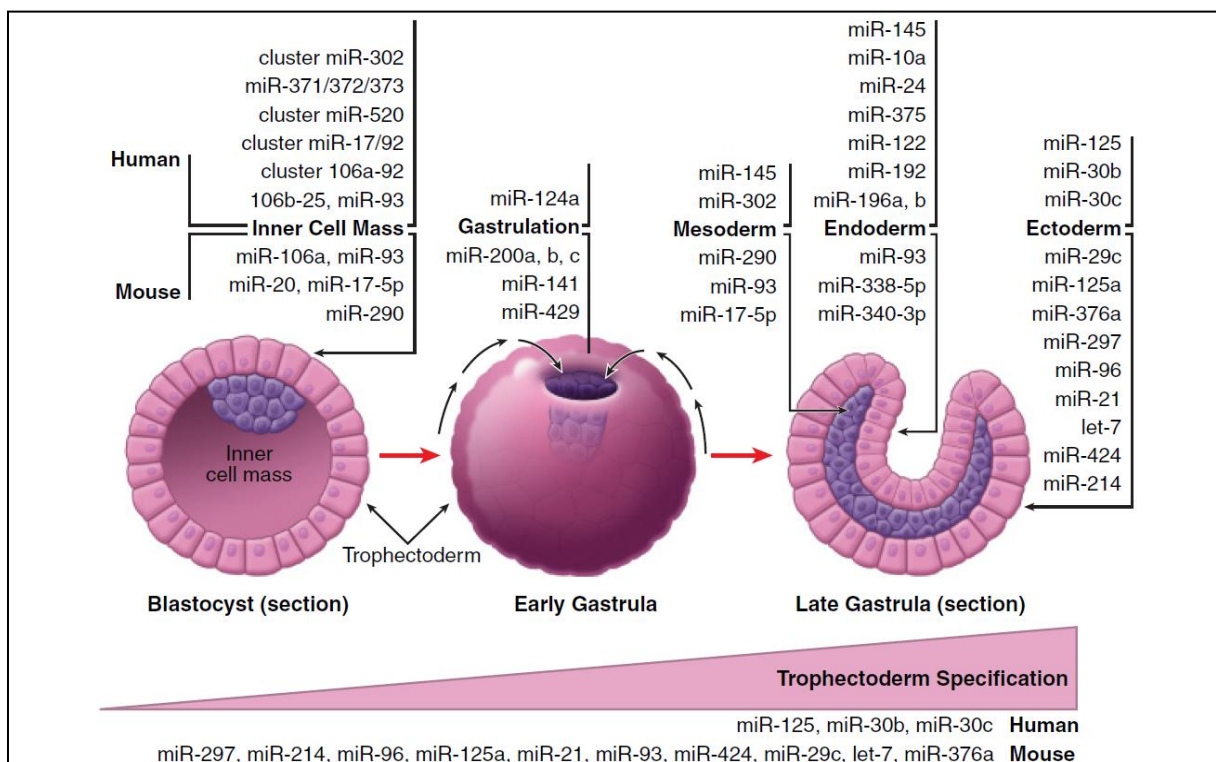


Figure 59. Implication des miARNs dans le développement embryonnaire. D'après [510].

Germ Layers	Species	miRNAs	Target Genes	Reference
Ectoderm	Human	miR-125	<i>SMAD4</i>	(7)
	Mouse	miR-30b, miR-30c miR-297, miR-96, miR-21, miR-29c, let-7, miR-214, miR-125a, miR-424 and miR-376a	Embryonic ectoderm development protein ( <i>EED</i> ) All <i>Ras</i> and <i>Mapk</i> (p38 pathways)	(48) (60)
Endoderm	Human	miR-200a,b,c, miR-141, miR-429	<i>Snail</i>	(16)
		miR-145	<i>OCT4, SOX2, KLF4</i>	(64)
	Mouse	miR-10a	<i>HOXA1</i>	(57)
	miR-24	<i>NOTCH1-MAPK14</i>	(57)	
	miR-375 <sup>^</sup>	<i>TIMM8A, MTPN, JAK2, C1QBP, UUSP1, ADISPOR1</i>	(21, 57)	
Mouse	miR-122*, miR-192*	<i>CAT1, SIP1</i>	(57, 21)	
	miR-93	<i>Stat3</i>	(13)	
Mesoderm	Human	miR-338-5p, miR-340-3p	Members of <i>Hdac</i> and related pathways	(14)
		miR-302, miR-427	<i>Lefly1, Lefly2 (TGFβ/Nodal Smad2/3)</i>	(44)
	Mouse	miR-145	<i>OCT4, SOX2, KLF4</i>	(64)
	miR-290	<i>Dkk1</i> (affecting <i>Wnt</i> pathway)	(68)	
	miR-200a,b,c, miR-141, miR-429	<i>Snail</i>	(16)	
miR-93, miR-17-5p	<i>Stat3</i>	(13)		

miRNA, microRNA (miR); Hdac, histone deacetylase. \*Liver or <sup>^</sup>pancreatic islet-specific miRNAs.

**Tableau 12.** Les miARNs et leurs cibles dans le développement embryonnaire. D'après [510].

Par exemple, les miARNs ont rôle très important dans le système immunitaire. L'invalidation conditionnelle de *Dicer* dans les lymphocytes induit une altération des lymphocytes T régulateurs. Ceci conduit à une pathologie immunitaire complexe associant une splénomégalie, une augmentation de volume des ganglions lymphatiques intestinaux et une colite [511].

Les cellules embryonnaires souches de souris déficientes en *DGCR8*, sont incapables de se différencier correctement et maintiennent l'expression de facteurs de pluripotence après la différenciation, ceci est dû à une dérégulation d'expression des miARNs essentiels au processus de différenciation [512].

### 8.1.2 Les miARNs et le cancer

Les miARNs sont classés en deux groupes: miARNs suppresseurs de tumeur (miRST) et les miARNs oncogènes (oncomiR). En effet, certains miARNs ciblent des ARNm des gènes oncogènes et leur diminution dans certains cancers conduit à la surexpression de leurs cibles. Au contraire, d'autres miARNs qui ciblent des gènes suppresseurs de tumeurs sont surexprimés dans les cancers.

- **Les miARNs suppresseurs de tumeur**

Parmi le premier miRST étudié, était la famille des let-7. Dans le cancer du poumon, let-7 a une expression réduite associée à une forte expression de la protéine RAS et constitue un facteur de mauvais pronostic [513]. Certains miARNs sont eux sous-exprimés dans le tissu

cancéreux par rapport au tissu sain, tels que miR-143 et miR-145 dans les cancers colorectaux [514], miR-145 dans les cancers du sein [515] ou miR-29b dans les leucémies lymphoïdes chroniques [516].

- **les miARNs oncogènes**

A l'inverse des miRST, les oncomiRs sont souvent surexprimés dans les cancers et entraînent des effets prolifératifs ou anti-apoptotiques. L'un des premiers oncomiR identifié est miR-155. Sa surexpression est retrouvée dans les lymphomes B diffus à grandes cellules, les cancers du sein et du colon. Dans les souris transgéniques, la surexpression de miR-155 suffit à provoquer une leucémie aiguë lymphoblastique ou à un lymphome de haut grade [517].

Le développement des méthodes d'analyse de l'expression des miARNs, par microarrays, RT-qPCR ou encore par séquençage à haut débit ont permis d'acquérir de nombreux profils d'expression des miARNs dans les tissus cancéreux. Ainsi, dans le cancer du sein, miR-9 est surexprimé dans les cellules cancéreuses [518]. MiR-9 cible et inhibe la traduction de l'ARNm *CDH1*, codant pour l'E-cadherine, ce qui conduit à l'augmentation des propriétés invasives des cellules cancéreuses. Ainsi, des cellules de cancer du sein non métastatique surexprimant miR-9, sont capables de former des métastases pulmonaires, chez la souris.

Un autre exemple concerne le *cluster* miR-17-92, contenant plusieurs miARNs oncogéniques. Ce cluster est induit dans divers types de cancer dont le lymphome à cellules B, le cancer du poumon, du sein et du pancréas. Les gènes cibles des miR-17-92 sont E2F1, PTEN et p21CIP1/WAF1, des régulateurs du cycle cellulaire [519].

D'autres exemples de dérégulation de l'expression des protéines de la biogénèse de miARNs dans plusieurs types de cancer sont présentés dans tableau 13.

Type de cancer	Protéines affectées	le niveau d'expression	Réf
Prostate	Dicer	a/ L'expression de Dicer est augmentée dans le cancer de la prostate. b/ L'inhibition de Dicer supprime la croissance et la capacité tumorigène des lignées de cellules de cancer de la prostate chez l'homme, mais augmente les capacités migratoires de certaines lignées de cellules cancéreuses de la prostate. c/ l'ablation complète de l'activité de Dicer dans un modèle de souris PTEN KO entraîne dans le cancer de	[520]

		la prostate un arrête de croissance et de progression tumorale	
Colorectal	Dicer	Une surexpression de Dicer est associée à un pronostic défavorable de survie.	[521]
Prostate	Dicer	a/ L'expression de Dicer est augmentée de 2,5x dans les échantillons métastatiques par rapport aux tumeurs non métastatiques b/ 81% des adénocarcinomes de la prostate montrent une surexpression de Dicer par rapport au tissu prostatique normal et l'expression de Dicer augmente avec le stade clinique de la tumeur c/ L'expression de Dicer beaucoup plus élevée dans la lignée DU145 (provenant d'une métastase ganglionnaire) par rapport à la lignée RWPE-1	[522]
Mélanome	Dicer	L'expression de Dicer est spécifiquement augmentée dans les mélanomes, avec une augmentation significative dans 81% des mélanomes cutanés, 80% des mélanomes acrolentigineux et 96% des mélanomes métastatiques par rapport aux carcinomes et aux sarcomes. La surexpression de Dicer est associée à un index mitotique élevé, à la métastase nodale et à un stade clinique avancé.	[523]
Cancer gastro-intestinale	Dicer	L'expression de Dicer dans les cellules cancéreuses gastro-intestinales humaines AGS et HepG2 est plus élevée, tandis que, son niveau d'expression dans les cellules Kyse-30 est plus faible que les échantillons de contrôle.	[524]
Cancer de l'ovaire	Dicer	a/ La down-regulation de Dicer promu la prolifération cellulaire, la migration et la progression du cycle cellulaire de lignées de cellules cancéreuses de l'ovaire (A2780 et SKOV3). b/ L'expression de Dicer est significativement diminuée dans les cellules A2780 résistantes au cisplatine. c/ Dicer est impliquée dans la résistance aux médicaments dans le cancer de l'ovaire, et que son expression peut être régulée par EZH2	[525]
Oesophage	Drosha	a/ La surexpression de Drosha est associée à un pronostic défavorable de survie b/ Drosha est surexprimée dans la majorité des lignées de cancer de l'oesophage par rapport à une lignée d'oesophage normal et d'autres lignées tumorales	[526]

Cancer gastro-intestinale	Drosha	Le niveau d'expression de Drosha est plus élevé dans les lignées cellulaires cancéreuses gastro-intestinaux humaines AGS et HepG2 que chez les témoins, alors que le niveau d'expression de Drosha dans la lignée cellulaire Kyse-30 était plus faible.	[524]
Cancer gastro-intestinale	DGCR8	Les niveaux d'expression DGCR8 dans les trois lignées cellulaires cancéreuses gastro-intestinaux humaines (AGS, KYSE30 et HepG2) que chez les témoins.	[524]
cancer gastrique	Ago2	a/ l'expression d'Ago2 dans trois types de cancer gastrique (363 CGs primaires, 8 métastases dans les ganglions lymphatiques et 10 l'épithélium de tissus environnants gastriques non néoplasiques). b/ Ago2 est surexprimé dans le cancer gastrique primaire et métastatique par rapport aux témoins sains. c/ l'expression d'Ago2 est également corrélé au sexe des patients, ce qui peut suggérer un rôle possible des hormones dans les mécanismes de régulation d'Ago2.	[527]

*Tableau 13. Exemples de dérégulation de l'expression des protéines de la biogénèse de miARNs dans plusieurs types de cancer.*

## **8.2 Rôle des miARNs dans l'appareil génital mâle**

### **8.2.1 Rôle des protéines de biogénèse des miARNs**

#### **8.2.1.1 Expression des protéines de la biogénèse des miARNs**

Certaines études ont montré le profil d'expression des protéines de la biogénèse des miARNs au sein du testicule ou de ses différentes composantes cellulaires. Même si les cellules germinales et les cellules de Sertoli expriment toutes les protéines de biogénèse, il existe néanmoins des profils d'expression différents entre ces deux types de sous-populations.

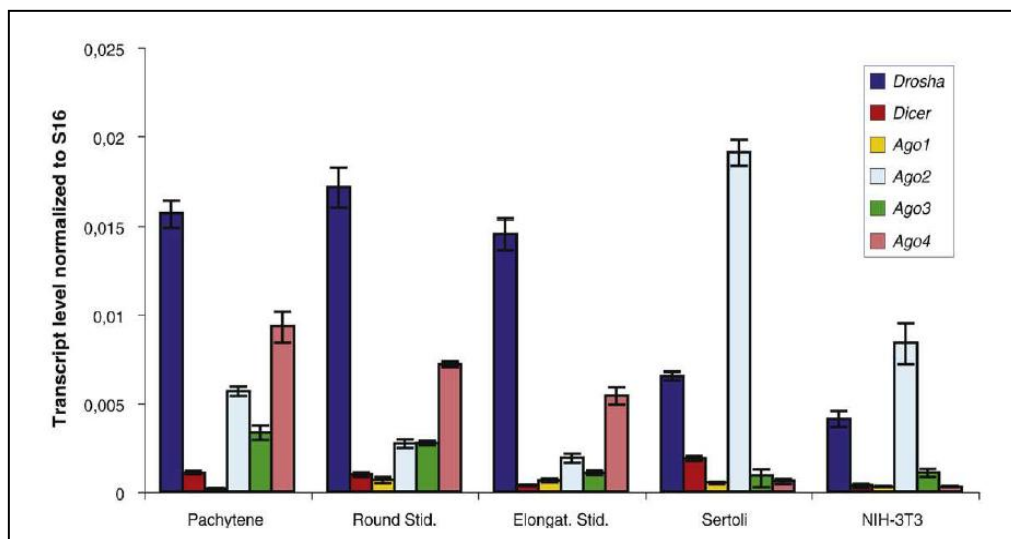
- ***Dans les cellules de Sertoli***

Les cellules de Sertoli expriment les transcrits de l'ensemble des acteurs de la biogénèse des miRNAs (Drosha, Dicer, Ago1-4). Cependant, les cellules de Sertoli

expriment à un taux élevé le transcrite Ago2 en comparaison des cellules germinales [528] (figure 60).

- ***Dans les cellules germinales***

Les cellules germinales du testicule (spermatocytes et spermatides) présentent toutes un profil d'expression comparable des transcrits codant pour la machinerie de biogenèse des miARNs. Ainsi ces cellules expriment fortement les transcrits de Drosha et Ago4, avec une expression marquée de Ago3 et Ago4 dans les spermatocytes pachytènes [528].



**Figure 60.** Profil d'expression des transcrits codant la machinerie de biogenèse de miRNAs au sein des sous-populations cellulaires du testicule. D'après [528]. Comparaison entre les cellules germinales testiculaires (spermatocytes pachytènes, spermatides rondes et spermatides allongées) et cellules somatiques (cellules de Sertoli et contrôle positif NIH-3T3).

### 8.2.1.2 *L'invalidation des protéines de biogénèse de miARNs*

Plusieurs études ont montré le rôle crucial des protéines de la biogénèse de miARNs dans la spermatogénèse et la fertilité masculine.

#### a) ***DROSHA***

L'invalidation conditionnelle (cko) après la naissance de *Drosha* ou *Dicer* dans les cellules germinales des testicules de souris induit l'infertilité chez les mâles avec une spermatogénèse perturbée caractérisée par une diminution des spermatocytes et des



spermatides. Le phénotype *Drosha* (cko) est plus sévère que le phénotype *Dicer* (cko) [529]. Ces données suggèrent que les miARNs ainsi que d'autres petit-ARNs Dicer-dépendants (par exemple les endo-siRNA) ont des rôles divergents dans la régulation des ARNm codant pour des protéines au cours de la spermatogenèse post-natal [529]. Le KO de *Drosha* dans le testicule touche la maturation des miARNs mais pas des endo-siRNAs. Cette invalidation de *Drosha* entraîne des perturbations de spermatogénèse, ce qui suggère le rôle essentiel de miARNs dans spermatogenèse normale post-natal. La carence en *Drosha* ou le manque de miARNs dépendants de *Drosha* pourrait perturber les deux phases méiotiques et haploïdes de la spermatogenèse. Les endo-siARN jouent un rôle plus important par rapport aux miARNs sur la stabilité de l'ARNm des spermatides rondes.

### **b) *DGCR8***

Le rôle crucial de gène *DGCR8* dans la reproduction a été montré par l'invalidation de ce gène dans les cellules souches embryonnaires. En effet, lorsque ces cellules déficientes en *DGCR8*, sont traitées à l'acide rétinoïque, un inducteur puissant de différenciation, les marqueurs de pluripotence (*Oct4*, *Rex1*, *Sox2* et *Nanog*) ne sont pas complètement réprimés et ces cellules conservent toujours la capacité de produire des colonies de cellules souches embryonnaires. Ces résultats suggèrent que les miARNs régulent l'auto-renouvellement de cellules souches embryonnaires [512].

### **c) *DICER***

Le gène *Dicer* est essentiel au développement embryonnaire chez la souris (voir tableau 14 et figure 61). Sa suppression entraîne une létalité précoce de l'embryon, ce qui suggère que la machinerie de la biogénèse de miARNs joue un rôle important dans le maintien de la population de cellules souches [530].

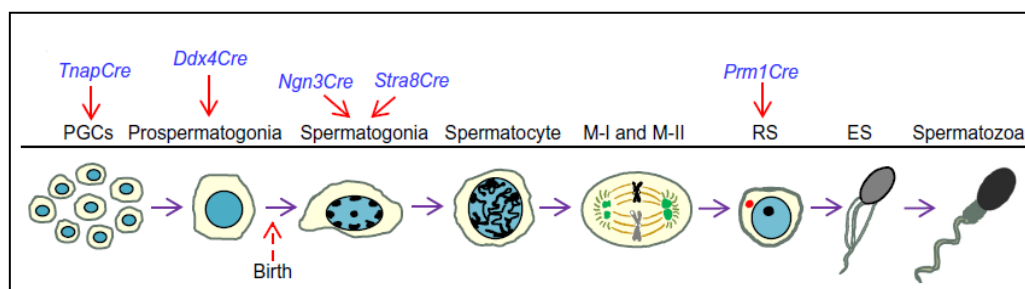
*Dicer 1* est impliqué aussi dans la maturation et la survie des cellules de Sertoli. L'invalidation conditionnelle de *Dicer 1* dans les cellules de Sertoli chez la souris entraîne une infertilité associée à une complète absence de spermatozoïdes et une dégénérescence progressive du testicule [531].

Le ko de *Dicer 1* entraîne une diminution de trois miARNs Sertoliens: miR-125a-3p, miR-872 et miR-24 qui ciblent SOD-1 (superoxyde dismutase 1) [532]. L'augmentation de l'expression de la protéine SOD-1 induit l'apoptose des cellules de Sertoli.

L'invalidation conditionnelle de gène *Dicer1* dans les cellules germinales primordiales au pendant la vie embryonnaire (7,5<sup>ème</sup> jour) induit des défauts de prolifération de ces cellules et les souris adultes présentes des défauts de la spermatogénèse avec un faible nombre de spermatogonies et de rares tubes séminifères contenant de spermatides [533].

Mouse model	Cre expression	Spermatogenic phenotype	References
TnapCre-Dicer1	Primordial germ cells (PGCs)	Defects in PGC proliferation and post-natal spermatogenesis	Hayashi et al. (2008) and Maatouk et al. (2008)
Ddx4Cre-Dicer1 (E18)	Prospermatogonia	Meiotic defects, reduced number of haploid cells, drastic abnormalities in head and tail morphology of the remaining spermatozoa	Liu et al. (2012a) and Romero et al. (2011)
Ngn3Cre-Dicer1	Spermatogonia	No gross abnormalities in spermatogonia and spermatocytes. Major defects in haploid differentiation including chromatin organization, condensation and nuclear shaping of elongating spermatids	Korhonen et al. (2011)
Stra8Cre-Dicer1	Spermatogonia	Morphological disruptions of spermatocytes and round spermatids, impaired meiotic progression	Wu et al. (2012) and Greenlee et al. (2012)
Stra8Cre-Drosha	Spermatogonia	Severe morphological disruptions in spermatocytes and round spermatids. Stronger phenotype than for the Stra8Cre-driven deletion of Dicer1 gene	Wu et al. (2012)
Pmm1Cre-Dicer1	Spermatids	Defects mainly in post-meiotic differentiation, abnormal head morphology	Chang et al. (2012)

**Tableau 14.** Les modèles de souris knock-out *Dicer1*. D'après [534].



**Figure 61.** Le calendrier de la délétion du gène *Dicer1* pendant la spermatogénèse est indiqué par des flèches rouges. D'après [534].

La délétion conditionnelle de *Dicer1* dans la lignée germinale mâle juste avant la naissance induit des défauts sévères dans les cellules germinales méiotiques et post-méiotique [535, 536]. En effet, les spermatocytes montrent un retard de la progression de la méiose I et une apoptose massive, ce qui entraîne la réduction du nombre de spermatides rondes. Les spermatides rondes restantes ne subissent pas une différenciation normale, les spermatozoïdes ne sont pas fonctionnels et morphologiquement anormaux. Il a été suggéré comme mécanisme dans ces défauts, le rôle des éléments transposables. En effet, les spermatocytes déficients surexpriment les éléments transposables de la famille SINE [535]. Une surexpression similaire de cette famille (SINE) a été observée dans ovocytes de souris après l'invalidation de *Dicer 1* [537].

Les deux travaux de l'équipe Korhonen HM et al [538] de l'équipe de Greenlee AR et al [539] montrent que les phénotypes sont moins graves lorsque la délétion *Dicer1* dans les spermatogonies survient après la naissance. En effet, il n'y a pas d'effet évident sur la progression de la méiose et les premiers troubles visibles sont au niveau des cellules germinales mâles haploïdes [538]. Dans les testicules de ces souris, le nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme est considérablement diminué et les spermatozoïdes sont morphologiquement anormaux avec des problèmes d'organisation et de condensation de chromatine dans leurs têtes [538]. Cependant l'expression des transposons n'a pas été affectée dans ces testicules. Cette différence d'expression des éléments transposables entre ces modèles et les modèles knockout *Ddx4Cre* et *Ngn3Cre* de *Dicer1* (voir figure 61) suggère que *Dicer1* peut être impliquée dans le contrôle de l'expression de transposon dans l'embryon et/ou la phase post-natale précoce (avant l'expression de *Ngn3*). D'autre part, il y a une surexpression de satellite majeur (des répétitions de 234 paires de bases, situés dans les régions péri-centromériques) dans les testicules de souris knock-out *Dicer1(Ngn3Cre)* de manière similaire à ce qui est observé dans les cellules souches embryonnaires de souris knock-out *Dicer1* [538, 540, 541].

#### **d) PROTEINES AGO**

Les rôles des petit-ARN (miARN, siRNA) peuvent être également étudiés par l'inactivation des protéines effectrices AGO (*AGO1*, *AGO2*, *AGO3*, *AGO4*) qui interviennent dans leur biogénèse [542]. Les protéines AGOs sont exprimées de façon ubiquitaire, mais *AGO4* est fortement exprimé dans les testicules. *AGO4* se localise dans les noyaux des spermatocytes pendant la méiose I, en particulier sur les sites synapses dans le sous-domaine XY impliqué dans le silence de transcription des chromosomes sexuels. Les souris knock-out *Ago4* (*Ago4*<sup>-/-</sup>) montrent une méiose perturbée liée à la perte dramatique de plus de 20% des miARNs du chromosome X. Cette étude montre qu'*AGO4* régule l'entrée en méiose et l'inactivation du chromosome sexuel dans les cellules germinales de mammifère, impliquant des petits-ARN dans ce processus [542].

L'étude des animaux *Ago2*<sup>-/-</sup>, n'a pas mis en évidence d'altération au niveau testiculaire ni au niveau de la fertilité suggérant que (i) *Ago2* n'est pas indispensable à la méiose et la spermiogénèse, (ii) l'éventuelle compensation de la perte d'*Ago2* par les autres membres de la famille argonaute [543].

## ***8.2.2 Rôle des miARNs dans la différenciation sexuelle***

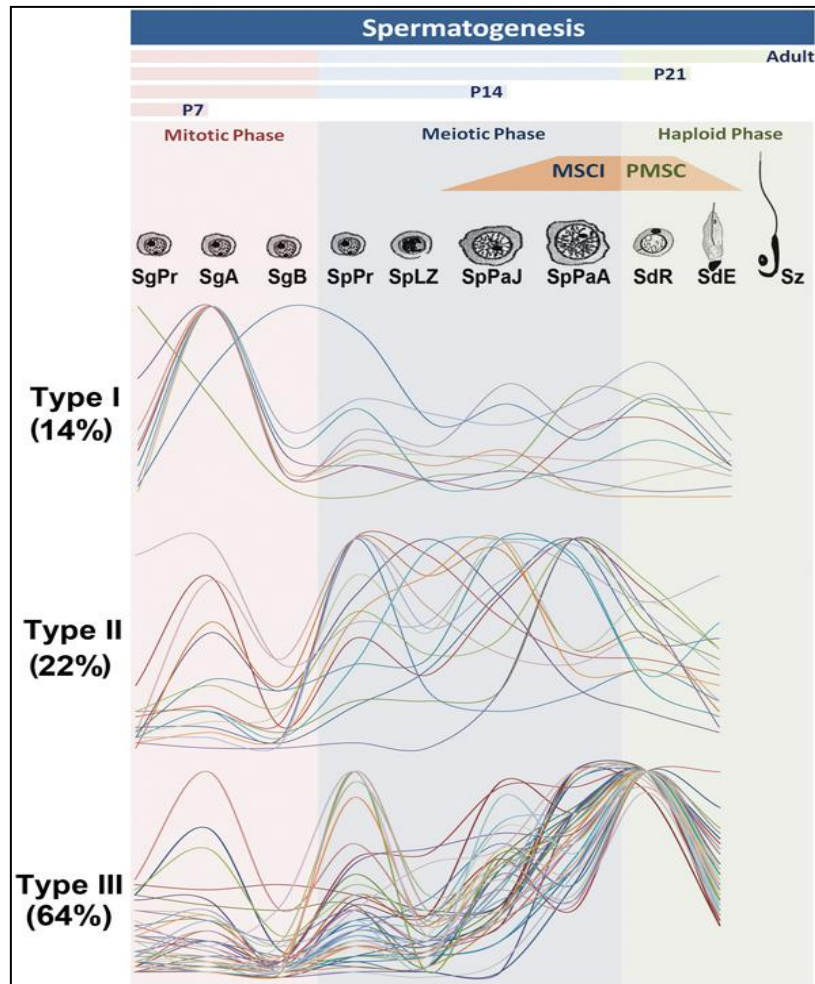
Chez les mammifères, la différenciation sexuelle est contrôlée par deux groupes de gènes qui contrôlent la détermination du sexe. SOX9 joue un rôle clé au cours du développement des testicules et ce facteur est maintenu inactif dans les gonades XX au moment critique de la détermination du sexe. Ce processus fait intervenir des miARNs. Les miARNs entraînent la répression de Sox9 au début du développement de l'ovaire. Grâce à la technologie de microarray, l'équipe de Real et al [544] a identifié 22 miARNs présentant une expression spécifique du sexe dans les gonades en développement au cours de la période critique de la détermination du sexe. Les analyses ont conduit à l'identification de miR-124 comme régulateur de l'expression du gène SOX9 dans les cellules de l'ovaire. Ces résultats fournissent la première preuve de l'implication d'un miARN dans la régulation d'un gène contrôlant le développement des gonades et la détermination du sexe. SOX9/SF1 régulent la transcription de miR-202-5p/3p pendant la différenciation des testicules, suggérant un rôle précoce de SOX9/ miR-202-5p/3p dans le développement des testicules [545]. D'autres miARNs participent à la différenciation des gonades: miR-140-3p et son brin guide miR-140-5P. L'analyse de testicule de souris nulles pour miR-140-5p/miR-140-3p a révélé une augmentation significative du nombre de cellules de Leydig [546].

## ***8.2.3 Rôle des miARNs dans spermatogénèse***

La régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm est active pendant la spermatogénèse. Les miARNs sont clairement impliqués et régulent l'expression des gènes pendant toute la durée de différenciation des cellules germinales mâles [547] (voir figure 62). Plusieurs études utilisant des puces à miARN, RT-PCR ou le séquençage de petit ARN ont identifié les miARNs qui sont exprimées exclusivement ou préférentiellement dans les testicules et à les phases spécifiques de différenciation des cellules germinales mâles [548, 549]. Ces études ont montré une expression de manière différentielle des miARNs entre testicules immatures et matures de souris [550]. Puisque 19 miARNs sont exprimés différemment entre les testicules immatures et matures.

De plus, il existe des profils de populations des miARNs spécifiques de gonocytes et spermatogonies [429] et des profils de miARNs au cours de la première vague de spermatogénèse en [551]. Les profils de populations de miARNs identifiés aussi enrichies de cellules souches, les cellules pré-méiotiques méiotique [552] ou spermatogonies,

spermatocytes et spermatozoïdes [553]. Ces types de cellules semblent exprimer plusieurs miARNs communs, mais aussi certains miARNs qui sont spécifiques de certains types cellulaires.



**Figure 62.** Trois groupes miARNs regroupés en fonction de leurs profils d'expression au cours de la spermatogenèse. Type I: les miARNs exprimés dans les spermatogonies préméiotiques puis leur expression diminuent dans les spermatocytes et spermatozoïdes, ce qui indique qu'ils sont soumis à MSCI et EMSP. Type II: les miARNs liées à l'X montrent une expression accrue dans les spermatocytes indiquant l'évasion de MSCI, suivie par une diminution de leur expression dans les spermatozoïdes indiquant qu'ils sont soumis à EMSP. Type III: les miARNs liées à l'X affichent une expression élevée dans les spermatocytes et les spermatozoïdes indiquant que ces miARNs s'échappent à la fois à MSCI et à EMSP. **SGPr**, spermatogonies primitives type A; **SGA**, spermatogonies type A; **SGB**, spermatogonies de type B; **spPr**, spermatocytes préleptotène; **SpLZ**, leptotène et spermatocytes Zygotène; **SpPaJ**, spermatocytes pachytènes à jour 18 postnatal; **SpPaA**, spermatocytes pachytènes de souris adultes; **SdR**, spermatozoïdes ronds; **SdE**, spermatozoïdes allongés; **Sz**, les spermatozoïdes; **MSCI**, Meiotic sex chromosome inactivation; **PMSC**, postmeiotic sex chromatin. D'après [547].

Curieusement, chez les mammifères, la densité de gènes de miARNs est nettement plus élevée sur le chromosome X que sur les autosomes. Ceci pourrait être lié à l'organisation sous forme de cluster des gènes de miARNs [554]. En effet, le séquençage de l'ARN de spermatocytes et spermatides en comparaison de cellules somatiques a révélé que les miARNs localisés sur le chromosome X ont des niveaux d'expression plus élevés que toutes les autres catégories de miARNs dans les cellules germinales mâles.

L'étude des fonctions des miARNs et l'identification de leurs cibles spécifiques au cours de la spermatogenèse a explosé ces dernières années.

### **8.2.3.1 Dans les spermatogonies**

Par exemple le miR-146 est fortement exprimé dans les spermatogonies indifférenciées. Le miR-146 module leur état indifférencié, un processus dépendant de signalisation de l'acide rétinoïque [555]. En effet, le niveau de transcription de mir-146 est diminué de près de 180 fois dans les spermatogonies différenciés par rapport à les spermatogonies indifférenciés. Parmi les cibles directes de mir-146 sont Med1 (mediator complex subunit 1) et les co-régulateurs de récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR et RXR). La surexpression de mir-146 dans les spermatogonies indifférenciées inhibe l'oncogène Kit. Inversement, l'inhibition de miR-146 augmente le niveau de Kit. Dans les spermatogonies indifférenciées traitées avec l'acide rétinoïque, le miR-146 est réprimé, ainsi que les marqueurs des cellules germinales indifférenciées: zinc finger and BTB domain containing 16 (Zbtb16 appelé aussi Plzf) alors que l'expression de Kit est augmenté. Dans les spermatogonies traitées avec l'acide rétinoïque, la surexpression de Kit stimulée par Stra8 (retinoic acid gene 8) et Sohlh2 (spermatogenesis- and oogenesis-specific basic helix-loop-helix 2) est inhibée par la surexpression de miR-146.

D'autres miARNs du chromosome X sont impliqués dans la régulation de l'état indifférencié des spermatogonies et sont sous le contrôle de l'acide rétinoïque. En effet, l'inhibition de miR-221 et miR-222, chez la souris induit la différenciation des spermatogonies, ceci est lié à la surexpression de Kit [556].

Les miARNs de cluster-17-92 (appelé aussi Mirc1) et son cluster paralogue 106b-25 (appelé aussi Mirc3) sont régulés négativement par l'acide rétinoïque au cours de la différenciation des spermatogonies, à la fois *in vitro* et *in vivo* [557]. En effet, la répression de ces clusters par l'acide rétinoïque entraîne l'augmentation de l'expression de Bim, Kit, SOCS3 et Stat3.



L'invalidation de cluster *Mirc1* dans les cellules germinales mâles donne un phénotype avec petits testicules, une diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme et des défauts légers de la spermatogenèse. L'ablation de *Mirc1* dans les cellules germinales mâles augmente l'expression des miARNs de *Mirc3* dans ces cellules. Ces données suggèrent une coopération fonctionnelle entre ces deux clusters pour réguler le développement des spermatogonies [557].

Le séquençage à haut débit a permis d'identifier le miR-21, miR-34c, miR-182, miR-183 et miR-146a, comme étant préférentiellement exprimés dans les cellules germinales. Il a été proposé que l'inhibition transitoire de miR-21 dans les cultures germinales (spermatogonie) entraîne la diminution de leur nombre et l'apoptose de ces cellules, ce qui indique que miR-21 est important pour le maintien de la population de spermatogonies [558].

### **8.2.3.2 *Dans les spermatocytes/ spermatides***

Les miARNs ont aussi un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes des cellules méiotiques et postméiotiques. Par exemple, le miR-34c est fortement exprimé dans les spermatocytes et spermatides rondes [559, 560]. L'inhibition de miR-34c dans les spermatocytes primaires semble empêcher l'apoptose de ces cellules, induite par la privation de la testostérone. La surexpression de miR-34c dans les cellules germinales entraîne la diminution de l'expression de sa cible ATF1 (Activating transcription factor 1) et l'apoptose de ces cellules [560].

Les clusters de miR-449 et le cluster miR-34 sont préférentiellement exprimés dans les testicules murins avec une expression majoritaire dans les spermatocytes et dans les spermatides [561]. Le cluster de miR-449 est sous le contrôle de deux facteurs de transcription CREMt (cAMP-responsive element modulator t) et SOX5. Il a été suggéré aussi que les miR-449s et le cluster 34b/c partagent les mêmes cibles: la voie E2F-pRb. Ce qui peut expliquer que le KO de cluster 449 ne donne pas un phénotype visible par redondance d'activité avec cluster 34b/c.

L'ARNm de TP2 (transition protein 2) et Prm2 sont les cibles de miARN spécifique du testicule: miR-469. En effet, le miR-469 inhibe la traduction de l'ARNm de TP2 et de Prm2 dans spermatocytes pachytènes et dans les spermatides rondes, ceci entraîne l'échec de l'élongation de spermatides [562].

Le miR-122a qui est spécifique de cellules germinales mâles peut également cibler l'ARNm de TP2 et entraîne son clivage [563].

Une autre étude a montré que l'oncomir miR-18a qui appartient au cluster miR-17-92 cible directement le facteur de choc thermique 2 (HSF2), un facteur de transcription essentiel à différents processus de développement, y compris la spermatogenèse [310]. Les expressions de HSF2 et miR-18 présentent une corrélation inverse au cours de la spermatogenèse et l'inhibition de miR-18 entraîne l'augmentation de l'expression de protéine HSF2 et l'expression de gènes cibles d'HSF2.

### 8.2.3.3 Dans les spermatozoïdes

Malgré l'état transcriptionnelle inactif des spermatozoïdes matures, leur noyau contient une population de microARNs qui peuvent avoir un rôle dans le développement précoce de l'embryon [549, 564]. Par exemple, le miR-34c est présent dans les spermatozoïdes matures et dans le zygote. MiR-34c semble être important pour la première division cellulaire du zygote via la modulation de l'expression de Bcl-2 [565]. D'autres exemples de rôle de miARNs dans la spermatogénèse sont mentionnés dans le tableau ci-dessous (tableau 15):

Name	Expression	Proposed function	Predicted and confirmed targets involved in spermatogenesis	Reference
Let-7 family	Male PGC's, Female oocytes, highly expressed in the testis	Differentiation into mature gametes, tumour suppressors	<b>LIN28</b>	Dyce et al. (2010), Luo et al. (2010), Zhong et al. (2010)
Let-7e	Down-regulated in mature mouse and porcine testis	Tumour suppressor	NR6A1, TAF5, FASL, EIF4G2, SUV39H2, DZIP1, DDX19B, <b>MYCN</b>	Yan et al. (2007), Luo et al. (2010), Buechner et al. (2011)
miR-10a	Enriched in the spermatogonial cell population compared with somatic cells of day 6 testis	Cellular differentiation	<b>NCOR2</b>	Foley et al. (2011), Niu et al. (2011)
miR-100	In day 7–10 mouse testis	Tumour suppressor, ovarian cancer	FRAP1/mTOR	Buchold et al. (2010), Nagaraja et al. (2010)
miR-122a	Up-regulated in mature mouse testis	Later stage germ cell maturation	<b>TNP2</b>	Yu et al. (2005)
miR-124a	Up-regulated in mature rhesus monkey testis, ES cells	Suppression of cell migration, pluripotency	QKI, MYO10, SP3, MITF, FGGR2, CDK4, KLF4, <b>SLUG, IQGAPI, ITGB1</b>	Yan et al. (2009), Lee et al. (2010), Hunt et al. (2011)
miR-125a	Later male PGC's	Control of differentiation	<b>LIN28</b>	Hayashi et al. (2008), Zhong et al. (2010)
miR-127	Down-regulated in mature mouse testis	Lung development	BRD2	Yan et al. (2007), Bhaskaran et al. (2009)
miR-141	Early PGC's, up-regulated from day 7 to day 14 in mouse testis	Inhibits cell migration and invasion	<b>SIP1</b>	Hayashi et al. (2008), Buchold et al. (2010), Hu et al. (2010)
miR-154	Down-regulated in mature rhesus monkey testis	Lung development	PPP1CC, PCNA, AQP9, HMGA2	Williams et al. (2007), Yan et al. (2009)
miR-17-92 cluster	PGC's, ES cells, some members down-regulated in non-obstructive azoospermia	Regulator of differentiation, proliferation and apoptosis	STAT3, E2F1, PTEN (19a, 19b)	Novotny et al. (2007a, b), Hayashi et al. (2008), Lian et al. (2009), Dyce et al. (2010)
miR-18	Spermatocytes	Oncogenic	<b>HSF2</b>	Bjork et al. (2010)
miR-181b	Down-regulated in mature mouse and porcine testis	Tumour suppressor	TBPI1, RSBN1, AMD, DAZAP2, PIK3R3, RNF6, <b>BCL2</b>	Yan et al. (2007), Luo et al. (2010), Zhu et al. (2010)
miR-181c	Down-regulated in mature rhesus monkey and mouse testis	Tumour suppressor	KPNB1, NR6A1, SOX6, RAD21, CREB1, SOX5, RSBN1, AMD, TNPO1, DAZAP2, NOTCH4, KRAS	Yan et al. (2007), Yan et al. (2009), Hashimoto et al. (2010)
miR-181d	Down-regulated in mature rhesus monkey testis	Drug resistance, regulation of apoptosis	TIMP3, RNF6, KPNB1, <b>BCL2</b>	Yan et al. (2009), Zhu et al. (2010)
miR-184	Highly expressed in GCI cells, Enriched in the spermatogonial cell population compared with somatic cells of day 6 testis, preferentially expressed in late stage spermatocytes and spermatids	Tumour suppressor	<b>AKT2</b>	Marcon et al. (2008), Foley et al. (2010), Niu et al. (2011), Teng et al. (2011)
miR-185	Preferentially expressed in pachytene spermatocytes	Tumour suppressor, cell cycle regulator	<b>RHOA, CDC42</b>	Marcon et al. (2008), Liu et al. (2011a, b, c)
miR-191	Highly expressed in testis, preferentially expressed in beta pachytene spermatocytes, down-regulated in teratozoospermia	Required for normal sperm morphology	Indirect regulation of Dicer1 and BNC2	Marcon et al. (2008), Grinchuk et al. (2010)
miR-191*	Up-regulated in mature rhesus monkey testis			Yan et al. (2009)
miR-200a	Early PGC's	Tumour suppressor, Inhibitor of cell invasion/migration	<b>SIRT1, ZEB2</b>	Hayashi et al. (2008), Eades et al. (2011), Wu et al. (2011)



miR-200c	Early PGC's	Tumour suppressor, Inhibitor of cell invasion/migration, control of apoptosis	<b>ZEB1, TRKB</b>	Hayashi <i>et al.</i> (2008), Radisky (2011)
miR-21	Spermatogonial stem cells	Spermatogonial self-renewal, anti-apoptosis, oncogene	<b>P12</b>	Niu <i>et al.</i> (2011), Zheng <i>et al.</i> (2011)
miR-214	Pachytene spermatocytes	Potential role in meiosis	WDTCI	Marcon <i>et al.</i> (2008)
miR-214	Down-regulated in mature mouse testis	Cell survival, cell migration and invasion	HSPD1, TEX27, ADCYAP1R1, HBP1, APIG1, SSR1, <b>PTEN, AP-2Y, ITGA3</b>	Yan <i>et al.</i> (2007), Yang <i>et al.</i> (2008), Bar-Eli (2011)
miR-22	Up-regulated in sheep fetal testis development from D42 to D75	Regulation of estrogen signalling	ESR1	Torley <i>et al.</i> (2011)
miR-24	Pachytene spermatocytes	Potential role in meiosis	MBD6, H2AX	Marcon <i>et al.</i> (2008)
miR-27b	Down-regulated in sheep fetal testis development from D42 to D75	Cell differentiation (cardiac and adipocyte)	<b>PPARY</b>	Karbiener <i>et al.</i> (2009), Busk and Cirera (2010), Torley <i>et al.</i> (2011)
mir-290-295 cluster	PGC's, ES cells	G1 to S phase cell cycle control	<b>WEE1, FBXL5</b>	Hayashi <i>et al.</i> (2008), Dyce <i>et al.</i> (2010), Lichner <i>et al.</i> (2011)
miR-296	Up-regulated in mature rhesus monkey testis	Tumour suppressor, cell motility repressor	NCALD, <b>SCRIB</b>	Yan <i>et al.</i> (2009), Vaira <i>et al.</i> (2011)
miR-29b	Up-regulated in mature mouse testis	Oncogene, represses apoptosis promotes cell motility	CREB5, BAK1, USP42, MLF1, HBP1, SNX24, <b>PTEN</b>	Yan <i>et al.</i> (2007), Wang <i>et al.</i> (2011a, b)
miR-30a	down-regulated in non-obstructive azoospermia	Tumour suppressor, inhibits metastasis	<b>SNAIL</b>	Lian <i>et al.</i> (2009), Kumarswamy <i>et al.</i> (2011)
miR-30e	Up-regulated in sheep fetal testis development from D42 to D75	Tumour marker		Yang <i>et al.</i> (2010), Torley <i>et al.</i> (2011)
miR-302-367 cluster	PGC's, ES cells	Transcription, cell growth and metabolism, maintenance of pluripotency	<b>NR2F2</b>	Hayashi <i>et al.</i> (2008), Dyce <i>et al.</i> (2010), Rosa and Brivanlou (2011)
miR-31	Enriched in the spermatogonial cell population compared with somatic cells of day 6 testis	Promotes cell migration and invasion	<b>TIAMI</b>	Cottonham <i>et al.</i> (2010), Niu <i>et al.</i> (2011)
miR-320	Spermatogonia, beta Pachytene and spermatids	Adhesions between Sertoli and germ cells	Protocadherin family	Marcon <i>et al.</i> (2008)
miR-323	Early PGC's	Inhibits H1N1 virus replication	<b>PBI</b>	Hayashi <i>et al.</i> (2008), Song <i>et al.</i> (2010)
miR-335	Down-regulated in mature mouse testis	Maintenance of pluripotency in mesenchymal stem cells	CCNT2, CCD2, RSNB1, <b>RUNX2</b>	Yan <i>et al.</i> (2007), Tome <i>et al.</i> (2011)
miR-337	Down-regulated in mature mouse testis		TBX, APIG1, TAF5, TAF12, CREB1, CCN1	Yan <i>et al.</i> (2007)
miR-34a	Up-regulated in mature mouse testis, up-regulated from day 7 to day 14 in mouse testis	Repression of cell proliferation, Inducer of apoptosis	CCND2, BLC2, GMFB, <b>SIRTI</b>	Yan <i>et al.</i> (2007), Buchold <i>et al.</i> (2010), Ito <i>et al.</i> (2010)
miR-34b	Up-regulated in mature rhesus monkey testis, up-regulated from day 7 to day 14 in mouse testis	Tumour suppressor, promotes apoptosis, cell cycle arrest and senescence	NOTCH1, LGR4, VEZT, MAN2A2, FOXJ2	Yan <i>et al.</i> (2009), Buchold <i>et al.</i> (2010), Vogt <i>et al.</i> (2011)
miR-34c	Pachytene spermatocytes and round spermatids, up-regulated in mature rhesus monkey and mouse testis, up-regulated from day 7 to day 14 in mouse testis	Cell cycle regulator, enhancement of germ cell characteristics	CCND3, CCNG1, CCNB1, CCNE1, CDK4, CDK6, E2F5, FOS, CDC2, <b>TGIF2, NOTCH2, STRBP</b> , LGR4, KITLG, SPAG4, CCN1, ZFP148, GMFB	Yan <i>et al.</i> (2007), Yan <i>et al.</i> (2009), Bouhallier <i>et al.</i> (2010), Buchold <i>et al.</i> (2010)
miR-361	Down-regulated in mature mouse testis		KPNB1, ZFP148, BMPR2, CALM2	Yan <i>et al.</i> (2007)
miR-375	Up-regulated from day 7 to day 14 in mouse testis, enriched in the spermatogonial cell population compared with somatic cells of day 6 testis, Highly expressed in newborn epididymis	Tumour suppressor, inhibits metastasis	<b>IGRIR</b>	Buchold <i>et al.</i> (2010), Zhang <i>et al.</i> (2010), Kong <i>et al.</i> (2011), Niu <i>et al.</i> (2011)
miR-376a	Down-regulated in mature mouse testis	Maintenance of pluripotency, and cell cycle arrest	<b>CDK2, AGO2</b>	Yan <i>et al.</i> (2007), Wang <i>et al.</i> (2011a, b)
miR-379	Down-regulated in mature mouse testis	Membrane transport	EIF4G2, EDN1, RNF6, <b>ABCC2</b>	Yan <i>et al.</i> (2007), Haenisch <i>et al.</i> (2011)
miR-411	Down-regulated in mature mouse testis		USP42	Yan <i>et al.</i> (2007)
miR-434-5p	Down-regulated in mature mouse testis			Yan <i>et al.</i> (2007)
miR-449	Up-regulated in mature rhesus monkey and mouse testis, up-regulated from day 7 to day 14 in mouse testis (449a and c)	Differentiation of ciliated cell progenitors	MECP2, ASB1, BCL2, <b>NOTCH1</b> , CASP2, KITLG, VCL, FOXJ2, INHBB, SOX11, CCNE2, GMFB, <b>DLLI</b>	Yan <i>et al.</i> (2007), Yan <i>et al.</i> (2009), Buchold <i>et al.</i> (2010), Marcet <i>et al.</i> (2011)
miR-487b	Down-regulated in mature rhesus monkey testis			Yan <i>et al.</i> (2009)
miR-509-3	Expressed in human testis			Novotny <i>et al.</i> (2007a, b)
miR-557	Up-regulated in mature rhesus monkey testis		EIF4G2, STAG2, VCP	Yan <i>et al.</i> (2009)
miR-702	Up-regulated in mature rhesus monkey testis		SBF1, MMP14	Yan <i>et al.</i> (2009)
miR-709	Male and female germ line, up-regulated in mature rhesus monkey and porcine testis	DNA methylation control	<b>BORIS</b>	Tamminga <i>et al.</i> (2008), Yan <i>et al.</i> (2009), Luo <i>et al.</i> (2010)
miR-714	Up-regulated in mature rhesus monkey testis			Yan <i>et al.</i> (2009)
miR-715	Up-regulated in mature rhesus monkey testis		KPNB1	Yan <i>et al.</i> (2009)
miR-9	Later male PGC's, up-regulated from day 7 to day 14 in mouse testis	Control of differentiation	<b>LIN28</b>	Hayashi <i>et al.</i> (2008), Buchold <i>et al.</i> (2010), Zhong <i>et al.</i> (2010)
miR-99a	Enriched in the spermatogonial cell population compared with somatic cells of day 6 testis, down-regulated in cisplatin resistant germ cell tumour cell lines	Tumour suppressor	<b>FRAP1/mTOR, SMARCA5, SMARCD1</b>	Niu <i>et al.</i> (2011), Port <i>et al.</i> (2011), Sun <i>et al.</i> (2011)

**Tableau 15.** Caractérisation fonctionnelle des miARN dans spermatogénèse. D'après [549].

## 8.3 MiARNs et cancer du testicule

Le cancer du testicule est maintenant reconnu comme le cancer le plus fréquent chez les jeunes hommes. Ces cancers se développent à partir de lésion de carcinome pré-invasif in situ (CIS), probablement à la suite d'un dysfonctionnement des précurseurs (les

cellules germinales) ou gonocytes qui n'ont pas réussi à se différencier avec succès en spermatogonies. Il est donc essentiel de comprendre la transition cellulaire de gonocytes en spermatogonies, afin d'acquérir une meilleure compréhension de l'étiologie des tumeurs des cellules germinales testiculaires.

Plusieurs études ont montré l'implication de Dicer1, enzyme de la biogénèse de miARNs dans différents types de cancer. Plusieurs mutations germinales dans le gène Dicer1 ont été identifiées chez les patients atteints de blastoma pleuro-pulmonaire [566], elle souvent associée à un goitre et des tumeurs à cellules de Sertoli-Leydig. Une mutation au niveau du domaine IIIb de Dicer1 est responsable de la diminution de son activité ARNase [567]. Elle a été trouvée dans < 1% de 96 échantillons de tumeur de cellule germinale testiculaire (TCGT). Mais, il semble que la mutation de Dicer1 a un rôle très réduit dans l'étiologie des TCGT. [568]. Un sous ensemble des miARNs des cellules germinales mâles coordonnent la différenciation et de l'entretien de la pluripotence de ces cellules [429]. Il a été proposé que sept miARNs identifiés par microarray sont exprimés de manière différentielle entre gonocytes et spermatogonies (les miARNs augmentés: miR-293, 291a-5p, 290-5p et 294 \*, les miARNs diminués: miR-136, 743a et 463 \*). Les cibles potentielles, identifiées par le logiciel de prédiction, sont impliquées dans le développement des cellules germinales tels que le gène PTEN, les gènes de voie de signalisation Wnt et la cycline D1. De plus, d'autres travaux ont montré que plusieurs miARNs sont augmentés dans les tumeurs du testicule. Le hsa-miR-9, hsa-miR-105 et les miARNs de cluster182-183-96 sont fortement exprimés dans le séminome, tandis que l'expression des miARNs de cluster 515-526 est élevée dans le carcinome embryonnaire [569].

Dans des lignées cellulaires issues de tumeur de cellule germinale testiculaire (TCGT) : NTERA-2 (NT2) et NCCIT, le miR-302a régule négativement le p21, ce qui rend ces cellules sensibles à la mort cellulaire induite par le cisplatine [570]. Une étude récente a montré que l'expression de hsa-miR-21, hsa-miR-221 et hsa-miR-222 est augmenté dans le séminome par rapport à tissu testiculaire normal. Ce travail prouve que les miARNs dans les échantillons chirurgicaux fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) sont bien conservés, et que les FFPEs peuvent être une source précieuse pour l'étude des miARNs dans le séminome [571]. Plusieurs rapports ont mis en évidence le rôle d'autres miARNs dans le cancer de testicule sont mentionnés dans le tableau 16.

miRNA name	Expression	Function	Predicted and confirmed targets	Reference
miR-133b	Teratoma	Tumour suppressor	POU4F1, MEIS2, <b>FSCN1</b>	Gillis <i>et al.</i> (2007), Kano <i>et al.</i> (2010)
miR-140	Teratoma	Skeletal development, and cartilage maintenance	BCL11A, SOX4, <b>CXCL12</b>	Gillis <i>et al.</i> (2007), Nicolas <i>et al.</i> (2008), Miyaki <i>et al.</i> (2010)
miR-145	Down-regulated in seminoma and embryonal carcinoma, down-regulated in non-obstructive azoospermia, down-regulated in cisplatin resistant germ cell tumour cell lines	Represses pluripotency, tumour suppressor	PLAGL2, E2F3, SOX9, <b>OCT4, SOS2, KLF4, FSCN1</b>	Gillis <i>et al.</i> (2007), Lian <i>et al.</i> (2009), Xu <i>et al.</i> (2009), Kano <i>et al.</i> (2010), Port <i>et al.</i> (2011)
miR-152N	Teratoma			Gillis <i>et al.</i> (2007)
miR-200c	Seminoma	Tumour suppressor, Inhibitor of cell invasion/migration, control of apoptosis	<b>ZEB1, TRKB</b>	Gillis <i>et al.</i> (2007), Radisky (2011)
miR-302 Cluster	Overexpressed in adult (undifferentiated) and paediatric germ cell tumours	Maintenance of pluripotency	<b>NR2F2</b>	Gillis <i>et al.</i> (2007), Lian <i>et al.</i> (2009), Palmer <i>et al.</i> (2010), Murray <i>et al.</i> (2010), Rosa and Brivanlou (2011)
miR-302d	Seminoma, embryonal carcinoma, up-regulated in yolk sack tumours	Oncogene, suppressor of apoptosis	LATS2, LEFTY1, MLL3, DAZAP2, TNFAIP1, BCL11B, PLAG1	Gillis <i>et al.</i> (2007), Murray <i>et al.</i> (2010)
miR-34aN	Teratoma			Gillis <i>et al.</i> (2007)
miR-367	Embryonal carcinoma, ES cells	Pluripotency, regulation of gene transcription	LATS2, KLF4, RUNX1, SYNJ1, SMAD6	Gillis <i>et al.</i> (2007); Li <i>et al.</i> (2009a, b)
miR-371-373 cluster	Seminoma, embryonal carcinoma, overexpressed in malignant paediatric germ cell tumours, down-regulated in non-obstructive azoospermia, up-regulated in cisplatin resistant germ cell tumour cell lines	Inhibits apoptosis	ZIC4, <b>LATS2</b> , LEFTY1, DAZAP2, TNFAIP1, PLAG2, MLL3,	Voorhoeve <i>et al.</i> (2006), Gillis <i>et al.</i> (2007), Lian <i>et al.</i> (2009), Port <i>et al.</i> (2011)

**Tableau 16.** Caractérisation fonctionnelle des miARN dérégulés dans le cancer du testicule.

D'après [549]



# ***9. Les miARNs sont-ils de nouveaux biomarqueurs et/ou cibles thérapeutiques?***

## ***9.1 Généralités***

### ***9.1.1 Les caractéristiques d'un biomarqueur***

Le biomarqueur idéal doit être: **I)** accessible en utilisant des protocoles non invasif **II)** peu coûteux à quantifier **III)** spécifiques de la maladie d'intérêt **IV)** le modèle utilisé doit traduire l'état physiologique chez l'homme **v)** une indication fiable et précoce de la maladie avant que les symptômes cliniques apparaissent.

La plupart des biomarqueurs actuels sont des protéines. La complexité de la composition des protéines dans la plupart des échantillons biologiques (notamment le sang), les modifications post-traductionnelles qui les touchent, la faible abondance de beaucoup de protéines d'intérêt dans le sérum et le plasma et la difficulté de développer de manière fiable des agents de capture à haute affinité appropriés rendent parfois difficile leur utilisation. Ces subtilités font de la découverte et du développement de nouveaux biomarqueurs à base de protéines avec une bonne spécificité et sensibilité du diagnostic une tâche coûteuse, longue et difficile.

### ***9.1.2 Les avantages des miARNs***

Les miARNs extracellulaires représentent de bons candidats de biomarqueurs non invasifs. En effet: **I)** leur détection est simple et des méthodes pour leur amplification faciles **II)** les profils d'expression tissulaire est restreinte **III)** la conservation de séquence entre humains et modèles expérimentaux rend la recherche plus aisée **IV)** La complexité structurale et la modification post-transcriptionnelle des miARNs sont faibles **VI)** ils ont une bonne stabilité dans les fluides biologiques **VII)** ils sont protégés vis-à-vis des ribonucléases endogènes grâce à leur petite taille mais aussi grâce à l'interaction avec plusieurs protéines et organites qui permet leur transport.

### 9.1.3 Les limites d'utilisation des miARNs

Plusieurs équipes ont cherché à caractériser le profil d'expression des miARNs dans les pathologies, par diverses méthodes. La variabilité des résultats montre bien qu'il est difficile d'établir un profil miARNs unique, pour une pathologie donnée, sans compter les problèmes liés aux méthodes employées. De nombreuses méthodes d'analyse de l'expression des miARNs dans liquides biologiques existent: puces à miARN, clonage et séquençage des petits ARNs, la RT-PCR quantitative en temps réel... Par exemple, l'utilisation des puces avec hybridation sur des sondes oligonucleotidiques, plusieurs différences ont été observé avec les puces mesurant l'expression des miARNs. Tout d'abord, la normalisation de l'expression se fait généralement par rapport a l'expression médiane de toute la puce, ce qui, compte-tenu du faible nombre de miARNs testés (quelques centaines) et du faible nombre parmi ceux-ci qui s'expriment significativement, n'est pas approprié. De plus, la petite taille des miRNAs (20-22 nt) pose plusieurs problèmes, dont celui de la spécificité de l'appariement, car de nombreux de miARNs différent seulement d'un ou deux nucléotides. Cette petite taille pose également un problème de température d'hybridation (Tm) qui varie beaucoup en fonction de la composition en bases. Dans le cas des ARNm, leur longueur permet de choisir pour les sondes de la puce des régions spécifiques et dont la composition en base va être homogène pour avoir le même Tm pour toute la puce. La taille des miARNs ne laisse pas cette liberté et peut avoir pour conséquence que certains s'hybrident mieux que d'autres.

L'ensemble de ces travaux n'a permis de révéler que quelques miARNs retrouvés dans les différentes études et de multiples discordances quant à l'expression de la majorité d'entre eux. La variabilité des résultats montre bien qu'il est difficile d'établir un profil en miARNs unique, pour une pathologie donnée. Dans ce contexte, nous avons concentré ce paragraphe sur les miARNs: miR-29, miR-18, miR-101, miR-130 (Table 17).

Maladie	miARNs altérés	liquide	Réf
cancer colorectal	<b>miR-29a</b> , miR-92a	plasma	[572]
cancer colorectal	<b>miR-29a</b> , <b>miR18a</b> , miR19a, miR19b, miR15b, miR335	sérum	[573]
cancer colorectal	<b>miR-29a</b> , <b>miR-18a</b> , miR -20a, miR -21, miR -92a, miR -106b, miR -133a, miR -143, miR -145	plasma	[574]
cancer colorectal phase III	<b>miR- 29a</b> , <b>miR- 18a</b>	sérum	[575]

cancer colorectal	<b>miR-29a</b> , miR-17-3p, miR-92a, miR-135b	sérum	[576]
cancer colorectal	miR -221	plasma	[577]
cancer colorectal	miR-92	plasma	[578]
cancer du côlon	miR -141	plasma	[579]
inflammation de l'intestin	<b>miR-29a</b> , miR-16, miR-23a, miR-106a, miR-107, miR-126, miR-191, miR-199a-5p, miR-200c, miR-362-3p, miR-532-3p	plasma	[580]
métastases hépatiques d'origine colorectale	<b>miR-29a</b> , miR-92	sérum	[581]
cancer buccal	<b>miR-29a</b> , miR-16, let-7b, miR-338-3p, miR-223	sérum	[582]
carcinome du nasopharynx	<b>miR-29c</b> , miR-17, miR-20a, miR-223	sérum	[583]
cancer du poumon	<b>miR-29a</b> , miR-24, miR-26a, miR-30d	épanchement maligne	[584]
	<b>miR-29b-1-5p, miR-29b-2-5p</b>	liquide péritonéal et séminal	[585]
adénocarcinome du poumon	<b>miR- 29b</b> , miR- 142- 3p	sérum	[586]
l'hypertension artérielle pulmonaire	<b>miR-130a</b> , miR-451, miR-1246, miR-23b, miR-191	plasma	[587]
cancer gastrique	mir-125b, mir-199a, mir-100, let-7 g, mir-433, mir-214	muqueuse	[588]
cancer pancréatique	<b>mir-18a</b>	Plasma	[589]
Le psoriasis	<b>miR-29a</b> , miR-19	sérum	[590]
mélanome métastatique	<b>miR-29c</b> et miR-324-3p	sérum	[591]
cancer de la prostate	<b>miR-29a, miR-101</b> , miR-141	plasma	[592]
cancer de la prostate	miR-375, miR-141	plasma	[593]
Le trastuzumab (traitement de cancer de sein)	<b>miR-29a</b> , miR -210, miR -21, miR -126	plasma	[594]
la leucémie lymphoïde chronique	<b>miR-29a</b> , miR-150, miR-150 *, miR-135a *	plasma	[595]
Pré-éclampsie (toxémie gravidique)	<b>miR-29a</b> , let-7d, let-7f, miR-223	sérum	[596]
	miR-29a, miR-29b, miR-137, miR-181c, miR-9		[597]
malformations cardiaques congénitales du fœtus	<b>miR-29c</b> , miR-19b, miR-22, miR-375	sérum	[598]
l'insuffisance cardiaque	<b>miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-101</b> , miR-423-5p, miR-320a, miR-22, miR-92b	sérum	[599]
anévrisme de l'aorte	<b>miR-29a</b> , miR-1, miR-21, miR-133a,	plasma	[600]



thoracique	miR-143, miR- 145		
infarctus aigu du myocarde	<b>miR-101</b> , miR-16, miR-27a, miR-150	plasma	[601]
syndrome métabolique	<b>miR- 130a</b> , miR -197, miR -23a et miR -509- 5P, miR- 195, miR- 27a, miR- 320a	plasma	[602]
diabète de type 1	<b>miR-29a</b> , miR-152, miR-30a-5p, miR-181a, miR-24, miR-148a, miR-210, miR-27a, miR-26a, miR-27b, miR-25, miR-200a	sérum	[603]
diabète de type 2	<b>miR-29b</b> , miR-15a, miR-126, miR-223, miR-28-3p	plasma	[604]
maladie coronarienne	<b>miR-130a</b> , miR-126, miR-221, miR-222 et miR-92a	plasma	[605]

*Tableau 17. Exemples de miARNs circulants associés à différentes pathologies humaines.*

## **9.2 Utilisation des miARNs dans la toxicologie**

Plusieurs études ont montré le potentiel et les applications des miARNs pour les études toxicologiques. En effet, l'expression des miARNs dépend de l'environnement et est modifiée après exposition à des produits chimiques toxiques ou à des composés naturels, le stress, le tabac, les hormones, les médicaments et les régimes alimentaires (voir tableau 18). Les miARNs apparaissent comme des acteurs clés dans la régulation des gènes impliqués dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion.

En outre, les miARNs pourraient moduler l'action des récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription activés par des ligands qui régulent l'expression des gènes cibles en se liant à leurs promoteurs. Le récepteur de l'estrogène ESR1 est parmi les récepteurs nucléaires régulés par les miARNs. En effet, ESR1 est la cible de miR -206 [606], miR -221, miR -222 [607] et miR -22 [608]. Inversement, les miARNs peuvent aussi être régulés par les récepteurs nucléaires au niveau transcriptionnel et pendant leur maturation [609]. Certains auteurs ont souligné le rôle potentiel de ces miARNs dans les thérapies utilisant un anti-œstrogène.

Dans les testicules de souris, miR-184 cible le récepteur nucléaire corepressor 2 (Ncor2) et régule la spermatogenèse chez les mammifères [610].



D'autres protéines/enzymes importantes pour le métabolisme des xénobiotiques sont des cibles des miARNs. Les enzymes comportant le cytochrome P450 sont importantes, car elles catalysent le métabolisme des xénobiotiques y compris les médicaments, les produits chimiques de l'environnement, et des substances cancérigènes. En effet, les différentes iso-enzymes du cytochrome P450 (CYP) sont ciblées par plusieurs miARNs [611]. Par exemple, CYP1A1/1A2 est régulé par miR-142-3p et miR-200a, CYP2C19 par miR-34a, CYP2D6 par let-7b et CYP2E1 par miR-10a et let-7g [612].

Les miARNs sont non seulement impliqués dans les effets induits par une exposition aiguë, mais aussi une toxicité chronique. Dans le testicule de rat, notre équipe a récemment montré qu'une exposition néonatale au benzoate d'œstradiol induit la mort de cellules germinales à l'âge adulte [578]. Ce phénomène est lié à l'augmentation des niveaux de miR-29 qui cible les méthyltransférases de l'ADN et la protéine anti-apoptotique MCL-1. L'inhibition de ces protéines conduit à la surexpression de rétrotransposons et à la stimulation de l'apoptose de cellules germinales.

Chez la progéniture de rats gestantes soumises au régime riche en matières grasses, on observe des altérations dans l'expression hépatique de l'Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) et plusieurs miARNs hépatiques: miR-709, miR-122, miR-192, miR-194, miR-26a, let-7a, let7b, let-7c, miR-494 et miR-483 \* [613].

Un autre exemple est représenté par l'exposition à la fumée de cigarette. Deux des constituants de la fumée de cigarette, le benzo [a] pyrène et la nicotine, induisent des phénotypes de toxicité développementale. En effet, cette toxicité de la fumée de cigarette pourrait être liée aux modifications d'expression de miARNs: miR-340, miR-365, et miR-129-3p dans les spermatozoïdes des hommes fumeurs. Les miARNs altérés sont potentiellement impliqués dans des voies vitales pour le sperme sain et le développement normal de l'embryon, ainsi que la mort cellulaire par l'apoptose [614].

De plus, les miARNs pourraient avoir une expression spécifique de tissu. Par exemple, le miR-195 et le miR-200c sont exprimés spécifiquement dans les poumons de rat [615]. Dans quelques domaines de recherche tels que hépatotoxicité ou la cardiologie, les miARNs spécifiques mis en évidence ont été identifiés comme des marqueurs spécifiques de lésion tissulaire. En effet, le miR-208 est décrit comme un myomiR car des niveaux élevés sont observés dans le tissu cardiaque. L'expression de miR-208 est dérégulée dans diverses maladies cardio-vasculaires. Il semble être utilisé comme biomarqueur sensible pour les

lésions cardiaques chez l'homme [616]. Les études d'inhibition ont conclu qu'il pourrait être une cible thérapeutique intéressante [617].

<b>Produit</b>	<b>Organe/ cellule</b>	<b>Espèce</b>	<b>miARNs altérés</b>	<b>Réf</b>
Estradiol Benzoate	Testicule	rat	miR-29a, miR-29b et miR-29c	[578]
Éthylèneglycolmonométhyléther (EGME)	Testicule	rat	miR-449a and miR-92a, miR-320, miR-134, miR-188 et miR-760-5p	[618]
Régime riche en graisse (HFD )	Spermatozoïde	souris	11 miARNs	[619]
nonylphénol (NP)	Lignée cellulaire de Sertoli TM4	souris	miR-378, miR-125a-3p, miR-20a, miR-203, miR-101a, miR-135a*, miR-199a-5p	[620]
La fumée de cigarette	spermatozoïdes	humain	miR-340, miR-365, 129-3p, 634	[614]
Testostérone + Flutamide	ovaire	brebis	miR-497, miR-15b	[621]
Bisphénol-A	ovaire	brebis	45 miARNs diminués à 65 jours et 11 diminués à 90 jours de gestation.	[622]
FSH	cellules de la granulosa		miR-29a et miR-30d	[623]
$\alpha$ -amanitine (inhibe la transcription)	ovocyte	vache	miR-21, pré-miR-21, miR-130a	[624]
Diéthylstilbestrol (DES)	oviducte	poule	miR-1615	[625]
Diéthylstilbestrol (DES)	oviducte	poule	miR-140	[626]
Progestérone 17 -bêta- estradiol	biopsies l'endomètre	humain	miR-128, miR-99a-5p, miR-196a-5p, miR-181a-5p, miR-9-5p, miR-29b-3p, miR-223-3p	[627]
Progestérone l'estradiol	l'endomètre	souris	Let-7b	[628]
Progestérone	utérus cellules myométrial	souris humaines	miR-199a-3p, miR-214	[629]
Progestérone	utérus	souris		[630]
2,3,7,8 - tétrachlorodibenzo- p- dioxine (TCDD )	embryon	poisson-zèbre	miR-451, miR-23a, miR-23b, miR-24 et miR-27e	[631]
Microcystine	embryon	poisson-	miR-430, miR-125, miR-31,	[632]

(cyanotoxine)		zèbre	miR-126	
Sulfonate de perfluorooctane (composé organique)	embryon	poisson-zèbre	39 miARNs	[633]
5-aza-2'-déoxycytidine	embryon	souris	let-7e, miR-20a, miR-21, miR-34b, mir-128b et miR-452	[634]
Bisphenol A	cellules placentaires	humain	miR-146a	[104]
6-mercaptopurine (anti-leucémique et immunosuppresseur)	placenta	rat	miR-195, miR-21, miR-29c, miR-34a, 146b, miR-144, miR-451	[635]
Hydrogène sulfuré (H2S)	placenta		miR21	[636]
o,p'-dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) bisphenol A (BPA)	MCF-7 ( lignée cellulaire de cancer du sein humain)	humain	miR-21	[637]
Fenhexamide et fludioxonil (antifongiques agricoles)	MCF-7, T47D, et MDA-MB 231	humain	miR-21, miR-125b, miR-181a	[638]
DDT et BPA	MCF-7	humain	miR-21	[637]
DES et zeranol	MCF- 7	humain	miR- 34b	[639]
RWJ67657 (inhibiteur de p38)	MCF- 7	humain	miR-200, miR-303, miR-302, miR-199 et miR-328	[640]
Tamoxifène	lignées cellulaires de cancer de l'endomètre		miR-200	[641]
DES	mammosphères		miR-9-3	[642]
Cisplatine	cellles Hela	humain	miR-1258, miR-1288, miR-21, miR-278, miR-98, miR-18	[643]
Metformine	WI -38 et BJ- 1 fibroblastes diploïdes	humaine	miR- 200a, miR- 141 ,miR429 , miR -205	[644]
Régime alimentaire riche en graisses (HFD)	Adipocytes	souris	miR-21	[645]
Acide linoléique conjugué	Adipocytes	souris	miR-103, miR-107, miR-221, miR-222, miR-143	[646]
Régime alimentaire riche en graisses (HFD)	Adipocytes	souris	miR-143	[647]
Cendres d'huile résiduelle volantes	cœur	rat	miR-1 , miR-133, miR-21, miR-24, miR-29	[648]

Doxorubicine	cœur	rat	208b, miR-216b, miR-215, miR-34c, miR-367	[649]
2,3,7,8 - tétrachlorodibenzo- p- dioxine (TCDD )	thymus	souris	miR-122 and miR-181a miR-23a, miR-18a, miR-18b, miR-31 miR-182	[650]
La fumée de cigarette	poumon	rat	let-7, miR-10, miR-26, miR-30, miR-34, miR-99, miR-122, miR-123, miR-124, miR-125, miR-140, miR-145, miR-146, miR-191, miR-192, miR-219, miR-222, miR-223 et miR-294	[651]
La fumée de cigarette	les cellules épithéliales bronchiques primaires et les cellules H1299	humain	mir-218, miR-128, miR-19b, miR199b, miR-130a et miR-106b	[652]
4 - (méthylnitrosamino) - 1 - (3-pyridyl)-1- butanone (produit cancérigène présent dans tabac)	Poumon	rat	miR-101, miR-126*, miR-199 et miR-34	[653]
Les composés organiques volatils (formaldéhyde, le benzène, le toluène et le xylène)	Poumon	souris	miR-1187, miR-125a-3p, miR-125b-5p, miR-466c-5p, miR-5105, miR-3472	[654]
vorinostat, myo-inositol, le bexarotène, la pioglitazone (chimio-prévention)	Poumon	souris	surexpression de 66 miARNs et diminution de l'expression de 79 miARNs	[655]
Printex 90 (nanoparticules de carbone noir)	Poumon	souris	miR-135b , miR-21, miR-146b	[656]
Le gaz radon	Lignée cellulaire pulmonaire BEAS2B		miR-483-3p, miR-494, miR-2115*, miR-33b, miR-1246, miR-3202, miR-18a, miR-125b, miR-17*, miR-886-3p	[657]
Trichostatine A	hépatocytes primaires	rat	miR-379, miR-143, miR-122, miR143	[658]
hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX)	Foie	souris	let-7, miR-15, -16, miR -26, miR-181, miR-10b	[659]
paracétamol ou le tétrachlorure de carbone	hépatocytes	rat	miR-298, miR -370	[660]

dioxine	hépatocytes	souris	miR-191	[661]
Tamoxifen	hépatocytes	rat	miR-17-92 cluster, miR-106a, miR-34	[662]
Acétaminophène, l'alcool allylique, isothiocyanate $\alpha$ -naphtyle, phénobarbital ou doxorubicine	Foie	rat	miR-122	[663]
Ethanol	Foie	rat	miR-21	[664]
les acides biliaires et thapsigargine	hepatocytes	mouse	miR-199a-5p	[665]
Lycopène	Foie Cellules Hepa 1-6	rat	miR-21	[666]
Isoliquiritigénine et liquiritigénine	Foie	souris	miR-122	[667]
Quercétine (anti-inflammatoires)	Foie	souris	miR-122, miR-125b	[668]
Ethanol	Foie	souris	miR-217	[669]
7,12-diméthyl ( $\alpha$ ) anthracène et N-méthyl-N-nitrosourée	le foie, la rate et les reins	souris	miR-34a, miR-155 et miR-21	[670]
Le cadmium (métal toxique et cancérigène)	lignée HepG2 cellules de carcinome hépatocellulaire	humain	la famille de let-7	[671]
hydrocarbures aromatiques polycycliques	lignée HepG2	humain	miR-181a, miR-181b, miR-181d	[672]
Antagoniste de la leptine	Hypothalamus et foie	rat	miR-10a, miR-200a, miR-409-5p, miR-125a-3p	[673]
Sulfate d'aluminium	cellules neurales humaines (lignée HN)	humain	Mir-146	[674]
Fer + Sulfate d'aluminium	cellules neurales humaines (lignée HN)	humain	miR-9, miR-128, miR-125b	[675]
hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX)	Cerveau	souris	miR-206, miR-30, miR-195	[659]
Ethanol	modèle de culture neurosphere de cortex cérébrale	souris	miR-21, miR-335, miR-9, miR-153	[676]
lithium et le valproate de sodium (stabilisateurs de	Cerveau (hippocampe)	rat	let-7b, let-7c, miR-128a, miR-24a, miR-30c, miR-	[677]

l'humeur)			34a, miR-221), miR-144	
la fluoxétine (Prozac ®)	Cerveau (hippocampe)	souris	miR-16	[678]
Acide perfluorooctane sulfonique	Cerveau	rat	miR-466b, miR-672, miR-297	[679]
Escitalopram (antidépresseur)	Sang	humain	28 miARNs augmentés et 2 miARNs diminués	[680]
4 - (méthylnitrosamino) - 1 - (3-pyridyl)-1-butanone (NNK).	Serum cancer de poumon	rat	miR-206, miR-133b	[681]
Acétaminophène	Plasma (hépatotoxicité)	souris	miR-466g, miR-466f-3p, miR-574-5p, miR-375, miR-29c, miR-148a	[682]
Irradiation par les protons $\gamma$ ou les ions $^{56}\text{Fe}$	Sang	souris	26 miARNs	[683]
Gentamicine	sang / urine urine	rat humain	miR-21, miR-155	[684]
Pollution de l'air riche en composants métalliques (chrome, le plomb, le cadmium, l'arsenic, le nickel, le manganèse)	Leucocytes	humain	Mir-222, mir-21 et Mir-146	[685]
Allyle-isothiocyanate (AITC)	macrophage	souris	miR-155	[686]
Biphényles polychlorés	Cellules mononucléaires du sang	humain	miR-191	[687]
5-fluorouracile (5-FU) (un antimétabolite)	cellules de cancer du colon		miR-19 et miR-3, miR-21, miR-200b	[688]
Garcinol + gemcitabine	cellule de cancer du pancréas		miR-21, miR-196a, miR-495, miR-605, miR-638, miR-453	[689]
Trioxyde d'arsenic	cellules de carcinome de la vessie humaines (lignée T24)		mir-19a	[690]
Arsénite de sodium	cellules lymphoblastoïdes humaines (lignée TK6)	humain	miR-222, miR-210	[691]

**Tableau 18.** Effets des médicaments, des composés naturels ou chimiques sur l'expression des miARNs.

### 9.3 Les miARNs sont des biomarqueurs circulants

Comme les ARNm, certains miARNs montrent également une distribution tissulaire restreinte, par exemple: le miR- 122 est surexprimé dans le foie, alors que miR- 124 est préférentiellement exprimé dans les tissus neurologiques [692, 693]. L'expression des miARNs cellulaires peut être en corrélation avec les différentes conditions physiopathologiques, y compris la différenciation, l'inflammation, le diabète et plusieurs types de cancers [694-699].

De nombreux rapports ont montré que certains miARNs identifiés dans les cellules et les tissus ont également été trouvés dans les liquides extracellulaires tels que le plasma, le sérum, la salive et l'urine [700-703]. L'équipe Wang K a étudié la répartition des miARNs dans les fluides corporels [585] (voir tableau 19). L'étude a été faite sur 12 liquides physiologiques chez l'homme: le plasma, la salive, les larmes, l'urine, le liquide amniotique, le colostrum, le lait maternel, la muqueuse bronchique, le liquide céphalo-rachidien, le liquide péritonéal, le liquide pleural et liquide séminal.

Le niveau et la composition des miARNs extracellulaires montrent des changements d'expression qui se corrélient bien avec les maladies ou l'environnement de cellule [576, 582, 601, 702, 703].

Ces observations suggèrent que les miARNs extracellulaires peuvent être utilisés comme biomarqueurs pour évaluer et suivre l'état physiopathologique du corps.

Sample	Median total RNA concentration, $\mu\text{g/L}$ (interquartile range)	Number of detectable miRNAs
Amniotic fluid	570 (354)	359
Breast milk	47 240 (73 180)	429
Bronchial lavage	1128 (886)	260
Cerebrospinal fluid	111 (66)	212
Colostrum	585 (NA)	386
Peritoneal fluid	775 (345)	397
Plasma	308 (104)	349
Pleural fluid	470 (190)	210
Saliva	1945 (2495)	458
Seminal fluid	17 770 (7673)	436
Tears	564 (631)	320
Urine	94 (129)	204

**Tableau 19.** La concentration de l'ARN isolé à partir de différents fluides corporels et le nombre de miARNs détectés. D'après [585].

## ***9.3.1 MiARNs biomarqueurs dans les pathologies testiculaires***

### ***9.3.1.1 Dans l'infertilité***

Le plasma séminal est une source potentielle de biomarqueurs pour de nombreux troubles du système reproducteur masculin, y compris l'infertilité masculine. Jusqu'à présent, l'identification et la caractérisation de protéines exprimées de façon différentielle dans le plasma séminal des hommes avec une spermatogenèse normale et altérée, ont montré des résultats hétérogènes [704].

La dérégulation de l'expression des miARNs est susceptible de jouer un rôle essentiel dans les processus menant à l'infertilité masculine. Lian et al ont montré dans les testicules des patients atteints d'azoospermie non obstructive la diminution de l'expression de 154 miARNs et la surexpression de 19 miARNs par rapport aux contrôles [705]. Parmi les miARNs dérégulés: miR-302a, miR-491-3p, miR-520d-3p, miR-383, ainsi que les miARNs des clusters mir-17-92 et cluster mir-371, 2, 3.

Deux ans après, Wang et al ont rapporté l'altération de 7 miARNs dans le plasma séminal des patients infertiles et ont suggéré que ces miARNs pourraient être utilisés pour le diagnostic de l'infertilité masculine [706]. En effet, 7 miARNs (miR-34c-5p, miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p, and miR-513a-5p) ont été trouvés diminués chez les patients azoospermiques et augmentés chez les patients avec une asthénozoospermie par rapport aux contrôles sains. Cette étude suggère que ces miARNs constituent des biomarqueurs plus sensibles que les autres paramètres biochimiques de plasma séminal.

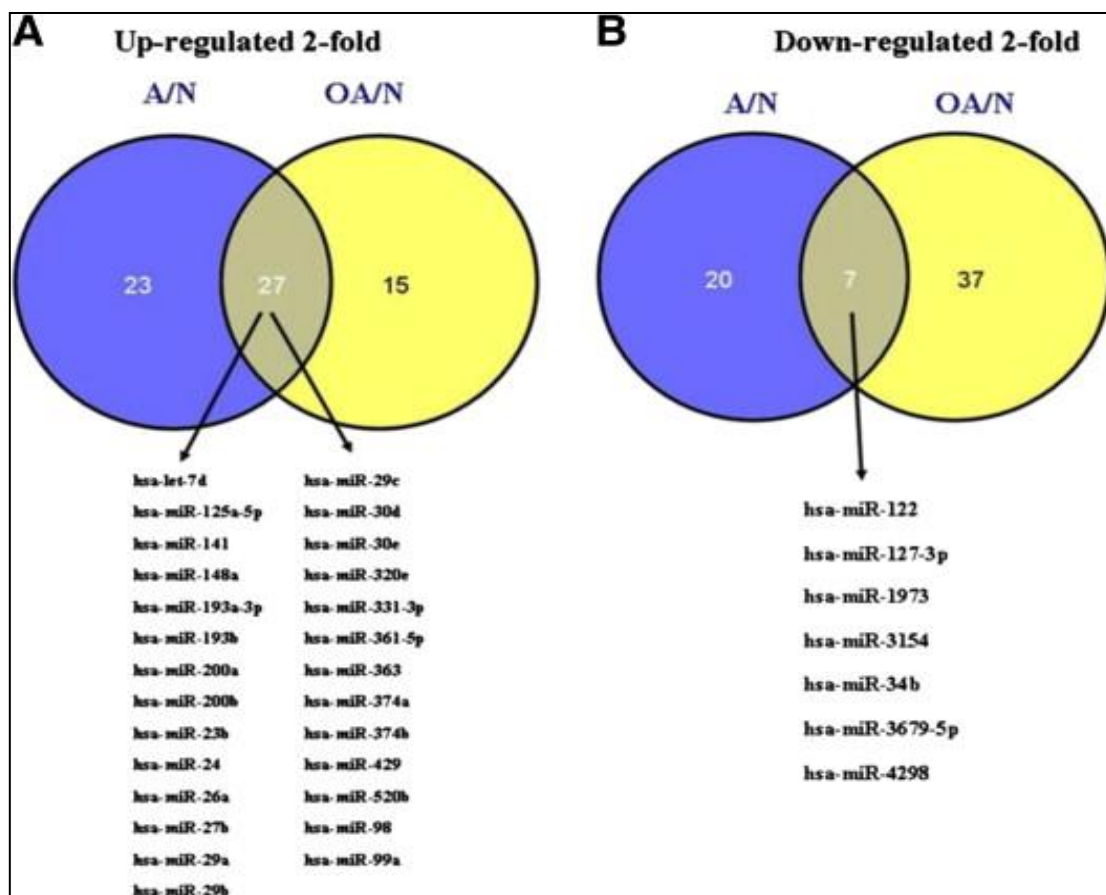
De plus, un autre rapport montre l'augmentation de l'expression de miARNs (miR-19b et let-7a) dans le plasma séminal chez les hommes avec azoospermie non obstructive par rapport aux témoins fertiles, tandis que les niveaux d'expression de ces deux miARNs étaient similaires entre les hommes avec oligozoospermie et les contrôles fertiles [707]. La surexpression de miARNs: miR-19b et let-7a pourraient être un indicateur de l'arrêt de la spermatogenèse.

Liu T et ses collègues ont montré une dérégulation de l'expression de 52 miARNs dans le sperme des hommes infertiles [708]. L'expression différentielle des miARNs sélectionnés a été validée par RT-PCR en temps réel et Northern blot. En effet, il a été constaté une



surexpression de miR-574-5P, miR-297, miR-122, miR-1275, miR-373, miR-185 et miR-193b et une diminution de l'expression de miR-100, miR-512-3p, miR-16, miR-19b, miR-23b et miR-26a dans le sperme des hommes infertiles présentant des anomalies du sperme.

Récemment, L'équipe Christina Backes a proposé un profil de miARNs chez les patients infertiles [709] (voir figure 60). Les résultats de la puce montrent la surexpression de 50 miARNs et la diminution de l'expression de 27 miARNs chez les hommes présentant une asthénozoospermie. Les hommes avec oligoasthénozoospermie présentent une surexpression de 42 miARN et une diminution d'expression de 44 miARNs par rapport aux hommes normozoospermiques. Les analyses RT-PCR quantitatives sur un ensemble de miARNs (miR-141, miR-200a, miR-122, miR-34b, miR-34c-5p et miR-16), ont permis de confirmer les données de la puce.



**Figure 63.** Expression des miARNs chez les patients infertiles. (A) miARNs surexprimés chez les patients asthénozoospermiques (A) et oligoasthénozoospermiques (OA) par rapport à normozoospermique (N). (B) miARNs dont l'expression est diminuée dans ces groupes. D'après [709].

### **9.3.1.2 Dans le cancer de testicule**

Les hommes atteints d'azoospermie sont plus susceptibles de développer un cancer des testicules. Le cancer du testicule ne représente que 1 % environ de tous les cancers masculins. Cependant, il s'agit de la tumeur la plus souvent diagnostiquée chez l'homme entre 15 et 45 ans. Son incidence, qui est différente d'une région à l'autre, a considérablement augmenté récemment partout dans le monde.

Des travaux récents ont montré que les tumeurs des cellules germinales surexpriment les miARNs du cluster miR-371-3. Les taux sériques de ces miARNs peuvent être corrélés avec le stade tumoral. Le miR-371a-3p semble être un biomarqueur utile des tumeurs des cellules germinales [710]. Sur un nombre faible d'échantillons de sérum (n=11), il a suggéré que les miARNs du cluster 371, 372, 373 peuvent constituer une nouvelle classe de biomarqueurs de tumeurs des cellules germinales [711]. Mais les miARNs de ce cluster 371, 372, 373 ont été trouvés aussi surexprimés dans la tumeur de la thyroïde [712].

## **9.4 MiARNs comme outil thérapeutique**

L'identification du rôle des miARNs en pathologie laisse entrevoir le développement d'outils pour moduler l'expression des miARNs et leurs fonctions. L'activité d'un miARNs peut être inhibée à l'aide d'un oligonucléotide inhibiteur (antagomir) anti-sens [713]. La première démonstration du potentiel thérapeutique de cette approche vient d'être rapportée chez des primates atteints d'une hépatite C chronique : la répression de miR-122 conduisant à une diminution de la charge virale du virus de l'hépatite C [714]. L'utilisation dans le futur d'inhibiteurs des miARNs dont l'expression est augmentée au cours d'un processus pathologique représente donc une stratégie thérapeutique prometteuse. Inversement, il est envisageable d'utiliser des oligonucléotides synthétiques pour restaurer l'expression de miARNs.

## ***II. Résultats***

# Résultats

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet d'articles publiés ou bien soumis.

- **Article n°1 :**

Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and Mcl-1. Léo MEUNIER, Benazir SIDDEEK, Aurélie VEGA, **Nadjem LAKHDARI**, Géraldine LEMAIRE, Claire MAUDUIT, Mohamed BENAHMED. *Endocrinology*. 2012; 153(4):1936-47.

- **Article n°2 :**

Impairment of miR-29/miR-18a-heat shock response pathways mediates male infertility: mechanisms and biomarkers. **Nadjem Lakhdari**<sup>1, 2</sup>, Bénazir Siddeek<sup>1, 2</sup>, Lilia Inoubli<sup>1, 2</sup>, Stéphanie Lattes<sup>1, 2</sup>, Rachel Paul Bellon<sup>1, 2</sup>, Véronique Isnard<sup>3</sup>, Emmanuelle Thibault<sup>4</sup>, André Bongain<sup>2, 3</sup>, Daniel Chevalier<sup>2, 5</sup>, Aurélien Guy-Duché<sup>1, 2</sup>, Nathalie Kuziner<sup>1, 2</sup>, Emmanuela Repetto<sup>2, 6</sup>, Michele Trabucchi<sup>2, 6</sup>, Michel Urtizberea<sup>7</sup>, Claire Mauduit<sup>1, 2, 8, 9</sup>, and Mohamed Benahmed<sup>1, 2, 10</sup>. Soumis pour publication.

Au cours de ma thèse, j'ai effectué des travaux dans le cadre de collaborations qui ont été publiés ou sont en préparation:

- **Article n°1 :**

Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of ABC transporter expression in testis. Koraïchi F, Inoubli L, **Lakhdari N**, Meunier L, Vega A, Mauduit C, Benahmed M, Prouillac C, Lecoœur S. *Toxicology*. 2013: S0300-483X(13)00123-6.

- **Article n°2 :**

*Breast-cancer anti estrogen resistance 4 (BCAR4)* encodes a novel maternal-1 effect protein in bovine and is expressed in the oocyte of human and other non rodent mammals. ANGULO, L, PERREAU, C, **LAKHDARI N**, UZBEKOV R, PAPILLIER, P,FRERET, S, CADORET, V, ROYERE, D, PONSART, UZBEKOVA, S DALBIES-TRAN, R. *Hum Reprod*. **2013**; 28(2):430-41.

- **Article n°3 (review) :**

MicroRNAs as potential biomarkers in diseases and toxicology. Bénazir SIDDEEK<sup>1, 2</sup>, Lilia INOUBLI<sup>1, 2</sup>, **Nadjem LAKHDARI**<sup>1,2</sup>, Claire MAUDUIT<sup>1, 2, 3, 4</sup> and Mohamed BENAHMED<sup>1, 2, 5</sup>.  
Publication accepté (review).

- **Article n°4 :**

Role of EZH2 and mir-101 in the programming of testicular germ cell death and male infertility induced by neonatal exposure to endocrine disruptors. Benazir SIDDEEK, **Nadjem LAKHDARI**, Lilia INOUBLI, Claire MAUDUIT, Mohamed BENAHMED. Publication en cours de préparation.

## ***1- Le modèle expérimental: exposition néonatale à un estrogénomimétique :***

Différentes études ont identifié qu'une exposition développementale aux PEEs peut induire une apoptose chronique des cellules germinales adultes [152, 715]. Toutefois, les mécanismes précis de ces phénomènes ainsi que les liens entre épigénétique et activation chronique de la mort programmée dans les cellules germinales restaient encore inconnus.

C'est dans ce contexte que se place notre travail de thèse. Les deux articles présentés ici utilisent le même modèle expérimental. Dans ce paragraphe, je présenterai les caractéristiques de ce modèle. Nous avons étudié les effets développementaux d'un estrogéno-mimétique (l'estradiol benzoate, EB) sur la spermatogenèse. Pour cela, le laboratoire a développé un modèle expérimental de rats exposés uniquement pendant la vie néonatale (jours 1 à 5) à différentes doses d'EB. Les animaux sont sacrifiés ensuite à différentes périodes du développement post-natal (J6 : immature, J21 et J30 : prépubère, J90 : adulte) pour étudier la fonction testiculaire. L'analyse phénotypique à l'âge adulte montre une altération du développement du tractus génital mâle avec une diminution du poids des testicules, des vésicules séminales et de la prostate aux doses les plus fortes (12,5 et 25 ug/j). Une atrophie sévère du testicule est observée à ces doses ainsi qu'une perte massive des cellules germinales. Des altérations mineures sont observées à la dose de 2,5 ug/j tandis qu'aucune altération n'est observée aux plus faibles doses (0,75 ; 1,25 ug/j). Pour éviter les erreurs d'interprétation dans l'expression des gènes et des protéines qui pourraient être liées à l'absence ou la diminution des cellules germinales, nous avons travaillé pour nos études d'expression avec les doses les plus faibles (0,75 ; 1,25 ; 2,5 ug/j).

L'exposition néonatale à l'EB induit dans le testicule adulte une apoptose chronique des cellules germinales comme le montre la technique du TUNEL mais aussi l'augmentation de l'expression des molécules pro-apoptotiques (CASP3, BAX) et la diminution des protéines anti-apoptotiques (BCL2, BCLx1, MCL1). Cette apoptose touche les cellules germinales adultes (spermatocytes, spermatides) et n'est observée que chez l'adulte (mais pas à 6, 21 ou 30 jours). Ce modèle induit l'infertilité dans le contexte de la programmation néonatale de pathologies adultes [716].

Après cette présentation du modèle, j'aborde les résultats spécifiques à chacun des articles.

## **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

### **- Résumé de l'article:**

La méthylation de l'ADN effectuée par les enzymes ADN méthyltransférases (DNMTs) est un des mécanismes épigénétiques participant au contrôle de l'expression des gènes. Il jouerait un rôle crucial au cours de la spermatogenèse. Dans cet article, nous avons cherché si la méthylation de l'ADN, à travers l'étude des DNMTs pouvait être altérée par une exposition néonatale à l'EB.

Nous montrons que le taux des trois protéines DNMTs majeures (DNMT3A, 3B et 1) est diminué (60-70%) dans le testicule d'animaux adulte (90 jours) exposés pendant la période néonatale à l'EB, mais pas dans le testicule immature (6 jours) ou prépubère (30 jours). La diminution d'expression des protéines DNMT3A, 3B et 1 est dépendant de la dose. En effet, l'expression des DNMT3A et 3B est significativement diminuée dès la dose 0,75 µg/jour, alors que le taux de DNMT1 chute à partir de la dose 1,25 µg/j. En revanche, le taux des transcrits de *Dnmt3A* et *3B* ne sont pas modifié, alors que les transcrits de *Dnmt1* sont modestement diminués à 2,5 g/j. Ces résultats 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).

La diminution des protéines DNMTs dans notre modèle a des répercussions fonctionnelles. Ainsi, nous observons une augmentation des transcrits *Ibtk* et *LINE-1*, dont l'expression est contrôlée par la méthylation, dans le testicule adulte. Ceci n'est observé dans le testicule immature. Ces données sont en accord avec l'absence de modification d'expression des protéines DNMTs à 6 jours. La réactivation d'expression des séquences *LINE-1*, observée dans notre modèle, pourrait induire une instabilité génomique et être une explication de la mort des cellules germinales.

Nous observons une dérégulation à long terme de l'expression des enzymes DNMTs (diminution d'expression à l'âge adulte, exposition néonatale). Dans ce contexte, nous

suggerons que cette altération pourrait être liée à une modification du taux de 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. Dans les testicules d'animaux adultes exposés durant la vie néonatale à l'EB, les miR-29a, b et c sont surexprimés dès la dose de 0,75 µg/jour. De façon semblable à l'apoptose et à l'expression des DNMTs, aucune modification n'est observée dans le testicule immature. Ces résultats ont été validés *in vitro*, par des approches de transfection d'une lignée de cellules germinales murines. Les miR-29s, en particulier miR-29b, module l'expression des DNMTs. L'ensemble de ces données suggèrent que l'exposition néonatale à l'EB induit une dérégulation développementale du taux des miR-29s dans le testicule adulte conduisant une diminution d'expression des DNMTs. Enfin, pour faire le lien avec l'apoptose testiculaire, nous avons analysé une autre cible des miR-29 décrite comme étant un facteur anti-apoptotique MCL-1. La protéine MCL-1 est significativement diminuée chez les animaux exposés à l'EB. Ceci est très probablement lié aux miR-29s comme nous le montrons *in vitro*.

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.



## Perinatal Programming of Adult Rat Germ Cell Death After Exposure to Xenoestrogens: Role of microRNA miR-29 Family in the Down-Regulation of DNA Methyltransferases and Mcl-1

Léo Meunier, Bénazir Siddeek, Aurélie Vega, Nadjem Lakhdari, Lilia Inoubli, Rachel Paul Bellon, Géraldine Lemaire, Claire Mauduit, and Mohamed Benahmed

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (L.M., B.S., A.V., N.L., L.I., R.P.B., G.L., C.M., M.B.), Unité 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Team 5, Nice F-06204, France; Université de Nice Sophia-Antipolis (L.M., B.S., A.V., N.L., L.I., R.P.B., G.L., M.B.), Unité de Formation et de Recherche (UFR) Médecine, Nice F-06000, France; Université Lyon 1 (C.M.), UFR Médecine Lyon Sud, Lyon F-69921, France; Hospices Civils de Lyon (C.M.), Hôpital Lyon Sud, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Pierre-Bénite F-69495, France; and Centre Hospitalier Universitaire de Nice (M.B.), Pôle de Obstétrique Reproduction Gynécologie, Centre de Reproduction, Nice F-06202, France

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 post-natal day (PND) 1 to 5 exposure of male rats to a xenoestrogen, estradiol benzoate (EB), we investigated the role of microRNA and DNA methyltransferases (DNMT) on the developmental effects of EB on the adult germ cell death process. Neonatal exposure to EB induced adult germ cell apoptosis together with a dose-dependent increase in miR-29a, miR-29b, and miR-29c expression. Increased miR-29 expression resulted in a decrease in DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b and antiapoptotic myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein levels as shown in 1) germ cells of adult rats exposed neonatally to EB and 2) in spermatogonial GC-1 transfected with miR-29. The DNMT decrease was associated with a concomitant increase in transcript levels of DNA methylation target genes, such as *L1td1-1 ORF1* and *ORF2*, *Cdkn2a*, and *Gstp1*, in correlation with their pattern of methylation. Finally, GC-1 cell lines transfection with miR-29a, miR-29b, or miR-29c undergo apoptosis evidenced by Annexin-V expression. Together, the increased miR-29 with a subsequent reduction in DNMT and Mcl-1 protein levels may represent a basis of explanation for the adult expression of the germ cell apoptosis phenotype. These observations suggest that the increased expression of the "apoptomir" miR-29 family represents the upstream mechanism identified until now that is involved in adult germ cell apoptosis induced by a neonatal hormonal disruption. (*Endocrinology* 153: 1936–1947, 2012)

Human epidemiological studies have indicated that the risk of developing diseases in later life might be related to disorders occurring during the developmental period. Fetal/neonatal life are vulnerable periods of the lifespan, during which exposure to 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 (1–3). Such a concept could be also applied to the reproductive pathology, such as male infertility, reproductive tract malforma-

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170  
Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society  
doi: 10.1210/en.2011-1109 Received April 18, 2011. Accepted January 23, 2012.  
First Published Online February 14, 2012

Abbreviations: Bcl-2, B-cell CLL/lymphoma 2; CASP3, caspase-3; Ct, threshold cycle; DAPI, 4',6'-diaminido-2-phenylindole; DNMT, DNA methyltransferase; EB, estradiol benzoate; ED, endocrine disruptor; EED, environmental ED; FITC, fluorescein isothiocyanate; GC-1, GC-1 spg; GD, gestational day; Mcl-1, myeloid cell leukemia sequence 1; MeDIP, methylated DNA immunoprecipitation; miRNA, microRNA; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PND, post-natal day; siRNA, small interfering RNA; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase 2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate nick end labeling.

tions, and testicular germ cell tumors (4). In recent years, a potential causal link between *in utero* and/or neonatal exposure to compounds termed endocrine disruptors (ED) or xenoestrogens that alter endocrine functions and the development of genital tract abnormalities, such as impaired spermatogenesis with adult testicular germ cell apoptosis, has emerged from studies in rodents. Indeed, *in utero* or neonatal exposure to xenoestrogens induces a wide range of abnormalities of the male genital tract, including small testes, cryptorchidism, hypospadias evidenced at birth, and male infertility in adulthood (5–11). Even though the exact molecular basis of the long-term testicular germ cell apoptosis at the origin of the infertility, induced by neonatal exposure to estrogenic compounds, remains unknown, some studies have suggested that epigenetic mechanisms and specifically DNA methylation might be at play (for review see, Refs. 12, 13). Furthermore, the recent identification of several families of microRNA (miRNA) involved in the different cellular processes, especially apoptosis via the “apoptomir” family (14), led us to hypothesize as to whether these short non-coding RNA might represent the upstream step involved in the neonatally programmed adult germ cell death process after early developmental exposure to xenoestrogens.

This study aims to identify the apoptomir expression alteration, specifically miR29 and their targets, the DNA methyltransferases (DNMT)1, DNMT3A, and DNMT3B and the antiapoptotic factor Mcl-1, potentially involved in the adult programmed germ cell death process, induced by neonatal exposure to xenoestrogens (15, 16).

## Materials and Methods

### *In vivo* experimental studies

Pregnant Sprague Dawley rats at gestational day (GD)15 (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were individually housed in temperature-controlled rooms with 12-h light, 12-h 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 (EB) (Sigma-Aldrich, L’Isle D’Abeau, France) by daily sc injections from post-natal day (PND) 1 to PND5 at doses of 0, 0.75, 1.25, 2.5, or 25  $\mu\text{g}/\text{d}$ . From PND6, rats were left without treatment and killed at PND6, PND30, or PND90 by CO<sub>2</sub> inhalation. During necropsy, the position of each testis was carefully noticed, and testes were removed and weighed. Only bilateral descended testes were studied. One of the testes was snap frozen for quantitative molecular approaches, whereas the other was fixed for morphological studies. At least seven different animals from four different litters were used for each treatment group. This study was conducted in accordance with current regulations and standards approved by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Animal Care Committee (protocol no. 2008-43).

### Histology

Testes were immediately fixed for 48 h in Bouin’s fluid, dehydrated stepwise in graded ethanol baths, and embedded in paraffin. Bouin-fixed testes were sectioned into 5  $\mu\text{m}$  thick and prepared and stained with hematoxylin, eosin, and safran (n = 5 animals per group).

### Terminal deoxynucleotidyl transferase 2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate nick end labeling (TUNEL) and immunofluorescence

TUNEL experiments were performed as previously described (6), using terminal deoxynucleotidyl transferase (Euromedex, Mundolsheim, France), biotin-11-2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate (Roche Diagnostics, Meylan, France), streptavidin-fluorescein conjugate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). At the end of the experiment, testis sections were counterstained with 4',6'-diaminido-2-phenylindole (DAPI), mounted with coverslips using mounting medium. The results were expressed as the number of TUNEL-positive cells per 100 random round seminiferous tubules. For immunofluorescence experiments, after unmasking treatment, sections were incubated 10 min in PBS 0.1% Triton X-100 at room temperature, then in PBS-5% FCS-1% protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO) for 30 min. The section were incubated overnight at +4 C with anti proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody (C-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), antiphospho-histone H2A.X (Ser139) (Merk Millipore, Bedford, MA), or anti heat shock protein 70 kDa (Cell Signaling, Beverly, MA) diluted at 1:50, or antiactive caspase-3 (CASP3) (Abcam, Cambridge, MA) diluted at 1:100. Sections were then washed three times in PBS 0.1% Triton X-100 and incubated 1 h at room temperature with a fluorescein isothiocyanate (FITC) or Texas Red-conjugated secondary antibody either donkey antirabbit (Amersham, Piscataway, NJ), rabbit antimouse, or swine antirabbit (Dako, Glostrup, Denmark) diluted at 1:30. The sections were washed in 1 $\times$  PBS and counterstained as described for TUNEL.

### Western blot analysis

Frozen testicular tissues were ground in liquid nitrogen to obtain tissue powders. Aliquots of powder were homogenized in ice-cold hypotonic buffer (25 mM Tris-HCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 1% protease inhibitor cocktail) (Sigma-Aldrich). Tissue homogenates were further sonicated (10 sec at 80 W). Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay. The experimental procedures were carried out as previously described (5). The antibodies used in this study were Dnmt3A (1:1000, no. 2160; Cell Signaling), Dnmt3B (1:1000, no. 2161; Cell Signaling), Dnmt1 (1:1000, KAM-TF040; Stressgen, Farmingdale, NY), cleaved CASP3 (1:500, no. 9661; Cell Signaling), Mcl-1 (1:5000; Rockland, Gilbertsville, PA), and actin (1:20,000; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Membranes were scanned using a Luminescent Image Analyzer 3000 CCD Camera (Fujifilm, Dusseldorf, Germany) and quantified using MultiGauge logiciel (Fujifilm).

### Real-time quantitative PCR

Total RNA were isolated from frozen testicular powders using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) coupled to an on-column purification and deoxyribonuclease treatment

with an RNeasy kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). cDNA was synthesized from total RNA (1  $\mu\text{g}$ ) with M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (10 U/ $\mu\text{l}$ ) (Invitrogen) and random hexamer primers (5  $\mu\text{M}$ ) (Invitrogen) in a final volume of 20  $\mu\text{l}$  according to the manufacturer's instructions. A 1:20 dilution of each RT product was used for the real-time RT-PCR analyses. The real-time RT-PCR measurement of individual cDNA (2  $\mu\text{l}$  of 1:20 dilution) was performed using Quantitect SYBR Master Mix (4  $\mu\text{l}$ ) (QIAGEN), PCR primers (2  $\mu\text{l}$  of 10  $\mu\text{M}$  solution), and ultrapure water (2  $\mu\text{l}$ ) to measure the duplex DNA formation with the Roche Lightcycler system. The primer sequences that used are listed in Supplemental Table 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>, or for *L1td1* (previously known as *Line1*) *ORF1* and *ORF2*, *Sine B2* (17), and *Gstp1* (18), have been previously described. 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. 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. The data were normalized to  $\beta$ -actin levels using the threshold cycle (Ct) method.

#### Real-time RT-PCR analysis of miRNA expression

RT-PCR reactions were performed using the stem-loop RT-PCR method as previously described (19), which is specific for mature miRNA (TaqMan miRNA assays; Applied Biosystems, Foster City, CA). Ten nanograms of total RNA were reverse transcribed in a 7.5- $\mu\text{l}$  reaction using Multiscribe Reverse Transcriptase and a TaqMan miRNA (29a, 29b, 29c) RT primer (Applied Biosystems). The reaction mixture was incubated at 16 C for 30 min, 42 C for 30 min, 85 C for 5 min, and finally held at 4 C until subsequent analysis or stored at -20 C. Five microliters of the reverse transcribed product (5-fold dilution from RT-PCR) were assayed using TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase, and 1  $\mu\text{l}$  of TaqMan miRNA (29a, 29b, 29c; Applied Biosystems) PCR primers/probe mix in a 15- $\mu\text{l}$  reaction mix. Real-time RT-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 sec, and 60 C for 1 min. The data were normalized to small nucleolar RNA using the Ct method.

#### Detection of methylation by methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-qPCR

DNA was isolated from frozen testicular powder by using DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN), and 6  $\mu\text{g}$  were digested with 24 U of *MseI* enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA) supplemented with 100 ng/ $\mu\text{l}$  BSA overnight at 37 C. The reaction was stopped by heating the samples for 20 min at 65 C. Digested DNA was purified using the QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN). *MseI*-digested DNA was run on a 2% agarose gel to verify a fragment size of 200-1000 bp. *MseI*-digested DNA corresponded to input DNA. One microgram of *MseI*-digested DNA was incubated with magnetic beads coupled with methyl-CpG-binding domain protein 2 protein (EpiXplore<sup>TM</sup> Methylated DNA Enrichment kit; CLONTECH, Mountain View, CA). Beads were washed to remove non- and hypomethylated DNA. The enriched methylated DNA fraction was eluted

with high salt buffer and purified by precipitation (MeDIP DNA). Five nanograms of the input and the MeDIP DNA were used for real-time quantitative PCR. The levels of methylated DNA were calculated according to the following formula:  $2^{[(\text{Ct}(\text{Input}) - \text{Ct}(\text{MeDIP}))]}$ . The primer sequences used are described in Supplemental Table 1.

#### Cell cultures and transfection

GC-1 spg (GC-1) mouse spermatogonia type B-spermatocyte cell lines, provided by Pierre Chambon (Institut de la Génétique et de la Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France), were maintained in DMEM/Glutamax medium (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) at 37 C in a humidified, CO<sub>2</sub>-controlled (5%) incubator. GC-1 cells grown on 12-well plates were transfected with 50 nM miR-29a, miR-29b, or miR-29c analogs (Applied Biosystems) using Hiperfect Transfection reagent (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. To knockdown DNMT expression, cells were transfected with 25 nM small interfering RNA (siRNA) targeting DNMT1 or DNMT3b (Applied Biosystems) or negative control siRNA (Eurogentec, Fremont, CA); 48 h after transfection, cells were harvested for protein and RNA extraction. For the visualization of apoptotic cells by immunofluorescence, we performed an Annexin-V-FITC and PI staining on GC-1 cells grown on glass coverslips (Miltenyi Biotec, Auburn, CA).

#### Data analysis

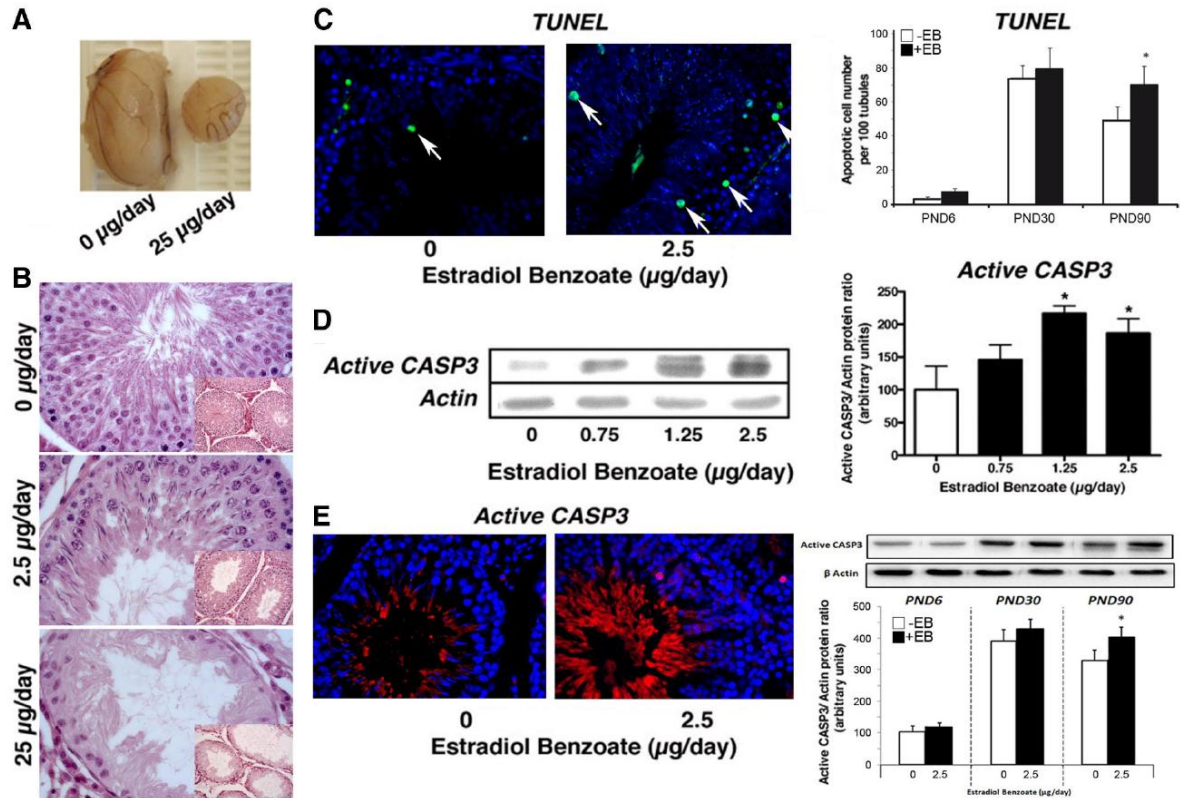
The data from the different experiments were analyzed with GraphPad software version 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The values were expressed as the mean  $\pm$  SEM to account for sample and animal variation within a dataset. The Student's *t* test for single comparison analysis or one-way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

## Results

#### Adult testicular apoptotic phenotype induced by neonatal exposure to EB

The adult germ cell apoptosis induced by neonatal exposure to the estrogenic analog EB was investigated by histological and molecular approaches. At the highest EB dose (25  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) used, adult (PND90) testes showed severe atrophy (Fig. 1A) with alterations in the seminiferous epithelium ranging from partial (spermatocytes and spermatids) to massive germ cell loss (Fig. 1B). At 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  EB, minor histological alterations in the seminiferous tubules were observed (Fig. 1B) and none at lower doses (0.75, 1.25  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) (data not shown). These data were correlated with the absence of modification in body and testicular weight at 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  and lower doses of EB (Supplemental Table 2). To minimize or avoid massive germ cell loss that





**FIG. 1.** Characterization of the adult testicular phenotype induced by neonatal exposure to EB. A, Macroscopic examination of adult testes showed a severe atrophy induced by neonatal EB (25 µg/d) exposure compared with untreated rats (0 µg/d). B, Testicular morphology in adult rat testes from untreated (0 µg/d), 2.5 µg/d-treated, and 25 µg/d-treated animals (magnification, ×400; inset, ×200). 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/d). The green fluorescent signal corresponds to TUNEL-positive (apoptotic) cells (white arrows). Nuclei were counterstained with DAPI (blue signal). The histograms represent the number of TUNEL-positive (apoptotic) germ cells per 100 seminiferous tubules from immature (PND6), juvenile (PND30), and adult (PND90) rats exposed neonatally to EB. The results are expressed as the mean ± SEM determined from at least four different animals per condition (\*,  $P < 0.05$ ). D, Cleaved CASP3 levels were determined by Western blot analysis in adult rat testes from unexposed (0) or 0.75, 1.25, and 2.5 µg/d EB-exposed animals. Representative autoradiograms were shown, whereas histograms represent cleaved CASP3 protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/actin protein) detected in the untreated group. The results are expressed as the mean ± SEM determined from seven different animals (\*,  $P < 0.05$ ). E, Cleaved CASP3 levels were determined by Western blot analysis in immature (PND6), juvenile (PND30), and adult (PND90) rats exposed neonatally to EB (2.5 µg/d). The results are expressed as the mean ± SEM determined from five to seven different animals per condition (\*,  $P < 0.05$ ). CASP3 was localized in adult (PND90) rat testes from untreated (0) and EB-treated (2.5 µg/d) rats. The red fluorescent signal corresponds to cleaved CASP3-positive cells; nuclei were counterstained with DAPI (blue signal).

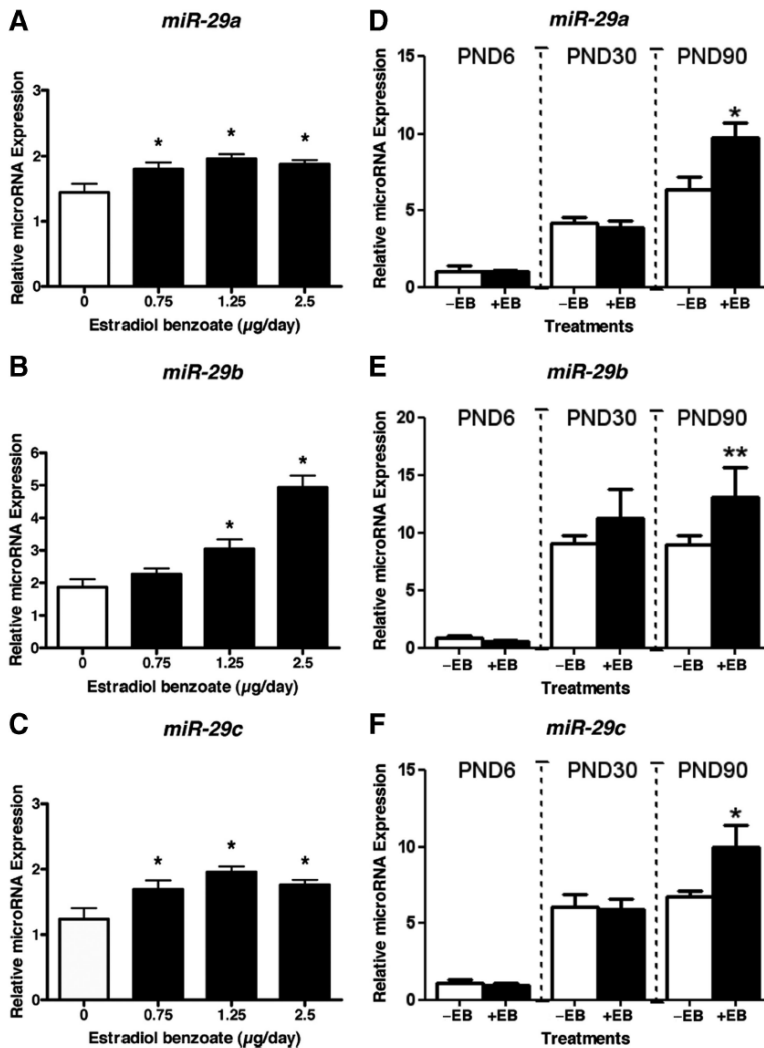
might confound the interpretation of EB effects on testicular germ cell gene expression and protein levels, we decided to analyze the testicular phenotype at a molecular level at the EB doses of 0.75, 1.25, and 2.5 µg/d.

Neonatal exposure to EB induced a cell death process in adult (PND90) rat testes but not in immature (PND6) or juvenile (PND30) ones as monitored through TUNEL (Fig. 1C) and active CASP3 (Fig. 1D and E) approaches. At PND90, a significant increase was observed (30%,  $P < 0.05$ ) in the TUNEL-positive cell number (Fig. 1C) and active CASP3 (Fig. 1E) levels. Active CASP3 protein levels were significantly increased in testes from 1.25 µg/d-treated (2-fold,  $P < 0.05$ ) and 2.5 µg/d-treated animals

(1.8-fold,  $P < 0.05$ ) (Fig. 1D). The TUNEL-positive cells corresponded to germ cells (spermatocytes and/or spermatids) (Fig. 1, C and E, and Supplemental Fig. 1). With regards to the rate of proliferation, although adult spermatogonia and preleptotene spermatocytes specifically displayed PCNA staining, no significant change in the accumulation of PCNA was observed between untreated and EB-exposed male rats (Supplemental Fig. 1).

**Neonatal exposure to EB induces long-term alteration of miR-29 in adult rat testes**

Early postnatal exposure to EB induced a dose-dependent increase in miR-29 (a, b, and c) levels in adult



**FIG. 2.** Neonatal exposure to EB induces a long-term alteration in miR-29 levels. Mature miR-29a (A), miR-29b (B), and miR-29c (C) levels were determined by real-time RT-PCR in adult rat testes from unexposed (0) or 0.75, 1.25, and 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  EB-exposed animals. Mature miR-29a (D), miR-29b (E), and miR-29c (F) levels were determined by real-time RT-PCR in immature (PND6), juvenile (PND30), or adult (PND90) rat testes from unexposed (–EB) or exposed (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ , +EB) animals. Histograms represent relative miRNA levels normalized to small nucleolar RNA levels. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from seven to eight different animals (\*,  $P < 0.05$ ).

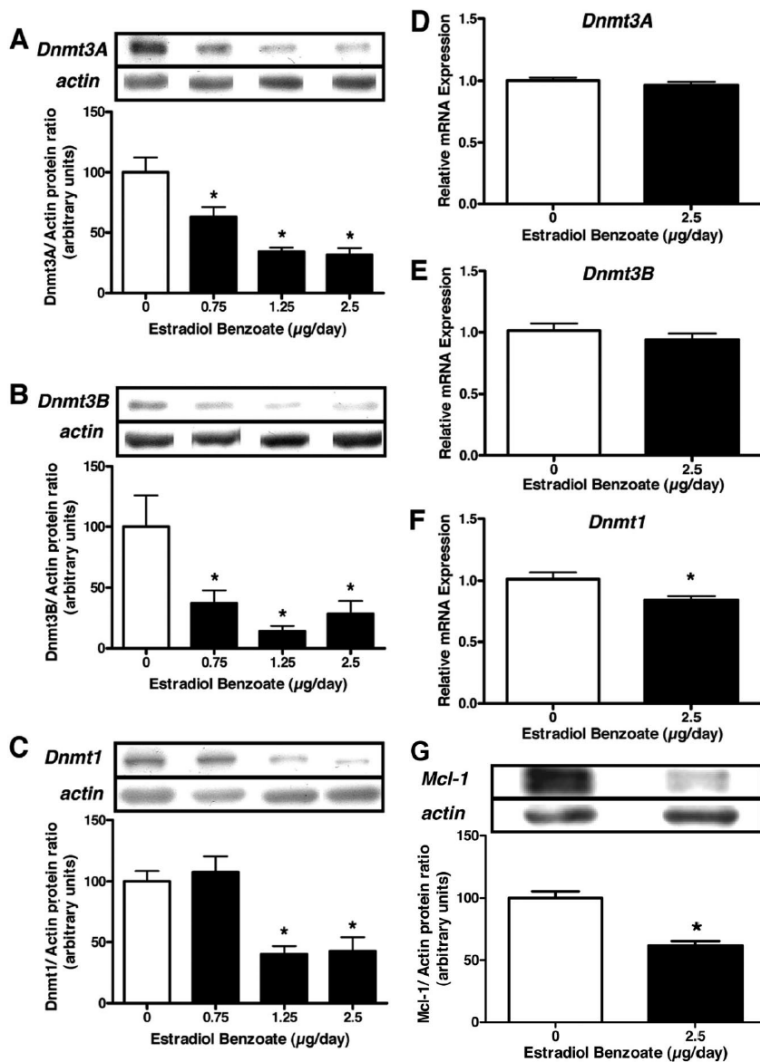
(PND90) rat testicular tissue. Indeed, miR-29a displayed a significant increase at 1.25  $\mu\text{g}/\text{d}$  (1.4-fold,  $P < 0.01$ ) and 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  (1.3-fold,  $P < 0.05$ ) of EB (Fig. 2A). A highly significant increase in the miR-29b accumulation was observed at 1.25  $\mu\text{g}/\text{d}$  (1.6-fold,  $P < 0.05$ ) and 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  (2.6-fold,  $P < 0.01$ ) of EB (Fig. 2B). Again, miR-29c levels were significantly increased at 0.75  $\mu\text{g}/\text{d}$  (1.35-fold,  $P < 0.05$ ), 1.25  $\mu\text{g}/\text{d}$  (1.6-fold,  $P < 0.01$ ), and 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  (1.4-fold,  $P < 0.05$ ) of EB (Fig. 2C). miR-29a (Fig. 2D), miR-29b (Fig. 2E), and miR-29c (Fig. 2F) miRNA levels were

affected at PND90 but not at PND6 (immature testes) or PND30 (juvenile testes).

Among the proteins targeted by the miR-29 members are, at least, two potential candidates that might be involved directly and/or indirectly in the germ cell apoptotic process, because their alterations induce germ cell death (20): Mcl-1 and DNMT. Mcl-1 is a B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) (CASP3) family protein that promotes cell survival by interfering at an early stage in a cascade of events leading to the release of cytochrome c from mitochondria (21). In adult testes from rats exposed during early postnatal life to EB, Mcl-1 protein levels (but not mRNA) (data not shown) were significantly reduced at a dose of 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  (41% decrease,  $P < 0.05$ ) of EB (Fig. 3G). Mcl-1 protein levels were affected at PND90 but not at PND6 (data not shown). Similarly, in adult testes from rats exposed to EB during early postnatal life, DNMT3A protein levels were significantly reduced at doses of 0.75  $\mu\text{g}/\text{d}$  (40% decrease,  $P = 0.036$ ), 1.25  $\mu\text{g}/\text{d}$  (65% decrease,  $P < 0.0001$ ), and 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  (70% decrease,  $P < 0.0001$ ) of EB (Fig. 3A). DNMT3B (3B2 isoform) protein levels were decreased at doses of 0.75  $\mu\text{g}/\text{d}$  (60% decrease,  $P = 0.0075$ ), 1.25  $\mu\text{g}/\text{d}$  (85% decrease,  $P = 0.0005$ ), and 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  (70% decrease,  $P = 0.0029$ ) of EB (Fig. 3B). Again, DNMT1 protein levels were decreased by 60% at 1.25  $\mu\text{g}/\text{d}$  ( $P = 0.0004$ ) and 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  ( $P = 0.0006$ ) in adult rat testes (Fig. 3C). Concerning transcript levels, although DNMT3A (Fig. 3D) and DNMT3B (Fig. 3E)

mRNA levels remained unchanged, the DNMT1 mRNA level showed a modest but significant decrease (1.2-fold,  $P = 0.0222$ ) in the adult testes from 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ -treated animals (Fig. 3F). DNMT3A2 mRNA levels were unchanged in adult rat testes (data not shown). Moreover, because antibodies raised against DNMT3A2 protein lack specificity, we were unable to quantify the potential changes in these protein levels. We were also unable to detect and quantify the *Dnmt3L* levels in the adult testes, confirming previous reports that *Dnmt3L* expression was extremely





**FIG. 3.** Neonatal exposure to EB induces a long-term alteration in testicular DNMT protein levels in adult rats without mRNA modification. Protein levels for DNMT3A (A), DNMT3B (B), and DNMT1 (C) were determined by Western blot analysis in adult rat testes from unexposed or 0.75, 1.25, and 2.5  $\mu\text{g/d}$  EB-exposed animals. Representative autoradiograms were shown, whereas histograms represent protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/actin protein) detected in the untreated group. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from seven different animals (\*,  $P < 0.05$ ). Transcripts levels of *Dnmt3A* (D), *Dnmt3B* (E), and *Dnmt1* (F) were determined by real-time RT-PCR analysis in adult testes from unexposed (0) and 2.5  $\mu\text{g/d}$  EB-exposed rats. Histograms represent relative mRNA levels normalized to  $\beta$ -actin levels. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from eight different animals (\*,  $P < 0.05$ ). G, Protein levels for Mcl-1 were determined by Western blot analysis in adult (PND90) testes from untreated (0) or 2.5  $\mu\text{g/d}$  EB-exposed animals. Representative autoradiograms were shown, whereas histograms represent protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/actin protein) detected in the untreated group. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM from seven different animals (\*,  $P < 0.05$ ).

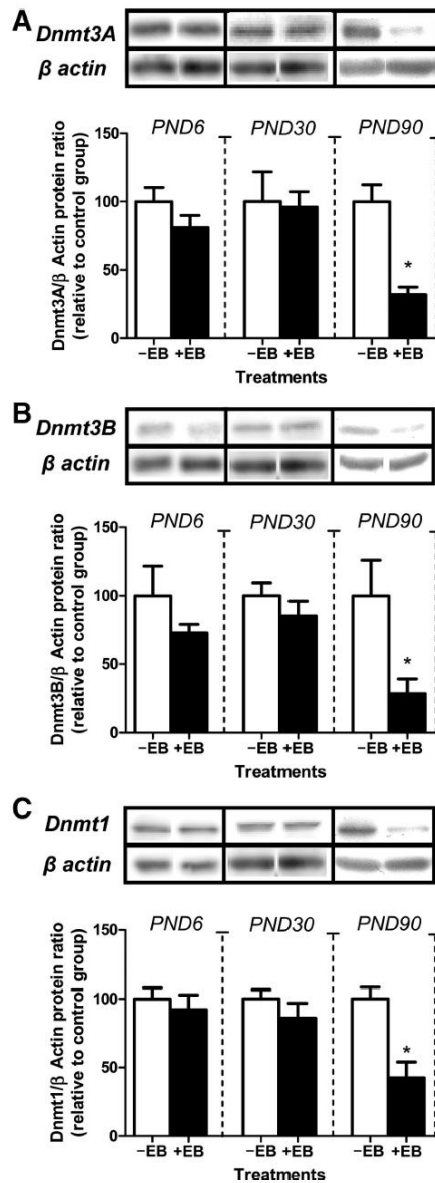
low or even undetectable in adult testes (22). Although DNMT3A (Fig. 4A), DNMT3B (Fig. 4B), and DNMT1 (Fig. 4C) protein levels were significantly ( $P < 0.05$ ) de-

creased in adult (PND90) testes from rats exposed during early postnatal life to EB, DNMT protein levels were unchanged in immature (PND6) rat and juvenile (PND30) testes (Fig. 4, A–C) after exposure to EB.

To demonstrate the inhibitory effects of miR-29 on DNMT protein levels, we used an *in vitro* model of transient transfection with synthetic miRNA in a rodent testicular germ (GC-1) cell line, which harbors features of type B spermatogonia and primary spermatocytes (23). Compared with scrambled oligonucleotide, miR-29a transfection had a clear repressive effect on DNMT3A (50% decrease,  $P = 0.027$ ) (Fig. 5A) and DNMT1 (50% decrease,  $P = 0.0191$ ) (Fig. 5C) protein levels, whereas miR-29a transfection had no significant effect in down-regulating DNMT3B protein levels (Fig. 5B). The most marked inhibitory effect of miR-29 overexpression on DNMT protein levels was observed for miR-29b, which highly reduced DNMT3A (75% decrease,  $P = 0.0042$ ) (Fig. 5A) and DNMT3B (75% decrease,  $P = 0.0052$ ) (Fig. 5B) protein levels as well as, to a lesser extent, DNMT1 protein levels (50% decrease,  $P = 0.007$ ) (Fig. 5B). Transfection of miR-29c reduced only DNMT3A protein levels (75% decrease,  $P = 0.0017$ ) (see figure 7 below), because no modification was observed in DNMT3B (Fig. 5B) and DNMT1 (Fig. 5C) protein levels. Interestingly, on the other hand, miR29a expression was not affected by DNMT knockdown (Supplemental Fig. 2).

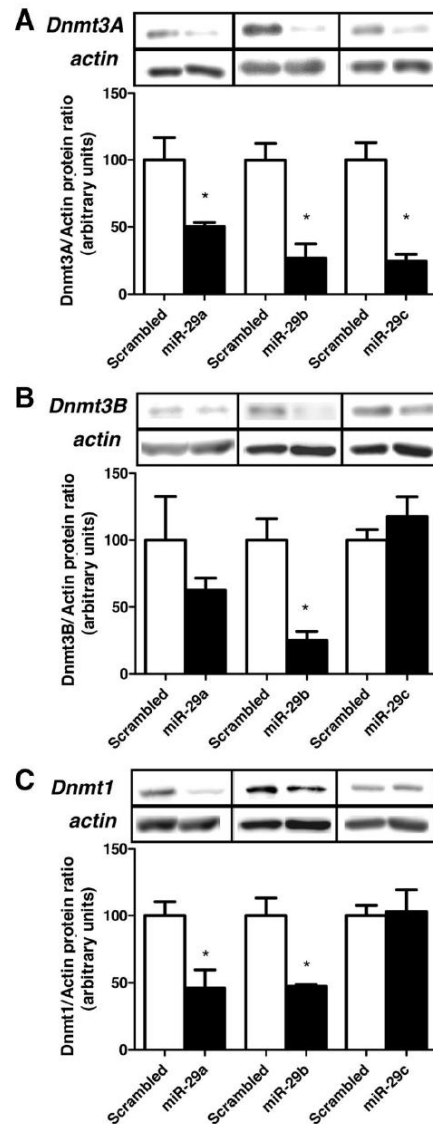
To identify the functional consequences of DNMT protein level alterations in adult testes, we further investigated the expression of genes (*Cdkn2a*, previously known as *p16* and *Gstp1*) or sequences (*L1td1*, previously known as *Line-1*) known to be controlled by a DNA methylation mechanism. The transcripts originating from

transposable elements *L1td1* and *SINE B2* were chosen because they normally remain silent through DNA methylation. Interestingly, at PND90, a significant increase of



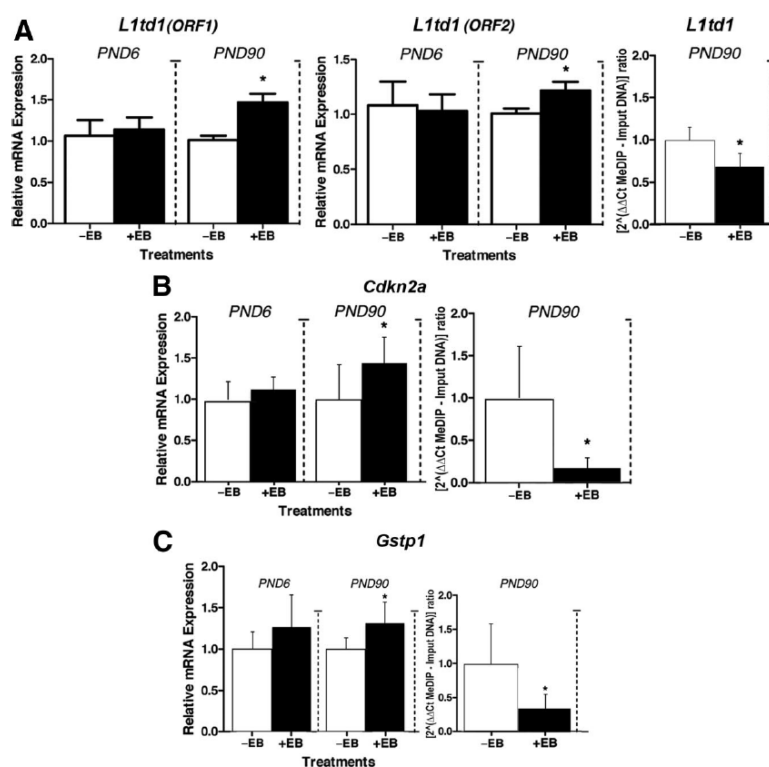
**FIG. 4.** Neonatal exposure to EB induces a long-term alteration in testicular DNMT protein levels in adult rats but not in immature or juvenile rats. Protein levels for DNMT3A (A), DNMT3B (B), and DNMT1 (C) were determined by Western blot analysis from immature testes (PND6), juvenile (PND30), and adult testes (PND90) from untreated (–EB) or EB-exposed (2.5  $\mu$ g/d, +EB) animals. Representative autoradiograms were shown, whereas histograms represent protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/actin protein) detected in the untreated group at the same age. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM from five (PND6) or seven (PND30 and PND90) different animals (\*,  $P < 0.05$ ).

*L1td1* ORF1 (1.5-fold,  $P = 0.01$ ) (Fig. 6A) and *L1td1* ORF2 (1.2-fold,  $P = 0.04$ ) (Fig. 6C) transcripts was observed, whereas the *SINE* (*B2\_Rn*) transcript levels were unchanged (data not shown). The analysis of DNA meth-



**FIG. 5.** Effects of transfection of miR-29 on DNMT protein levels in germ cells. Protein levels for DNMT3A (A), DNMT3B (B), and DNMT1 (C) were determined by Western blot analysis in the GC-1 germ cell line transiently transfected (48 h) by miR-29a, miR-29b, and miR-29c. Representative autoradiograms were shown, whereas histograms represent protein levels expressed as the percentage of the ratio (target protein/actin protein) detected in the scramble-treated control cells. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM from at least four independent experiments (\*,  $P < 0.05$ ).

ylation status of *L1td1* showed a significant decrease (30%,  $P < 0.03$ ) in EB-exposed animals (Fig. 6A). Moreover, *Cdkn2a* (1.5-fold,  $P < 0.01$ ) (Fig. 6B) and *Gstp1* (1.3-fold,  $P < 0.04$ ) (Fig. 6C) mRNA levels were increased in the testis from adult EB-exposed rats. These data are correlated with a significant decrease in their DNA methylation status: *Cdkn2a* (80%,  $P < 0.02$ ) (Fig. 6B) and



**FIG. 6.** Long-term effects of neonatal exposure to EB on the transcript levels of gene expression controlled by DNA methylation and pattern of methylation. Transcript levels of *L1td1-ORF1* and *L1td1-ORF2* (A), *Cdkn2a* (B), and *Gstp1* (C) were determined by real-time RT-PCR analysis in immature and adult rat testes untreated (–EB) or exposed to EB (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ , +EB). Histograms represent transcripts levels normalized to actin levels compared with the untreated group at the same age. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from eight different animals (\*,  $P < 0.05$ ). The methylation status of *L1td1* (A), *Cdkn2a* (B), and *Gstp1* (C) was performed by comparing expression between MeDIP DNA and input DNA by real-time RT-PCR analysis in adult rat testes untreated or exposed to EB (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ). The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from at least three different animals (\*,  $P < 0.05$ ).

*Gstp1* (65%,  $P < 0.03$ ) (Fig. 6C). Consistently with the absence of changes in the protein levels in DNMT in immature (PND6) testes, the transcript levels corresponding to methylated-target sequences (*L1td1 ORF1*, *L1td1 ORF2*, *Cdkn2a*, and *Gstp1*) remained unchanged in immature (PND6) rats (Fig. 6, A–C).

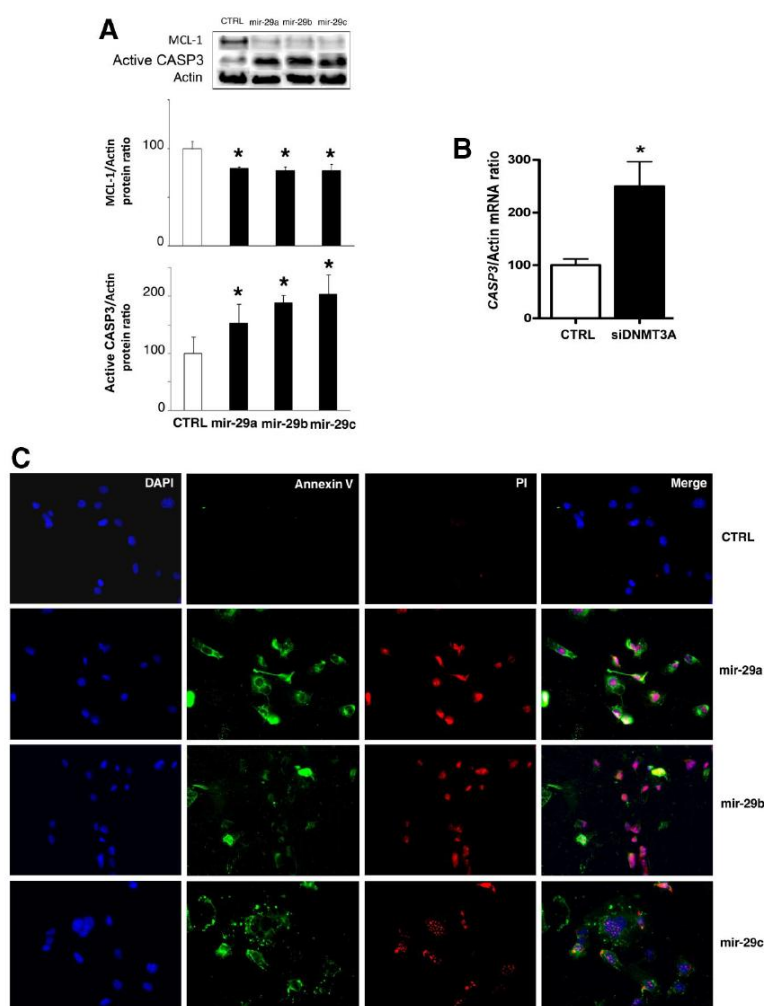
Transfection of GC-1 germ cell line with synthetic miR29a, miR29b, or miR29c induced an apoptotic process. Indeed, compared with scrambled oligonucleotide, miR-29a, miR-29b, and miR-29c transfection had a clear repressive effect on the protein level of antiapoptotic MCL-1 (Fig. 7A), whereas it enhanced that of proapoptotic cleaved CASP3 (Fig. 7A) and the number of Annexin-V and PI positive cells (Fig. 7C). Interestingly, DNMT knockdown induced also apoptosis as monitored by active CASP3 expression after transfection of the siRNA of DNMT3A (Fig. 7B). Such observations suggest

that the induction of active CASP3 by miRNA overexpression might be mediated through the inhibition of DNMT levels.

## Discussion

In this study, we demonstrated that early (PND1–PND5) postnatal exposure to a xenoestrogen compound could result in late-onset testicular diseases, such as adult germ cell apoptosis, and lead to male infertility. Indeed, testicular germ cell apoptosis was observed in adult (PND90) animals but not immature (PND6) or juvenile (PND30) rats. High EB doses (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) induce severe impairment of spermatogenesis with a decreased relative weight of the testes associated with a massive germ cell loss. These data are in accordance with the results of Putz *et al.* (24). Exposure to high doses of EB, and more generally to environmental ED (EED), is relevant to assess a clear infertile testicular phenotype but induce massive germ cell loss, which leads to important modifications in the relative cell-type proportions. Such changes could lead to false interpretations, because the observed differences in gene expression are the results of changes in testicular cell content rather than the regulation of gene expression. Through a dose-effect experiment of EB, we first determined the concentration that did not dramatically affect testicular weights but maintained the cellular testicular phenotype. Indeed, lower EB doses (0.75–2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) did not affect testicular weights but induced discrete germ cell alterations into the seminiferous tubules (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) and increased germ cell apoptosis (1.25 and 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) without modifying the proliferation rate. This allowed us to assume that at the doses used (0.75–2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) for the molecular analyses, the modifications of gene expression were significant, not the consequences of altered cell content. Designing the exposure conditions (age, doses, time, developmental periods) of individuals to EED presents by definition limitations. Indeed, individuals are generally exposed to several compounds. Even if exposure occurs at low doses for each compound, additive, synergistic, or even inhibitory effects are possible, leading therefore to





**FIG. 7.** Effects of miR-29 transfection on germ cell apoptosis. Protein levels for (A) CASP3 and MCL-1 were determined by Western blot analysis in the GC-1 germ cell line transiently transfected (48 h) by miR-29a, miR-29b, and miR-29c. Protein levels for (B) CASP3 were determined by Western blot analysis in the GC-1 germ cell line transiently transfected by DNMT3A. Representative autoradiograms were shown, whereas histograms represent protein levels expressed as the percentage of the ratio (target protein/actin protein) detected in the scramble-treated control cells. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from at least three independent experiments (\*,  $P < 0.05$ ). C, Apoptosis in GC-1 cells was visualized by Annexin-V-FITC and PI staining after transfection with control miR (CTRL), miR-29a, miR-29b, or miR-29c.

observable pathological effects. It is difficult if not impossible to determine, at the present time, the number of hormonally active chemicals to which individuals are exposed to, the duration of exposure, and the developmental periods at which exposure occurs. By using an experimental model based on the use of one compound with exposure at the lowest effective dose during a critical vulnerable period, we aimed, in the present study, at dissecting the upstream molecular mechanisms involved in the testicular adult germ cells triggered by exposure to a xenoestrogen.

The exposure of pups to EB from d 1 to 5 corresponds to the *in utero* second and third trimester development of their human counterparts, because this window of exposure corresponds to the period of testicular development that begins in fetal life and continues after birth by the proliferation of germ cells and somatic Sertoli cells (25).

Here, we report that adult germ cell apoptosis induced by early postnatal exposure to EB might be related to the increased expression of the three members of the miR-29 family (miR-29a, miR-29b, and miR-29c). miRNA are a class of short noncoding RNA (~22 nucleotides) that are involved in the post-transcriptional regulation of gene expression in most eukaryotic organisms. miRNA sometimes silence their targets through the induction of direct cleavage, but in most cases, they do so through either a cleavage-independent degradation mechanism or translational repression (26). miRNA play important roles in cellular processes, such as cell differentiation, growth/proliferation, migration, apoptosis/death, metabolism, and defense (26). With regards to miR-29, they are termed apoptomir, because it has been shown that miR-29a, miR-29b, and miR-29c up-regulate p53 by targeting p85 and cell division cycle 42 and induce apoptosis in a p53-dependent manner in breast and colorectal cancer cell lines (27). miR-29b has also been shown to target Mcl-1 and sensitize cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (16) and might promote apoptosis through a mitochondrial pathway that involves Mcl-1 and Bcl-2 (28). In this context,

we have shown that the increased expression of miR-29 is associated with decreased levels of the antiapoptotic Mcl-1 in adult rat testis perinatally exposed to EB.

The second target genes of miR-29 that might drive germ cell apoptosis are DNMT. Indeed, miR-29 (particularly miR-29b) control DNMT levels not only in human normal and cancer cells (15, 29) but also in murine germ cells (30). Although paternal irradiation has been shown to lead to up-regulation of the miR-29 family in the exposed male germ line and to cause decreased expression of

*de novo* methyltransferase DNMT3a (31), to our knowledge, this is the first report indicating that exposure during an early neonatal period to an ED activity triggers, in an irreversible manner, the increased expression of a miR family, which modulates key epigenetic factors such as DNMT in the adult germ cells. Indeed, early postnatal exposure to EB induces a dramatic dose-dependent decrease (reduction higher than 50%) in DNMT protein levels observed at the lowest doses tested (0.75  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) for both DNMT3A and DNMT3B and 1.25  $\mu\text{g}/\text{d}$  for DNMT1. Our findings also indicate that DNMT3A and DNMT3B might be directly targeted by miR-29, whereas DNMT1 might be indirectly targeted by miR-29 up-regulation. Increased miR-29 levels might induce the 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 the neonatal exposure to EB. Moreover, the up-regulation of other miRNA, such as miR-148b-3p and miR-152 (as predicted by the Target scan database), can target DNMT1 to destabilize its mRNA or inhibit its translation.

Therefore, a miR-29 increase induced changes in DNA methylation status in the testes through decreased levels in the adult (PND90) testes of *de novo* (DNMT3A and DNMT3B) and maintenance (DNMT1) DNMT. These decreased DNMT levels might be involved in the adult germ cell death process induced upon early neonatal EB exposure, given that the conditional knockout of *Dnmt3A* induced a dramatic spermatogenesis failure characterized by decreased testicular weight and azoospermia (22, 32). Moreover, the transient knockdown of *Dnmt1* in the germ stem cells (33) or of *Dnmt3a* in GC-1 cell line (this study) induced a dramatic apoptotic phenotype. The 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 cell apoptosis (20). Although the precise mechanisms through which reduced DNMT can induce apoptosis in germ cells remain to be identified, one possible explanation could be that the increased expression of *L1td1* elements induces chromosomal alteration and elicits the apoptotic process in germ cell meiosis. Indeed, decreased DNMT levels induced functional consequences, such as a decrease in methylation status of some genes (*Cdkn2a*, *Gstp1*, and *L1td1*) regulated through promoter methylation (34–36) associated with an increase in their mRNA expression in adult (PND90) rats (this study). Testicular DNMT expression changes have previously been reported by at least two other laboratories in rats exposed *in utero* to the antiandrogenic fungicide vinclozolin. Firstly, a de-

crease in DNMT1, DNMT3a mRNA levels was observed in fetal (GD18) testes from rats exposed *in utero* to vinclozolin (100 mg/kg·d from GD8 to GD14) (12). However, DNMT protein levels were not evaluated in this study (12). Secondly, a decrease in DNMT1 mRNA and protein levels, but an increase in DNMT3b mRNA and protein levels, was reported in adult rats after *in utero* exposure to vinclozolin (100 mg/kg·d from GD14 to GD18) (37). Compared with these two studies, in our study, no change in DNMT levels at the transcriptional level (except for DNMT1 with a slight decrease in RNA levels) was observed. In the present study, the alterations are mainly related to a dramatic decline in DNMT protein levels (60–70% decrease) and in an increase in miR29, which target DNMT protein but also other factors, such as the antiapoptotic Mcl-1. Such a decrease in DNMT levels provides a basis of explanation for the adult germ cell death process as we previously mentioned (20, 22, 32). The discrepancies observed in DNMT expression between the three different studies (Refs. 12, 37 and the present study) after perinatal endocrine disruption could be attributed to 1) the use of different types of endocrine disruptors (antiandrogenic *vs.* estrogenic compounds) and 2) the period of exposure (*in utero vs.* postnatal). Although postnatal exposure to EB appears not to affect adult testicular androgen receptor mRNA and plasma testosterone levels in adult animals (our unpublished data), it will be of interest in the future to determine as to whether testosterone administration to the adult may revert the adult germ cell death process and DNMT protein levels (37).

The increased expression of the miR-29 family members, reported here, represents the highest upstream mechanisms identified to date that provide a basis of explanation for the adult germ cell death process in neonatal rats exposed to xenoestrogens. That the GC-1 germ cell line transfected with the miR-29 family members undergoes the apoptosis process strengthens such an observation. However, the remaining questions are about the upstream control of miR-29 expression, including for example the nature and role of transcription factors involved as well as the epigenetic control mechanisms (for a review see, Ref. 26) potentially altered in adult germ cells after neonatal estrogen activity disruption. Potential putative transcription factors controlling miRNA 29 expression could be identified with the use of *in silico* analysis (see [www.microna.gr/microT](http://www.microna.gr/microT)). Moreover, the epigenetic control of miR-29 expression alterations at the level of DNA methylation and/or chromatin remodeling processes might be at play. It is unlikely that DNA methylation changes occurring after neonatal exposure to EB deregulate miR-29 expression, because 1) *in silico* analysis (miRGen database) has shown that miR-29 members do not harbor CpG



islands in their genomic content and 2) miR-29 levels are not affected by DNMT in the GC1 cell line (as reported here). Finally, among the potential mechanisms involved, chromatin remodeling has been suggested to be at the origin of the long-term deregulation of specific miRNA after exposure to estrogenic compounds. Indeed, the *in vitro* exposure of mammary epithelial cells to diethylstilbestrol can modulate histone H3 methylation marks (H3K27me3 and H3K9me2) at the miR-9-3 gene, leading to epigenetic inactivation (38). Specifically for the miR-29 family, studies have demonstrated that during muscle differentiation, miR-29b and miR-29c expression could be regulated by the YY1 transcription factor involved in the recruitment of different histone-modifying enzymes such as histone deacetylases and Polycomb group proteins (39). It is thus tempting to speculate that in our model, neonatal exposure to EB induced histone modifications at specific miRNA clusters, leading to permanent chromatin remodeling and the transcriptional activation of specific miRNA genes. Therefore, it would be of interest to investigate the status histone marks (e.g. H3K27me3 and H3K9me2) and their related histone methyltransferase enzymes. As a first clue that argues for such a regulation of miRNA genes, a work previously published by our laboratory demonstrated that the neonatal exposure of mice to estrogenic compounds (EB or diethylstilbestrol) induced the down-regulation of the histone methyltransferase G9a at the mRNA and protein levels and decreased H3K9me1 and H3K9me2 marks as well as the transcript accumulation of several G9a target genes (40). Another interesting point is that miR-29 is a hallmark of sexual differentiation in female but not male gonads (30). Such exposure to estrogenic compounds that reinduce the expression of miR-29 is reminiscent to the demasculinizing effects of the EED reported at hormonal levels (41, 42).

In this article, the delayed apoptotic effects on adult germ cells after neonatal exposure to xenoestrogens is an observation which is reminiscent of the Barker hypothesis (2) related to the concept of the developmental origins of health and disease (1). It is of interest to note that the changes in miR-29a, miR-29b, and miR-29c levels are not observed immediately (PND6) after the endocrine disruption between d 1 and 5 after birth but later in adulthood (PND90) concomitant to the appearance of the adult germ cell death phenotype. As expected, these delayed changes in miRNA profile were accompanied by delayed changes in their target DNMT, and Mcl-1 levels, factors actively involved in the adult germ cell, as previously indicated. Whether these delayed changes in DNMT and Mcl-1 driven by the miR-29 in the adult germ cells provide some initial bases for the explanation of the developmental origins of health and disease would be of major interest to investigate. In this context, it is

noteworthy that altered miRNA patterns might be linked to disturbed developmental processes during fetal or neonatal life. For example, the high-fat treatment of gestating mice induces the long-term deregulation of several miRNA in the liver of the progeny (43). The exposure of mice to ethanol during fetal life has also been shown to induce a long-term increase of miRNA in the brains of exposed animals (44).

In summary, our data showed that early postnatal hormonal disruption induces an adult testicular germ cell apoptosis linked to the increased expression of apoptomirs (miR-29 family). The consequences of these increased levels of miR-29 are, at least, the decreased expression of DNMT and the antiapoptotic factor Mcl-1, two types of targets that elicit cellular apoptosis. The involvement of miR-29 in the adult germ cell death also makes of the miRNA a potential therapeutic target for male infertility.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Mohamed Benahmed, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1065, Team 5, Bâtiment Universitaire Archimed, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), 151 Route Saint-Antoine Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 3, France. E-mail: benahmed.m@chu-nice.fr.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie and BayerCropScience convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE doctoral grant to L.M.), the Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-06-SEST-13, the Program National de Recherche en Alimentation et Nutrition Humaine Grant ANR-07-PNRA-016, and the Program National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens Grant PNRPE-2009-12.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

1. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS 2007 Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol* 19:1–19
2. Godfrey KM, Barker DJ 2000 Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 71:1344S–1352S
3. Simeoni U, Barker DJ 2009 Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes. *Semin Fetal Neonatal Med* 14:119–124
4. Wohlfahrt-Veje C, Main KM, Skakkebaek NE 2009 Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. *Clin Endocrinol* 71:459–465
5. Benbrahim-Tallaa L, Siddeek B, Bozec A, Tronchon V, Florin A, Friry C, Tabone E, Mauduit C, Benahmed M 2008 Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. *J Endocrinol* 196:21–31
6. Bozec A, Chuzel F, Chater S, Paulin C, Bars R, Benahmed M, Mauduit C 2004 The mitochondrial-dependent pathway is chronically affected in testicular germ cell death in adult rats exposed in utero to anti-androgens. *J Endocrinol* 183:79–90
7. McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM 2001 Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: per-

- manence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol Sci* 62:236–249
8. Omezzine A, Chater S, Mauduit C, Florin A, Tabone E, Chuzel F, Bars R, Benahmed M 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* 144:648–661
  9. Atanassova N, McKinnell C, Turner KJ, Walker M, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM 2000 Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141:3898–3907
  10. Mathews E, Braden TD, Williams CS, Williams JW, Bolden-Tiller O, Goyal HO 2009 Mal-development of the penis and loss of fertility in male rats treated neonatally with female contraceptive 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol: a dose-response study and a comparative study with a known estrogenic teratogen diethylstilbestrol. *Toxicol Sci* 112:331–343
  11. Yasuda Y, Kihara T, Tanimura T, Nishimura H 1985 Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice. *Teratology* 32:219–227
  12. Anway MD, Rekow SS, Skinner MK 2008 Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome. *Genomics* 91:30–40
  13. McLachlan JA 2001 Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 22:319–341
  14. Vecchione A, Croce CM 2010 Apoptomirs: small molecules have gained the license to kill. *Endocr Relat Cancer* 17:F37–F50
  15. Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, Fabbri M, Volinia S, Tsao T, Zanetti N, Kornblau SM, Marcucci G, Calin GA, Andreeff M, Croce CM 2009 MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 114:5331–5341
  16. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ 2007 mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26:6133–6140
  17. Lucchinetti E, Feng J, Silva R, Tolstosonov GV, Schaub MC, Schumann GG, Zaugg M 2006 Inhibition of LINE-1 expression in the heart decreases ischemic damage by activation of Akt/PKB signaling. *Physiol Genomics* 25:314–324
  18. Wan YJ, Li YY, Xia W, Chen J, Lv ZQ, Zeng HC, Zhang L, Yang WJ, Chen T, Lin Y, Wei J, Xu SQ 2010 Alterations in tumor biomarker GSTP gene methylation patterns induced by prenatal exposure to PFOS. *Toxicology* 274:57–64
  19. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ 2005 Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33:e179
  20. Doerksen T, Benoit G, Trasler JM 2000 Deoxyribonucleic acid hypomethylation of male germ cells by mitotic and meiotic exposure to 5-azacytidine is associated with altered testicular histology. *Endocrinology* 141:3235–3244
  21. Michels J, Johnson PW, Packham G 2005 Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37:267–271
  22. La Salle S, Oakes CC, Neaga OR, Bourc'his D, Bestor TH, Trasler JM 2007 Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Dev Biol* 7:104
  23. Hofmann MC, Narisawa S, Hess RA, Millán JL 1992 Immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen. *Exp Cell Res* 201:417–435
  24. Putz O, Schwartz CB, Kim S, LeBlanc GA, Cooper RL, Prins GS 2001 Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: I. Effects on the prostate gland. *Biol Reprod* 65:1496–1505
  25. Marty MS, Chapin RE, Parks LG, Thorsrud BA 2003 Development and maturation of the male reproductive system. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 68:125–136
  26. Breving K, Esquela-Kerscher A 2010 The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1316–1329
  27. Park SY, Lee JH, Ha M, Nam JW, Kim VN 2009 miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 $\alpha$  and CDC42. *Nat Struct Mol Biol* 16:23–29
  28. Xiong Y, Fang JH, Yun JP, Yang J, Zhang Y, Jia WH, Zhuang SM 2010 Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 51:836–845
  29. Veeck J, Esteller M 2010 Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15:5–17
  30. Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y, Mano H 2009 Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA* 15:1507–1514
  31. Filkowski JN, Ilnytskyi Y, Tamminga J, Koturbash I, Golubov A, Bagnyukova T, Pogribny IP, Kovalchuk O 2010 Hypomethylation and genome instability in the germline of exposed parents and their progeny is associated with altered miRNA expression. *Carcinogenesis* 31:1110–1115
  32. Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H 2004 Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429:900–903
  33. Takashima S, Takehashi M, Lee J, Chuma S, Okano M, Hata K, Suetake I, Nakatsuji N, Miyoshi H, Tajima S, Tanaka Y, Toyokuni S, Sasaki H, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T 2009 Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol Reprod* 81:155–164
  34. Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B, Trasler JM 2007 Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol* 307:368–379
  35. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA 2002 Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 22:480–491
  36. Oakes CC, Kelly TL, Robaire B, Trasler JM 2007 Adverse effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on spermatogenesis include reduced sperm function and selective inhibition of de novo DNA methylation. *J Pharmacol Exp Ther* 322:1171–1180
  37. Cowin PA, Gold E, Aleksova J, O'Bryan MK, Foster PM, Scott HS, Risbridger GP 2010 Vinclozolin exposure in utero induces postpubertal prostatitis and reduces sperm production via a reversible hormone-regulated mechanism. *Endocrinology* 151:783–792
  38. Hsu PY, Deatherage DE, Rodriguez BA, Liyanarachchi S, Weng YI, Zuo T, Liu J, Cheng AS, Huang TH 2009 Xenoestrogen-induced epigenetic repression of microRNA-9-3 in breast epithelial cells. *Cancer Res* 69:5936–5945
  39. Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, Cheng A, Hall BM, Qualman SJ, Chandler DS, Croce CM, Guttridge DC 2008 NF- $\kappa$ B-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 14:369–381
  40. Volle DH, Decourteix M, Garo E, McNeilly J, Fenichel P, Auwerx J, McNeilly AS, Schoonjans K, Benahmed M 2009 The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 119:3752–3764
  41. Söder O 2005 Perinatal imprinting by estrogen and adult prostate disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1269–1270
  42. Main KM, Skakkebaek NE, Virtanen HE, Toppari J 2010 Genital anomalies in boys and the environment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24:279–289
  43. Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, Hanson M, Lehnert H, Ceriello A, Byrne CD 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
  44. Wang LL, Zhang Z, Li Q, Yang R, Pei X, Xu Y, Wang J, Zhou SF, Li Y 2009 Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Hum Reprod* 24:562–579

### **3- Article n°2:**

L'altération des voies miR-29, miR-18a et réponse au choc thermique est impliquée dans l'infertilité masculine : mécanismes d'action et biomarqueurs.

#### **- Résumé de l'article:**

Des études en pathologie humaine ainsi que sur les souris génétiquement modifiées montrent que la voie de réponse au choc thermique est impliquée dans l'infertilité masculine. Trois protéines sont principalement impliquées : la protéine HSPA2 (HSP70) et ses deux facteurs de transcription HSF1 et HSF2. HSPA2 est une protéine majeure de la réponse au choc thermique. Elle protège les cellules contre divers stress, empêchant l'agrégation des protéines immatures et endommagées.

Au cours de ce travail, nous avons montré des altérations majeures de la voie de réponse au choc thermique dans le testicule d'animaux exposés pendant la vie néonatale à l'EB. Nous observons une augmentation d'HSF1 et une diminution d'HSF2 dépendante de la dose dans le testicule adulte. De plus, l'expression de la protéine HSPA2 régulée par ces facteurs de transcription est diminuée de façon dramatique. Ce profil d'altération de la voie de réponse au choc thermique est semblable au phénotype d'apoptose puisque nous ne l'avons observé qu'à l'âge adulte et non dans le testicule immature (6 jour) ou pubère (21, 30 jours). Par une technique d'immunofluorescence, nous avons localisé les protéines HSF1, HSF2 et HSPA2. Elles sont exprimées dans les spermatocytes, les cellules touchées par l'apoptose dans notre modèle.

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes en amont pouvant expliquer l'altération de la voie de réponse au choc thermique à travers l'étude de certains miRNAs. En effet, ces petits ARNs non codant régulent la traduction protéique. Cette piste est suggérée, en partie, par le fait que le taux de protéines d'HSF2 est diminué alors que son niveau d'ARNm n'est pas modifié. A l'aide du logiciel d'alignement TargetScan, nous avons identifié le miR-18a comme régulateur potentiel de HSF2. Nous avons validé cette donnée en montrant que la transfection d'une lignée de cellules germinales de souris (lignée GC1) avec analogue synthétique de miR-18a diminue le niveau d'HSF2, HSPA2 et induit l'apoptose. In vivo, l'exposition néonatale à l'EB induit une augmentation de l'expression de miR-18a dans le testicule adulte.

Concernant HSF1, comme son expression ARNm et protéique était augmentée, nous avons évalué la méthylation de son promoteur. Le logiciel MethylPrimer express montre la présence d'îlot CpG s'étendant de la position -812 à +899 par rapport au site de transcription. L'exposition néonatale à l'EB induit une diminution de la méthylation du promoteur de HSF1. Cette hypométhylation pourrait être liée à la diminution d'expression des enzymes de méthylation DNMTs, comme nous l'avons montré dans l'article n°1. Cette perte d'expression des DNMTs pourrait être liée à une augmentation d'expression de leur miARNs régulateurs, les miR-29a, b, c.

L'apoptose chronique des cellules germinales est irréversible lors d'un traitement néonatal mais réversible lors d'un traitement adulte suggérant l'implication d'une programmation développementale de l'infertilité.

En somme, les miR-29 et 18a semblent être des marqueurs l'infertilité après l'exposition à l'EB régulant le processus apoptotique via la voie de réponse au choc thermique (HSPA2). En analysant le sang des animaux, nous montrons l'anomalie tissulaire se répercute au niveau plasmatique. En effet, dans le plasma des rats adultes, nous observons une augmentation des miR-29a et 29c. Ces miRNA identifiés dans le modèle expérimental pourraient se révéler des biomarqueurs de l'infertilité humaine. Ainsi, nous avons évalué l'expression de ces miARNs dans une cohorte de 358 patients constituée d'un groupe de patients ayant un nombre normal de spermatozoïdes ( $N > 15 \times 10^6/\text{ml}$ ), des patients présentant une oligospermie modérée ( $1 < N < 15 \times 10^6/\text{ml}$ ) ou sévère ( $0 < N < 1 \times 10^6/\text{ml}$ ) ou bien une azoospermie ( $N = 0$ ). Une augmentation des miR-18a, 29a, b, c est observée chez les patients présentant une oligospermie ou une azoospermie (miR-29a, b, c) par rapport aux hommes ayant un spermogramme normal. Plus précisément, le miR-18a est augmenté uniquement chez les patients présentant une oligospermie modérée alors que les miR-29a, b, c sont augmentés chez les patients présentant une oligospermie modérée, sévère ou bien une azoospermie.

En conclusion, nos résultats montrent que (1) la dérégulation de la voie des miR-29/miR-18a /voie de réponse du choc thermique représente des étapes en amont de l'apoptose des cellules germinales conduisant à l'infertilité ; (2) l'augmentation des miR-29/miR-18a dans le plasma humain suggère leur utilisation potentielle comme marqueur diagnostique de l'infertilité et (3) l'implication directe des miR-29s/miR-18a dans l'apoptose en fait de potentiels outils thérapeutiques de l'infertilité humaine.

## **Impairment of miR-29/miR-18a-heat shock response pathways mediates male infertility: mechanisms and biomarkers.**

Nadjem Lakhdari<sup>1, 2</sup>, Bénazir Siddeek<sup>1, 2</sup>, Lilia Inoubli<sup>1, 2</sup>, Stéphanie Lattes<sup>1, 2</sup>, Rachel Paul Bellon<sup>1, 2</sup>, Véronique Isnard<sup>3</sup>, Emmanuelle Thibault<sup>4</sup>, André Bongain<sup>2, 3</sup>, Daniel Chevalier<sup>2, 5</sup>, Aurélien Guy-Duché<sup>1, 2</sup>, Nathalie Kuziner<sup>1, 2</sup>, Emmanuela Repetto<sup>2, 6</sup>, Michele Trabucchi<sup>2, 6</sup>, Michel Urtizbera<sup>7</sup>, Claire Mauduit<sup>1, 2, 8, 9</sup>, and Mohamed Benahmed<sup>1, 2, 4, 10</sup>.

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Team 5, Nice F-06204, France,

<sup>2</sup>Université de Nice Sophia-Antipolis, Unité de Formation et de Recherche (UFR) Médecine, Nice F-06000, France,

<sup>3</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle de Digestif-Obstétrique, Centre de Reproduction, Nice F-06202, France,

<sup>4</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle de Biologie, Centre de Reproduction, Nice F-06202, France,

<sup>5</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle d'Urologie, Service d'Urologie Nice F-06202, France,

<sup>6</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Team 10, Nice F-06204, France

<sup>7</sup> BASF Agro, Ecully F-69130, France,

<sup>8</sup>Université Lyon 1, UFR Médecine Lyon Sud, Lyon F-69921, France,

<sup>9</sup>Hospices Civils de Lyon, Hopital Lyon Sud, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Pierre-Bénite F-69495, France,

<sup>10</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Département de Recherche Clinique et d'Innovation, Nice F-06001.

Conflicts of interest: None

**Corresponding author:** Dr. Mohamed Benahmed, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1065, Team 5, Bâtiment Universitaire Archimed, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), 151 Route Saint-Antoine Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 3, France. E-mail: benahmed.m@chu-nice.fr.

**Running title :** Impairment of miR-29/miR-18a in male infertility



## **ABSTRACT**

Studies using genetically-modified mice established that impairment of the heat shock response (HSR) pathway induces male infertility. Using rats neonatally exposed to xenoestrogens as a pathophysiological model, we report a major alteration in HSR through increased HSF1 expression, associated with reduced HSF2 and HSPA2 expression resulting in adult germ cell apoptosis. The neonatal programming of this alteration was related to the upstream deregulation of two miRNA pathways. Firstly, an increase in miR-29s reduced the levels of DNA methyltransferases1, 3a, 3b, inducing DNA hypomethylation of the HSF1 promoter and its increased expression. Secondly, a decrease in the HSPA2 protein level resulting from downregulated HSF2 due to increased miR-18a expression. Consequently, miR18a/29 were identified as new circulating biomarkers in the plasma from animal model and more interestingly from infertile patients. In a cohort of 358 patients, miR-29a, b, c and miR-18a plasma levels were higher in patients with reduced sperm counts (oligospermia). These observations indicate that (i) miR-29/miR-18a/HSR deregulation represents upstream steps in germ cell apoptosis leading to infertility; (ii) the increased levels of miR-29/miR-18a in human plasma support their use as potential infertility diagnosis biomarkers; and (iii) the direct involvement of miR-29/miR-18a in apoptosis make them therapeutic targets for male infertility.

## INTRODUCTION

In response to physical and chemical stresses that affect protein folding and thus the execution of normal metabolic processes, cells activate gene expression strategies aimed at increasing their chances of survival. All living cells maintain a balance among the synthesis, folding, clearance, interactions, and location of individual proteins, which facilitates the proper conformations and physiological concentrations of proteins needed for cell functions. This process is called proteostasis (Balch et al., 2008). To deal with inherited misfolded proteins resulting from metabolic and environmental stresses, cells have highly sophisticated mechanisms, including the heat shock response (HSR) and the endoplasmic reticulum unfolded protein response that regulate proteostasis (Morimoto, 2008; Ron and Walter, 2007; Shinkawa et al., 2011). When cells are exposed to environmental stresses such as high temperature, they induce the expression of many proteins such as Heat Shock Proteins (HSPs) that facilitate protein folding and maintain proteostasis (Lindquist, 1986; Richter et al., 2010). The HSR is an adaptive response to proteotoxic stress that is regulated at the transcriptional level by heat shock factors (HSFs) (Akerfelt et al., 2010; Wu, 1995). In mammals, HSFs form a family of at least four well-described transcription factors (Akerfelt et al., 2010; Fujimoto and Nakai, 2010), which were named according to the first discovery of their activation by heat shock. Due to the universality and robustness of their response to heat shock, the stress-dependent activation of HSFs has become a paradigm in the sense that HSFs trigger the expression of genes encoding HSPs. HSPs, in turn, function as molecular chaperones, contribute to the establishment of a cytoprotective function against various proteotoxic stress, regulate cellular homeostasis, and promote cell survival (Lecomte et al., 2010; Lindquist and Craig, 1988). There are at least five major HSP families, HSP110/HSPH, HSP90/HSPC, HSP70/HSPA, HSP60/HSPD, and small HSP (HSPB). HSP70 family members are the most abundant and most highly conserved (Hunt and Morimoto, 1985). In general, HSPs prevent inappropriate protein aggregation and shuttle immature or damaged proteins in subcellular compartments for repair, degradation, or packaging. While it was believed for decades that HSFs were only involved in protective mechanisms, increasing evidence indicates that this ancient transcriptional program performs genome-wide

and unexpected functions, even in the absence of experimentally induced stress (Lecomte et al., 2010).

HSR is crucial for the normal development and function of the male gonad, and is especially important in germ cell survival and function. Alteration of HSR induces massive germ cell death, leading to male infertility in experimental models that are mainly based on genetically-modified mice, such as HSPA2/HSP70-2 (Dix et al., 1996; Mori et al., 1997) and HSF2 (Kallio et al., 2002; Wang et al., 2003) knock-out (KO) mice, which display increased apoptotic germ cell death with reduced quality sperm. Transgenic mice expressing active HSF1 in the testis are infertile because of a block in spermatogenesis, resulting from increased germ cell apoptosis (Nakai et al., 2000; Widlak et al., 2003). Besides the use of animal models, some clinical studies have pointed to the potential role of HSR in human male infertility. In this context, HSPA2 levels were decreased in seminal plasma from infertile patients (Cedenho et al., 2006; Motiei et al., 2013), and a missense mutation (R502H) leading to loss of HSF2 function has been reported in patients with idiopathic azoospermia (Mou et al., 2013).

While these observations indicate that HSR may play a crucial role in male infertility, the upstream mechanisms leading to the alteration of HSF and HSP expression in this disease remain largely unknown. To answer this question, we used a pathophysiological experimental model with a male infertility phenotype resulting from neonatal exposure to Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs). Indeed, a major concern has risen in recent years over the potential reproductive health risks associated with exposure to environmental chemicals. Human epidemiological and experimental studies have revealed an association between exposure to EDCs or xenoestrogens and reproductive health alterations, including male infertility, cryptorchidism, hypospadias, and testicular germ cell tumors (Atanassova et al., 2000; Bozec et al., 2004; Mathews et al., 2009; McIntyre et al., 2001; Meunier et al., 2012; Omezzine et al., 2003; UNEP/WHO, 2012; Yasuda et al., 1985). Experimental animal models have shown evidence for a causal link between exposure to EDCs and impaired spermatogenesis resulting mainly from adult germ cell apoptosis (McIntyre et al., 2001; Omezzine et al., 2003). Although the molecular basis of testicular germ cell apoptosis at the origin of impaired germ cell development remains unknown, epigenetic mechanisms have been suggested to be involved (for a review,

(Bernal and Jirtle, 2010). We have previously shown that exposure to a xenoestrogen induces an increase in adult germ cell death leading to infertility (Meunier et al., 2012). This germ cell death appears to be related to upstream epigenetic mechanisms, including microRNA (miRNA) expression alteration (Meunier et al., 2012).

Therefore, the present work aimed to: (i) determine whether the heat shock response (HSF/HSP) is altered in adult rat germ cells during the death process (infertility) that follows neonatal exposure to EDCs; (ii) identify the upstream molecular epigenetic mechanisms, specifically the miRNA pathways involved in the potential deregulation of HSR during infertility, and (iii) validate such upstream miRNA-HSR pathways in human male infertility by using the identified miRNAs as potential circulating biomarkers of this reproductive disease.

## RESULTS

*Neonatal exposure to estradiol benzoate (EB) induces adult rat testicular hypospermatogenesis.* Neonatal exposure to the estrogenic analog EB at the highest dose (12.5 and 25 µg/day, Fig. 1A) induced severe atrophy of adult (post-natal day – PND- 90) testes with massive germ cell loss (Fig. 1B). At 2.5 µg/d EB, minor histological alterations in the seminiferous tubules were observed (Fig. 1B), whereas no alterations were observed at the lower doses (0.75 and 1.25 µg/d, data not shown). These data correlated with normal body and testicular weights at EB doses of 2.5 µg/d and less (data not shown). To minimize or avoid massive germ cell loss that might confound the interpretation of the effects of EB on testicular germ cell gene expression and protein levels, we analyzed the testicular phenotype at a molecular level at EB doses of 0.75, 1.25, and 2.5 µg/d. Neonatal exposure to EB induced cell death in adult (PND90) rat testes at the level of adult germ cells (spermatocytes and spermatids) as monitored by TUNEL assay (Fig. 1C). Apoptosis was assessed by significant increases in levels of pro-apoptotic proteins such as BAX (but not PUMA, Fig. 1D) and decreases in levels of anti-apoptotic proteins such as BCL2, BCL-XL, and MCL1 (Fig. 1D). This long-term germ cell death process, as visualized (Fig. 1E) and quantified by monitoring Bax protein levels, was identified in adult (PND90) testes but not in immature (PND6) or juvenile (PND21 and PND30) testes (Fig. 1F). These observations are therefore to be viewed in the context of the developmental (neonatal) origin of the adult germ cell death.

*Neonatal exposure to EB affects HSF and HSPA2 levels in adult germ cells.* Germ cell death/survival are altered in experimental models with genetically-modified HSF (Kallio et al., 2002; Nakai et al., 2000) or HSPA2 (Dix et al., 1996); therefore, we next evaluated the effects of neonatal exposure to EB on HSF/HSP expression in the context of adult germ cell apoptosis (Fig. 1). Neonatal exposure to EB induced an increase in HSF1 and a decrease in HSF2 protein levels in adult testes in a dose-dependent manner (Fig. 2A). Both these alterations were associated with a dramatic and dose-dependent decrease in the HSPA2 protein level (while HSP60/HSPD1 and HSP90 expression were not affected, Fig. 2A). Similar to the apoptotic phenotype, changes in HSF1, HSF2, and HSPA2 protein expression were observed only in adult testes, not in immature or juvenile testes (Fig. 2B). This deregulation of protein levels

was associated with alterations in the mRNA levels of HSF1 and HSPA2 in adult (but not immature or juvenile) testes (Fig. 2B) supporting the concept of neonatal programming of these alterations in the adult germ cell death. HSF2 mRNA levels were unaffected (Fig. 2B). HSF1, HSF2, and HSPA2 protein expression was identified in meiotic (spermatocytes) and post-meiotic (spermatids) germ cells of adult testes (Fig. 2C). Neonatal exposure to EB increased the intensity of HSF1 and HSPA2 immunostaining in adult testicular germ cells, while it decreased the intensity of HSF2 immunostaining (Fig. 2C). Next, we addressed the upstream microRNA pathways that are potentially involved in these HSF1 and HSF2 changes and that lead to germ cell apoptosis and hypofertility.

*Overexpression of miR-18a downregulates the HSF2 protein level and induces germ cell death.* While the mRNA expression of HSF2 was unchanged following neonatal exposure to EB, its protein level was downregulated. This pattern of expression suggested potential regulation by microRNAs. Using a target prediction program (TargetScan), alignment of rat HSF2 with miR-18a revealed a putative target site at positions 116-122 of the *Hsf2* 3'UTR (Fig. 3A). This site is located in a conserved region of the *Hsf2* 3'UTR of several species, including the rat model used here (Fig. 3A). Moreover, regulation of HSF2 expression by miR18a has been reported in a mouse model (Bjork et al., 2010). Conversely, the possibility that miR-18a directly targets HSPA2 was excluded using TargetScan. In our model, neonatal exposure to EB increased miR-18a expression in adult testes but not in juvenile testes. MiR-18a expression decreased moderately, although significantly, in immature (PND6) testes (Fig. 3B). However, the possibility exists that such a decrease in miR-18a is not functionally relevant as (its target) HSF2 protein levels were not affected in immature (PND6) testes (Fig. 2B). Furthermore, in vitro transfection of a rodent testicular germ (GC-1) cell line with a synthetic mimic of miR-18a increased the apoptotic rate (identified by AnnexinV, and active CASP3, Fig. 3C, D), and was associated with significantly reduced HSF2 and HSPA2 protein levels (Fig. 3D).

*Upstream overexpression of miR-29a and DNA hypomethylation upregulate HSF1 expression with increased germ cell death.* Because HSF1 mRNA and protein expression was upregulated in our model, we hypothesized that transcriptional regulation is involved. Bioinformatics tools were used to identify and characterize the

presence of CpG islands in the HSF1 gene promoter sequence. A 5,465 bp region was analyzed with Methyl Primer Express software. A CpG island spanning positions -812 to +899 relative to the transcription start site was detected, with a GC content of 58% and an observed/expected CpG ratio at 0.71 (Fig. 4A). Neonatal exposure to EB decreased the methylation status of the HSF1 promoter in the adult testis as assessed by MeDIP qPCR (Fig.4B). This occurred in the context of a decreased global genome methylation status as determined by evaluation of Line-1 and H19 (Fig. 4B). We previously reported that such hypomethylation is likely to be related to decreased protein levels of DNMT1, 3A, and 3B in adult testes neonatally exposed to xenoestrogens (Meunier et al., 2012).

Indeed, knockdown of DNMT3A and DNMT3B increased the HSF1 protein level (Fig. 4C) and apoptotic rate (DNMT3A, Fig. 4D). By contrast, knockdown of DNMT1 by siRNA did not modify HSF1 expression in the GC1 cell line (Fig. 4C). Taken together, our data suggest that these DNMTs are the upstream regulators of HSF1. DNMTs are targeted by a family of microRNAs, specifically miR-29a, b, and c (Garzon et al., 2009; Meunier et al., 2012; Takada et al., 2009; Veeck and Esteller, 2010). These microRNAs were identified in the testis throughout postnatal life since miR-29a was highly expressed from PND6 to PND90, and miR-29b and c expression steadily increased from PND6 to PND90 (Fig. 4E). The high levels of these microRNAs in the adult testis indicate they might be predominantly expressed in adult (spermatocytes and spermatids) germ cells. Neonatal exposure to EB induced an increase in miR-29a, b, and c expression in adult testes, but not in immature or juvenile testes (Fig. 4E). The increased expression of HSF1, together with decreased DNMT3a and 3b protein levels, in GC1 cells after transfection of a synthetic mimic of miR-29a, b, and c suggest that miR-29 family members might be involved in the increased expression of HSF via alterations of DNMTs (Fig. 4F). Finally, it was validated in vitro that the second potential pathway, miR-29s–DNMTs–HSF1, leads to apoptosis of germ cells since transfection of GC1 cells with miR-29 (Fig. 4D) or DNMT3A (Fig. 4D) increased apoptosis.

Our data suggest that neonatal exposure to EB induced long-term germ cell apoptosis/hypospermatogenesis linked to the alteration of two miRNA pathways, leading to dysregulated HSF1 and HSF2 protein expression. In addition, assuming that HSF1 expression is also controlled by HSPA proteins (Anckar and Sistonen, 2011), we tested whether increased HSF1 expression is also related to the



decreased level of HSPA2. Indeed, knockdown of HSPA2 in GC1 cells significantly increased the HSF1 protein level while HSF2 knock down did not modify HSF1 levels (Fig. 4G). Next, we addressed whether the effect remains irreversible when rats are only exposed during adulthood.

*Adult exposure to EB induces reversible hypospermatogenesis.* Exposure of adults (PND90) to EB induced apoptosis (TUNEL) in the same adult testicular germ cells (spermatocytes and spermatids) as observed following neonatal exposure (Fig. 5A). Likewise, an alteration in HSR with an increase in the HSF1 level and a decrease in the HSF2 and HSPA2 levels (Fig. 5B) was linked to increased expression of miRNA-18a, 29a, 29b, and 29c (Fig. 5C). However, germ cell apoptosis was reverted after 60 days (PND150) from the exposure (Fig. 5A) and HSF/HSPA2 protein/microRNAs expression alterations were no longer observed (Fig. 5A-C).

As the alteration in HSR following neonatal exposure to EDCs, with the related increase in adult germ cell death, appears to be driven by upstream deregulation of tissue miRNA expression, we next investigated whether these miRNAs could be used as biomarkers of infertility.

*MiR-18a and miR-29s as biomarkers of male infertility.* Neonatal exposure to EB induced an increase in miR-18a and miR-29c in blood plasma from adult rats, while the levels of miR-29a and miR-29b remained unchanged (Fig. 6A). Since circulating miR-18a and miR-29c reflect germ cell death in the testis, we therefore evaluated their levels in the blood plasma from a cohort of 358 patients with normal or decreased sperm counts. The data obtained indicate that the plasma levels miR-18a, 29a, 29b, and 29c were significantly higher in patients with altered sperm count compared to men with normal sperm count (Fig. 6B). Specifically, while circulating miR-18a levels were increased among patients with moderate oligospermia, miR-29a, miR-29b and miR-29c were increased in patients with moderate or severe oligospermia and also in patients with azoospermia.

## DISCUSSION

This study was initiated with three purposes. The first one was to identify the alteration of the HSR as underlying mechanism in the adult germ cell death process. The second one was to show that impaired HSR results from an upstream deregulation of miRNA expression. The third one was to use these identified miRNAs to generate circulating biomarkers of male infertility in the pathological context of decreased sperm count in humans. We used a patho-physiological model of neonatal xenoestrogen-exposed rats that exhibit a phenotype of adult male infertility resulting from chronic adult germ cell apoptosis. We report that germ cell death was linked to an alteration of the HSR, which was mediated by increased HSF1 expression and decreased HSF2 and HSPA2 protein levels. Functional studies on HSR in the male gonad provided by genetic models established a causal link between altered HSR and the male infertility phenotype, which was caused by germ cell death (Dix et al., 1996; Kallio et al., 2002; Mori et al., 1997; Nakai et al., 2000; Wang et al., 2003; Widlak et al., 2003). Therefore, the alteration of HSR displayed in this experimental model clearly underlies the adult germ cell death, and thus infertility, observed following neonatal exposure to xenoestrogens.

One of the original findings of this report is the identification of miRNA expression deregulation as an upstream mechanism involved in the impairment of the HSF/HSP balance in neonatally programmed adult germ cell death. MiRNAs are tiny (approximately 18-25 nucleotides) non-coding RNAs and endogenous physiological regulators of gene expression in virtually all of eukaryotic organisms (He and Hannon, 2004). They are highly conserved with close to 90% sequence homology among human, mouse, and rat (Kim and Nam, 2006). The expression patterns of miRNAs can be developmentally regulated or tissue-specific, or miRNAs can be steadily expressed in the whole organism (He and Hannon, 2004). MiRNAs play important roles in numerous cellular processes such as development, differentiation, apoptosis, and cell proliferation by simultaneously controlling the expression levels of many genes (Bartel, 2004; He and Hannon, 2004; Pasquinelli et al., 2005; Plasterk, 2006). In the present study, two miRNA pathways involved in the altered HSF/HSP balance leading to changes in HSPA2 expression and programmed adult germ cell death were identified, namely miR-29-DNMTs-HSF1 and miR18a-HSF2 pathways. The first pathway was related to increased HSF1 expression, resulting from its

decreased promoter DNA methylation. This was a consequence of reduced levels of DNMT1, 3A, and 3B, followed by increased expression of miR-29a, b, and c. The second pathway was related to a decrease in the HSPA2 protein level, resulting from a decrease in the HSF2 level, which was caused by an increase in miR-18a expression.

While the molecular mechanisms underlying the increase in HSF1 mRNA and protein levels have remained unclear until now, the present data show that this increase in expression could be related to its hypomethylated promoter status. Indeed, we expanded our previous data (Meunier et al., 2012) and showed that neonatal exposure to xenoestrogens induces global genome hypomethylation of adult germ cells as evaluated through the increases in Line-1 and H19 levels. The involvement of the miRNA 29–DNMT pathway in the overexpression of HSF1 in germ cell death is supported by (i) the increased expression of miRNA-29 family members together with the decrease in DNMT (target) protein levels, and the subsequent increase in HSF1 expression resulting from its hypomethylation in adult germ cells; and (ii) the increased expression of HSF1 in the germ cell line GC-1 cells transfected with pre-miRNA-29 or with siDNMTs, together with increased germ cell death. These in vitro data assess the functionality of this miRNA pathway identified in the in vivo model.

The miR18a-HSF2 pathway might play a key role during physiological germ cell maturation (Bjork et al., 2010). Indeed, expression of miR-18a and HSF2 are inversely correlated during spermatogenesis, and inhibition of miR-18a in intact seminiferous tubules increases the level of HSF2 protein, which is involved in germ cell maturation and survival (Bjork et al., 2010). In the present work, we demonstrated that neonatal exposure to xenoestrogens clearly disrupted this pathway in the adult testis and resulted in increased miRNA-18a expression, which led to a decreased level of HSF2 protein and a subsequent reduction in the level of HSPA2. This mechanism contributes to the adult rat apoptotic germ cell phenotype, which is comparable to that observed in genetically invalidated HSF2 (Kallio et al., 2002; Wang et al., 2003) and HSPA2 KO mice (Dix et al., 1996; Mori et al., 1997). MiR-18a and HSF2 protein colocalize to early (meiotic) pachytene spermatocytes and round post-meiotic spermatids (Alastalo et al., 2003; Bjork et al., 2010; Sarge et al., 1993), the germ cell types where the death process is occurring (present data). The alteration of this miR-18a–HSF2 pathway leading to germ cell death in our

experimental model was supported by (i) an increase in miR-18a tissue levels and a decrease in HSF2 (and HSPA2) protein levels in adult rats neonatally exposed to xenoestrogens and (ii) the downregulation of HSF2 (and HSPA2) protein levels in germ cell line transfected with miR-18a, together with increases in the levels of apoptosis and cleaved CASP3.

Interestingly, the two miRNA–HSR pathways are likely to be interconnected since concomitant alteration of HSF1 and HSF2 expression might mediate the dramatic reduction in HSPA2 levels. Indeed, HSF2 was suggested to play a role in the heritability of a decondensed chromatin status on the *HspA2* gene in a process called “bookmarking” (Xing et al., 2005). This process helps to maintain *Hsp* genes in a transcription competent state to allow quick and robust activation of the gene by HSF1 (Ostling et al., 2007). Therefore, the decrease in the HSPA2 level, we observed in the present study, might result from a reduction in HSF2 and the decrease in HSF2 probably rendered HSF1 unable to exert its stimulatory effect on HSPA2 expression. As a consequence, the inability of HSF1 to increase the level of HSPA2, could explain the inefficiency of HSF1 to protect against germ cell death. On the other side, paradoxically, it has been reported that activation of HSF1 in male germ cells induces male infertility resulting from either a direct HSF action on germ cell death (Nakai et al., 2000; Vydra et al., 2006; Widlak et al., 2003) or via decreased HSPA2 expression (Widlak et al., 2003). Indeed, HSF1 induced germ cell death through the alteration of the level of several partners in the apoptotic cascade pathways such as Bcl2 family proteins, TP53, death receptor interacting proteins (Vydra et al., 2006). Recently, HSF1-dependent induction of apoptosis in spermatocytes appeared to be related to repression of several genes crucial for spermatogenesis (Kus-Liskiewicz et al., 2013). Lack of the expression of these genes results in derepression of retrotransposons (mainly Line-1) (De Fazio et al., 2011; Vagin et al., 2009; Zheng et al., 2010). The increase in line-1 expression in the present work together with that of HSF1 in adult germ cells from neonatally exposed rats to EDCs is clearly consistent with these observations. Moreover, the decrease in HSPA2 levels resulting from the interaction between the two miRNA pathways may also contribute to maintain the over expression of HSF1. Indeed, HSPA2 is known to inhibit HSF1 by directly binding to its promoter (for a review see, (Anckar and Sistonen, 2011)). The increase in HSF1 expression following HSPA2 knockdown in

GC1 cells reported here is clearly consistent with this. Together, the increased expression of HSF1 might result not only from its demethylated promoter status via the altered miR-29-DNMTs-HSF pathway, but also from the decreased level of HSPA2 via the impaired miR-18a–HSF2–HSPA2 pathway.

The adult germ cell death phenotype supported by an altered balance of HSF/HSP levels related to upstream over expression of miRNA-29 and miR-18a exhibits at least two characteristics. Firstly, among the relevant point in the present study is the reversibility of germ cell death when exposure to xenobiotics occurs during adulthood versus its irreversibility/chronicity when it occurs during the neonatal period. Indeed, while miRNA pathways leading to HSR deregulation in adult germ cells are altered with both neonatal and adult exposure, the impairment of the miRNA-29-DNMT-HSF1 and miR18a-HSF2-HSP70 pathways was reversible only in adult exposure. Therefore, the present data reinforce the concept that the neonatal period represents a critical and vulnerable period leading to the programming of an irreversible disease in adults. Additionally, male infertility could be also now viewed in the general context of the developmental origin of Health and disease (DoHaD) concept (Barker et al., 1989; Hanson and Gluckman, 2008). The DoHaD hypothesis explains how early developmental exposures influence disease onset later in life (for a review, see (Bernal and Jirtle, 2010). This concept, first proposed by David J.P. Barker (Barker et al., 1989), now encompasses the effects of numerous exposures on cancer initiation, developmental disorders, neurological diseases, and metabolic syndromes (Barker, 2000). That the major developmental changes in epigenetic mechanisms occur during this crucial neonatal vulnerable period, has led to the concept of epigenetic programming of adult diseases (for a review, see (Szyf, 2013). Indeed, several studies support the concept that epigenetic programming may play an important role in the reactions of organisms to environmental stresses during critical developmental periods (Hanson and Gluckman, 2008; Mathers and McKay, 2009; Wadhwa et al., 2009). Together, one of the contributions of the present work was to demonstrate that toxic exposure to a compound with endocrine activities could alter the epigenome (at least in its miRNA component) during early development and lead to a programming of an adult reproductive disease. Additionally, it should also be noted that the expression of other epigenetic effectors such as DNMTs (Meunier et al., 2012) and the present study), as well as the histone methyltransferases G9a (Volle et al., 2009)

and the polycomb gene EZH2 (enhancer of zeste homolog 2; manuscript in preparation), can be also altered in this experimental model while leading to adult germ cells death phenotype. Thirdly, alteration of the HSR observed following EDC exposure was clearly related to deregulation of miRNA expression at the tissue and blood plasma levels. Alterations in miRNA levels in plasma clearly make miRNAs potential circulating biomarkers that can help to extend observations to infertile patients. Indeed, several miRNAs previously identified in cells and tissues are also found in extracellular fluids such as the plasma, serum, saliva, urine, semen, vaginal secretions, and menstrual blood (Boon and Vickers, 2013; Chen et al., 2008; Hanson et al., 2009). Circulating miRNAs display several characteristics of appropriate biomarkers: they could be accessible through non-invasive protocols, are inexpensive to quantify, and are specific to the disease of interest. Conservation between human and model organisms makes extracellular miRNAs ideal candidates for non-invasive biomarkers to study various physiopathological conditions in the body (Wu et al., 2012). Because miRNAs were found as upstream deregulators in pathways leading to germ cell death, together with their potential presence in biological fluids, this raised the question of whether the altered levels of miR-29 and miR-18a in testicular tissue is reflected in blood plasma. Rats neonatally exposed to xenoestrogens exhibited increased levels of two miRNAs (miR-18a and miR-29c) in blood plasma. We were unable to detect changes in rat circulating miR-29a and miR-29b levels, as it is possible that some miRNAs such as miR-29b are less stable in blood (Zhang et al., 2011). Together, these observations suggest that adult germ cell death related to increased expression of miR-29 and miR-18a is reflected in blood plasma. This is the first report indicating that changes in adult tissue miRNA levels occurring following neonatal exposure to xenobiotics and leading to an adult disease are translated later during adulthood, at the level of non-invasive (circulating) biomarkers. This might be of major interest with regard to the use of circulating miRNAs as biomarkers to assess the toxicity of chemicals/drugs on reproductive health. Therefore, we further investigated whether miR-29 family members and miR-18a are also affected in infertile patients with altered sperm counts. Infertility is a worldwide reproductive health problem, affecting 10–15% of couples (de Kretser, 1997). Half of these cases are attributed to male factors, and 60–75% of male infertility cases are idiopathic since the molecular mechanisms underlying the defect remain unknown (Guzick et al., 2001). A significant proportion of idiopathic male

infertility is accompanied by severe oligospermia to azoospermia. The data presented in this study clearly indicate that the levels of circulating miR-29a, 29b, 29c, and 18a are increased in the plasma of patients with altered sperm counts. More specifically, while both in the experimental model and in the patient cohort circulating miR-18a and miR-29 family members are increased, our data point to some differences. Indeed, while in the experimental model, miR-18a and miR-29c appear as more appropriate non-invasive biomarkers related to the germ cell death, in the infertile patients, circulating miR-29a and 29c (and to a lesser extent 29b) are clearly more correlated to altered sperm count in patients with moderate oligospermia or azoospermia. We do not know at the present time the reasons for these discrepancies. The possibility exists that the transport and the stability of the miRNAs are different in the experimental rodent used and in humans. It should be noted that while altered levels of miRNAs have been found in seminal plasma and in spermatozoa from infertile patients (Abu-Halima et al., 2013; Wang et al., 2011), this is the first report demonstrating such a miRNA level alteration related to male infertility patients is identified in blood plasma. Moreover, our in vitro and in vivo experimental data related to the increased germ cell death induced by the miRNA expression deregulation together with altered HSPA2 levels in seminal plasma from infertile patients (Cedenho et al., 2006; Motiei et al., 2013) provides a potential basis of explanation for the oligospermia in humans. The evaluation of plasma miRNA levels could be therefore used not only as non-invasive diagnosis biomarkers for infertility but also potential therapeutic targets. Finally, that both miRNA29 and miR18a were first identified as altered circulating biomarkers in the experimental animal model and then used as such in human patients makes of the animal model an appropriate source for the identification of new biomarkers in human diseases.



## MATERIAL AND METHODS

**Subjects.** This study was conducted according to the Declaration of Helsinki for Medical Research involving Human Subjects and the Ethics Committee (Protocol No DC-2013-1894). Informed consent was obtained from all patients. Blood samples from fertile (normal sperm parameters) and infertile (sperm count 0 and  $<15 \times 10^6/\text{ml}$ ) patients were collected from the Department of Obstetrics and Gynaecology, Nice Hospital Center, France. The criterion for inclusion was a male in a relationship undergoing assisted reproduction techniques for infertility. Patients underwent an extensive evaluation, including family and personal history, physical and/or ultrasonographic examination, karyotype, Y deletion. Sperm parameters were evaluated according to standard WHO criteria (WHO, 2010). Hormonal profiles (follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, inhibin B and testosterone) were also determined. Based on the WHO criteria, which fixed the normal sperm count at  $15 \times 10^6$  spermatozoa per ml, the patient population was separated in four groups with normal sperm count (SPGN  $>15 \times 10^6$ :  $56.71 \times 10^6 \pm 30.10$ ,  $n=191$ ), moderate oligospermia ( $1 < \text{Oligo M} < 15 \times 10^6$ :  $7.01 \times 10^6 \pm 3.8$ ,  $n=88$ ), severe oligospermia ( $0 < \text{Oligo S} < 10^6$ :  $0.35 \times 10^6 \pm 0.39$ ,  $n=35$ ) and azoospermia (Azoo =  $0 \times 10^6$ :  $0 \times 10^6 \pm 0$ ,  $n=42$ ). In this study are included only the patients with altered sperm counts from unknown (i.e. idiopathic) origin (excluding hormonal, genetic or chemotherapeutic causes). In the four patient groups, the age was comparable (SPGN:  $36.4 \pm 6.7$ ; Oligo M:  $36.47 \pm 5.95$ ; Oligo S:  $36.03 \pm 5.21$ ; Azoo:  $35.2 \pm 8.8$ ).

**Animals.** Animal experiments were carried out in accordance with EU legislation (Directive 2010/63/EU) and were approved by a Local Animal Care and Use Committee. Estradiol benzoate (EB, Sigma Aldrich, Lyon, France) at doses of 0, 0.75, 1.25, 2.5, 12.5, or 25  $\mu\text{g}/\text{d}$  was administered subcutaneously to male neonatal rats from postnatal day (PND) 1 to PND 5 (Protocol No. 2008-43, (Meunier et al., 2012)). At least ten animals from four litters were used in the untreated and treated groups. Animals were sacrificed on PND90. EB at doses of 0 or 250  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  was administered subcutaneously to male adult (PND90) rats for 5 days (Protocol No. 2012-73). At the end of the treatment, 8 rats in each group were euthanized. The remaining 8 rats in each group were left without treatment for 2 months and were then euthanized (PND150).

**Histology, immunohistochemistry, and in situ apoptosis detection.** Hematoxylin and eosin staining, immunohistochemistry, and TdT-mediated dUTP-X Nick End Labeling (TUNEL) approaches were performed on at least five animals per group (Meunier et al., 2012). Antibodies raised against HSF1, HSF2, HSPA2 were diluted at 1:50, BAX was diluted at 1:100. The secondary antibody either donkey antirabbit (Amersham, Piscataway, NJ), rabbit antimouse, or swine antirabbit (Dako, Glostrup, Denmark) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) or Texas Red-secondary was diluted at 1:30.

**Western blotting analysis.** Frozen testicular tissue was ground in liquid nitrogen to obtain tissue powder. Aliquots (~20 mg) of powder were homogenized in ice-cold hypotonic buffer (25 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, and 1% protease inhibitor cocktail) (Sigma-Aldrich, Meylan, France). Tissue homogenates were further sonicated (10 sec at 80 Watts). Protein concentration was determined with the bicinchoninic acid assay. The experimental procedures were performed as previously described (Benbrahim-Tallaa et al., 2008 ). Antibodies raised against HSF1, HSPA2, Bax, Puma (Cell Signaling, St Quentin en Yvelines, France), HSF2, HSP60/HSPD1, HSP90, Bcl2, Bcl-xL (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Mcl-1 (Rockland, Gilbertsville, PA), and actin (1:10,000; Jackson's Laboratory, Bar Harbor, ME) were diluted 1:1,000, unless otherwise noted, and used for immunoblotting. Membranes were scanned with a luminescent image analyzer 3000 CCD camera (Fujifilm, Dusseldorf, Germany) and quantified with MultiGauge software (Fujifilm).

**Real-time quantitative PCR for mRNA expression.** Total RNA was isolated from frozen testicular powder using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) coupled with column purification of RNA using the RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and DNase treatment. Complementary DNA was synthesized from total RNA (1 µg) as described previously (Meunier et al., 2012). A 1:20 dilution of the reverse transcribed product was used for real-time PCR analyses with SYBR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described previously (Meunier et al., 2012). The sequences of the primers were as follows: HSF1, 5' CCCTGAAGAGTGAGGACATAA3' (forward), 5'GCTGGAGATGGAGCTGAGTA3' (reverse); HSF2, 5'TAAATGGCTCCTCCAACCTG3' (forward), 5'CCAACAGCTCAACCTTTCCTA 3' (reverse); HSPA2, 5'AGACGCAGACCTTCACTAC3' (forward), 5'TTTTGTCTGCTCGCTAATC3'

(reverse); Actin, 5'AGCCTCGCCTTTGCCG3' (forward), 5'CTGGTGCCTGGGGCG3' (reverse). Data were normalized to actin levels.

**Real-time RT-PCR analysis of microRNA expression.** 12.5 nanograms of total RNA, obtained as described above, was reverse transcribed using the stem-loop method (Applied Biosystems) as previously described (Meunier et al., 2012). For qPCR, 2.5 µl of the reverse transcribed product (1:20 dilution for PND21, PND30, and PND90, and 1:5 dilution for PND6) was assayed using TaqMan Universal PCR master mix and TaqMan miRNA (18a, 29a, 29b, and 29c, Applied Biosystems) primers/probes. Data were normalized to SnoRNA202.

**Detection of DNA methylation by MeDIP-qPCR.** DNA was isolated from frozen testicular powder using the DNeasy<sup>®</sup> blood and tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Six micrograms of DNA were digested with 24U of Mse I enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA) supplemented with 100 ng/µl Bovine Serum Albumine overnight at 37°C. The reaction was stopped by heating the samples for 20 min at 65°C and then purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). MseI-digested DNA was run on a 2% agarose gel to verify the fragment size of 200-1,000 bp. MseI-digested DNA was defined as the input DNA. One microgram of MseI-digested DNA was incubated with magnetic beads coupled with MBD2 protein (EpiXplore<sup>™</sup> methylated DNA enrichment kit, Clontech, Mountain View, CA). Beads were washed to remove non- and hypo-methylated DNA. The enriched methylated DNA fraction was eluted with high salt buffer and then purified by precipitation according to the manufacturer's instructions. This fraction was defined as MeDIP DNA. Five nanograms of input and MeDIP DNA were subject to real-time qPCR as described above. The levels of methylated DNA were calculated according to the following formula:  $2^{-(Ct(\text{Input}) - Ct(\text{MeDNA-IP}))}$ . The sequences of the primers used were as follows: HSF1, 5'CGCGCCGGCTACCGATTTAC3' (forward), 5'GTGCGCAGGCGCTGTGATCT3' (reverse); LINE1, 5'CCTGGTGAGCTTGGGACA3' (forward), 5'CTCAGGAGTGCCACCTGAC3' (reverse); H19, 5'AACTCGAGGAGAGCGATCCG3' (forward), 5'ACCTGTATCGGGGTACGACCGA3' (reverse).

**Cell culture and transfection.** GC-1 cell line (which harbors features of type B spermatogonia and primary spermatocytes), provided by Pr Chambon (IGBMC,

Strasbourg, France), was 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, Cergy Pontoise, France) at 37°C in a humidified, CO<sub>2</sub>-controlled (5%) incubator. Synthetic miRNAs (50 nM each; miR-18a - UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG-, miR-29a - UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-, miR-29b - UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-, miR-29c UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA-, or a scrambled negative control, Ambion/Life Technologies Saint-Aubin, France) or small interfering RNA (siRNA, 50 nM each; HSF1, HSF2 - GGAAGAUUGUCCAGUUUUAU- Sigma-Aldrich, or HSPA2 - GCGUGAUCGCCGGUCUAAA- Sigma-Aldrich, or scrambled negative siRNA, Dharmacon/Thermo-Scientific, Illkirch, France) were transiently transfected into cells cultured in 12-well plates with Interferin reagent (Polyplus, Strasbourg, France) according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). Cells were harvested after transfection for 16 h (flow cytometry) or 48 h, and protein or RNA were isolated.

**Cytometry analysis.** GC-1-transfected cells were harvested with accutase (Sigma-Aldrich, Meylan, France). After centrifugation, the cells were stained with the FITC-labeled annexin V/Propidium Iodide (PI) apoptosis kit (Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach, Germany), and analyzed on an MACS Quant instrument. At least 10,000 events were analyzed per tube.

**Statistics.** Data were analyzed using GraphPad software (version 4.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Values were expressed as the mean ± SEM (Standard Error of Mean) to account for variations among samples and animals within a dataset. Student's *t*-test for single comparisons or ANOVA (Analysis of Variance) for multiple comparisons was performed to determine whether there were significant differences between groups ( $p < 0.05$ ). For ANOVA, this was followed by the Bonferroni post-hoc test if  $p < 0.05$ , which determined the significance of differences between pairs of groups.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the university Nice-Sophia-Antipolis, the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie and BASF Agro convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE doctoral grant to N.L.), the European Chemical Industry Council (CEFIC-LRI) and BASF Agro (fellowships to B.S.), the Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-06-SEST-13, the Program National de Recherche en Alimentation et Nutrition Humaine Grant ANR-07-PNRA-016, the Program National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens Grant PNRPE-2009-12, the Nord Pas-de-Calais region (SER-2007) and the Ministère de L'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement (MEDDTL) Grant 11-MRES-PNRPE-1-CVS-027 2011.

The authors acknowledge the C3M Imaging Core Facility (Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, MICA) and C3M animal room facility.

The original data are patented in the following EU patents: EP11 306 451.3 and EP13 305 600.2.

## REFERENCES

- Abu-Halima, M., M. Hammadeh, J. Schmitt, P. Leidinger, A. Keller, E. Meese, and C. Backes. 2013. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril* 99:1249-1255 e1216.
- Akerfelt, M., R.I. Morimoto, and L. Sistonen. 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:545-555.
- Alastalo, T.P., M. Hellesuo, A. Sandqvist, V. Hietakangas, M. Kallio, and L. Sistonen. 2003. Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. *J Cell Sci* 116:3557-3570.
- Anckar, J., and L. Sistonen. 2011. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 80:1089-1115.
- Atanassova, N., C. McKinnell, K.J. Turner, M. Walker, J.S. Fisher, M. Morley, M.R. Millar, N.P. Groome, and R.M. Sharpe. 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141:3898-3907.
- Balch, W.E., R.I. Morimoto, A. Dillin, and J.W. Kelly. 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319:916-919.
- Barker, D.J. 2000. In utero programming of cardiovascular disease. *Theriogenology* 53:555-574.
- Barker, D.J., P.D. Winter, C. Osmond, B. Margetts, and S.J. Simmonds. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2:577-580.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
- Benbrahim-Tallaa, L., B. Siddeek, A. Bozec, V. Tronchon, A. Florin, C. Friry, E. Tabone, C. Mauduit, and M. Benahmed. 2008 Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. *J Endocrinol* 196:21-31.
- Bernal, A.J., and R.L. Jirtle. 2010. Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:938-944.
- Bjork, J.K., A. Sandqvist, A.N. Elsing, N. Kotaja, and L. Sistonen. 2010. miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. *Development* 137:3177-3184.
- Boon, R.A., and K.C. Vickers. 2013. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:186-192.
- Bozec, A., F. Chuzel, S. Chater, C. Paulin, R. Bars, M. Benahmed, and C. Mauduit. 2004. The mitochondrial-dependent pathway is chronically affected in testicular germ cell death in adult rats exposed in utero to anti-androgens. *J Endocrinol* 183:79-90.

- Cedenho, A.P., S.B. Lima, M.A. Cenedeze, D.M. Spaine, V. Ortiz, and S. Oehninger. 2006. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 21:1791-1794.
- Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, K. Zen, and C.Y. Zhang. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997-1006.
- De Fazio, S., N. Bartonicek, M. Di Giacomo, C. Abreu-Goodger, A. Sankar, C. Funaya, C. Antony, P.N. Moreira, A.J. Enright, and D. O'Carroll. 2011. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* 480:259-263.
- de Kretser, D.M. 1997. Male infertility. *Lancet* 349:787-790.
- Dix, D.J., J.W. Allen, B.W. Collins, C. Mori, N. Nakamura, P. Poorman-Allen, E.H. Goulding, and E.M. Eddy. 1996. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3264-3268.
- Fujimoto, M., and A. Nakai. 2010. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J* 277:4112-4125.
- Garzon, R., C.E. Heaphy, V. Havelange, M. Fabbri, S. Volinia, T. Tsao, N. Zanesi, S.M. Kornblau, G. Marcucci, G.A. Calin, M. Andreeff, and C.M. Croce. 2009. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 114:5331-5341.
- Guzick, D.S., J.W. Overstreet, P. Factor-Litvak, C.K. Brazil, S.T. Nakajima, C. Coutifaris, S.A. Carson, P. Cisneros, M.P. Steinkampf, J.A. Hill, D. Xu, and D.L. Vogel. 2001. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345:1388-1393.
- Hanson, E.K., H. Lubenow, and J. Ballantyne. 2009. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem* 387:303-314.
- Hanson, M.A., and P.D. Gluckman. 2008. Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:90-93.
- He, L., and G.J. Hannon. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5:522-531.
- Hunt, C., and R.I. Morimoto. 1985. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6455-6459.
- Kallio, M., Y. Chang, M. Manuel, T.P. Alastalo, M. Rallu, Y. Gitton, L. Pirkkala, M.T. Loones, L. Paslaru, S. Larney, S. Hiard, M. Morange, L. Sistonen, and V. Mezger. 2002. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J* 21:2591-2601.
- Kim, V.N., and J.W. Nam. 2006. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 22:165-173.
- Kus-Liskiewicz, M., J. Polanska, J. Korfanty, M. Olbryt, N. Vydra, A. Toma, and W. Widlak. 2013. Impact of heat shock transcription factor 1 on global gene

- expression profiles in cells which induce either cytoprotective or pro-apoptotic response following hyperthermia. *BMC Genomics* 14:456.
- Lecomte, S., F. Desmots, F. Le Masson, P. Le Goff, D. Michel, E.S. Christians, and Y. Le Drean. 2010. Roles of heat shock factor 1 and 2 in response to proteasome inhibition: consequence on p53 stability. *Oncogene* 29:4216-4224.
- Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151-1191.
- Lindquist, S., and E.A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-677.
- Mathers, J.C., and J.A. McKay. 2009. Epigenetics - potential contribution to fetal programming. *Adv Exp Med Biol* 646:119-123.
- Mathews, E., T.D. Braden, C.S. Williams, J.W. Williams, O. Bolden-Tiller, and H.O. Goyal. 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. *Toxicol Sci* 112:331-343.
- McIntyre, B.S., N.J. Barlow, and P.M. Foster. 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. *Toxicol Sci* 62:236-249.
- Meunier, L., B. Siddeek, A. Vega, N. Lakhdari, L. Inoubli, R.P. Bellon, G. Lemaire, C. Mauduit, and M. Benahmed. 2012. Perinatal Programming of Adult Rat Germ Cell Death After Exposure to Xenoestrogens: Role of microRNA miR-29 Family in the Down-Regulation of DNA Methyltransferases and Mcl-1. *Endocrinology* 153:1936-1947.
- Mori, C., N. Nakamura, D.J. Dix, M. Fujioka, S. Nakagawa, K. Shiota, and E.M. Eddy. 1997. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. *Dev Dyn* 208:125-136.
- Morimoto, R.I. 2008. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 22:1427-1438.
- Motiei, M., M. Tavalaei, F. Rabiei, R. Hajhosseini, and M.H. Nasr-Esfahani. 2013. Evaluation of HSPA2 in fertile and infertile individuals. *Andrologia* 45:66-72.
- Mou, L., Y. Wang, H. Li, Y. Huang, T. Jiang, W. Huang, Z. Li, J. Chen, J. Xie, Y. Liu, Z. Jiang, X. Li, J. Ye, Z. Cai, and Y. Gui. 2013. A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia. *Hum Genet* 132:159-165.
- Nakai, A., M. Suzuki, and M. Tanabe. 2000. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J* 19:1545-1554.
- Omezzine, A., S. Chater, C. Mauduit, A. Florin, E. Tabone, F. Chuzel, R. Bars, and M. Benahmed. 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* 144:648-661.



- Ostling, P., J.K. Bjork, P. Roos-Mattjus, V. Mezger, and L. Sistonen. 2007. Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J Biol Chem* 282:7077-7086.
- Pasquinelli, A.E., S. Hunter, and J. Bracht. 2005. MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev* 15:200-205.
- Plasterk, R.H. 2006. Micro RNAs in animal development. *Cell* 124:877-881.
- Richter, K., M. Haslbeck, and J. Buchner. 2010. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* 40:253-266.
- Ron, D., and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519-529.
- Sarge, K.D., S.P. Murphy, and R.I. Morimoto. 1993. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 13:1392-1407.
- Shinkawa, T., K. Tan, M. Fujimoto, N. Hayashida, K. Yamamoto, E. Takaki, R. Takii, R. Prakasam, S. Inouye, V. Mezger, and A. Nakai. 2011. Heat shock factor 2 is required for maintaining proteostasis against febrile-range thermal stress and polyglutamine aggregation. *Mol Biol Cell* 22:3571-3583.
- Szyf, M. 2013. How do environments talk to genes? *Nat Neurosci* 16:2-4.
- Takada, S., E. Berezikov, Y.L. Choi, Y. Yamashita, and H. Mano. 2009. Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA* 15:1507-1514.
- UNEP/WHO. 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals. In United Nations Environment Programme/World Health Organization, Geneva.
- Vagin, V.V., J. Wohlschlegel, J. Qu, Z. Jonsson, X. Huang, S. Chuma, A. Girard, R. Sachidanandam, G.J. Hannon, and A.A. Aravin. 2009. Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev* 23:1749-1762.
- Veeck, J., and M. Esteller. 2010. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15:5-17.
- Volle, D.H., M. Decourteix, E. Garo, J. McNeilly, P. Fenichel, J. Auwerx, A.S. McNeilly, K. Schoonjans, and M. Benahmed. 2009. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 119:3752-3764.
- Vydra, N., E. Malusecka, M. Jarzab, K. Lisowska, M. Glowala-Kosinska, K. Benedyk, P. Widlak, Z. Krawczyk, and W. Widlak. 2006. Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells. *Cell Death Differ* 13:212-222.
- Wadhwa, P.D., C. Buss, S. Entringer, and J.M. Swanson. 2009. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med* 27:358-368.
- Wang, C., C. Yang, X. Chen, B. Yao, C. Zhu, L. Li, J. Wang, X. Li, Y. Shao, Y. Liu, J. Ji, J. Zhang, K. Zen, C.Y. Zhang, and C. Zhang. 2011. Altered profile of

- seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem* 57:1722-1731.
- Wang, G., J. Zhang, D. Moskophidis, and N.F. Mivechi. 2003. Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. *Genesis* 36:48-61.
- WHO. 2010. Department of Reproductive Health and Research World Health Organisation (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cambridge University Press, Cambridge. 287 pp.
- Widlak, W., K. Benedyk, N. Vydra, M. Glowala, D. Scieglinska, E. Malusecka, A. Nakai, and Z. Krawczyk. 2003. Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific hst70 gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium. *Acta Biochim Pol* 50:535-541.
- Wu, C. 1995. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:441-469.
- Wu, W., Z. Hu, Y. Qin, J. Dong, J. Dai, C. Lu, W. Zhang, H. Shen, Y. Xia, and X. Wang. 2012. Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status. *Mol Hum Reprod* 18:489-497.
- Xing, H., D.C. Wilkerson, C.N. Mayhew, E.J. Lubert, H.S. Skaggs, M.L. Goodson, Y. Hong, O.K. Park-Sarge, and K.D. Sarge. 2005. Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science* 307:421-423.
- Yasuda, Y., T. Kihara, T. Tanimura, and H. Nishimura. 1985. Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice. *Teratology* 32:219-227.
- Zhang, Z., J. Zou, G.K. Wang, J.T. Zhang, S. Huang, Y.W. Qin, and Q. Jing. 2011. Uracils at nucleotide position 9-11 are required for the rapid turnover of miR-29 family. *Nucleic Acids Res* 39:4387-4395.
- Zheng, K., J. Xiol, M. Reuter, S. Eckardt, N.A. Leu, K.J. McLaughlin, A. Stark, R. Sachidanandam, R.S. Pillai, and P.J. Wang. 2010. Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11841-11846.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Neonatal exposure to EB induces a germ cell apoptotic phenotype in adult testes.** Representative micrographs of (A) testes, (B) H&E-stained testes, and (C) TUNEL-stained testes from 90-d-old rats exposed from PND1 to PND5 to vehicle (0) or EB (2.5, 12.5, or 25 µg/d). The green fluorescent signal corresponds to TUNEL-positive (apoptotic) cells. Nuclei were counterstained with DAPI (blue signal).

(D) Bax, Puma, Bcl2, Bcl-xL, and Mcl1 protein levels in adult rat testes from unexposed (0) or 0.75, 1.25, or 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  EB-exposed rats were quantified by Western blot analysis. Representative autoradiograms (left) are shown. Histograms (right) represent protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/actin) in the untreated group. (E) Representative micrographs of BAX-stained testes from 90-d-old rats neonatally (PND1 to PND5) exposed to vehicle (0) or EB (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ). The red fluorescent signal corresponds to BAX-positive cells. Nuclei were counterstained with DAPI (blue signal). (F) Bax protein levels in immature (PND6), juvenile (PND21 and PND30), and adult (PND90) rats unexposed (Ct) or exposed neonatally to EB (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) were quantified by Western blot analysis. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from 5–7 rats per treatment (\*  $p < 0.05$ ).

**Figure 2. Neonatal exposure to EB induces long-term alterations in HSF1, HSF2, and HSPA2 levels.** (A) Immunoblots of HSF1, HSF2, HSPD1, HSPA2, and HSP90 performed on protein extracts from rat testes unexposed (0) or exposed to 0.75, 1.25, or 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  EB. Representative autoradiograms (left) are shown. Histograms (right) represent HSF1, HSF2, HSPD1, HSPA2, and HSP90 protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/actin) in the untreated group. Results are expressed as a mean  $\pm$  SEM determined from seven rats per treatment (\*  $p < 0.05$ ). (B, left) Immunoblots of HSF1, HSF2, and HSPA2 performed on protein extracts from immature (PND6), juvenile (PND21 and PND30), and adult (PND90) rats testes exposed neonatally to vehicle (Ct) or EB (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ). (B, right) HSF1, HSF2, and HSPA2 mRNA levels in adult rat testes from unexposed (0) and 2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  EB-exposed rats were determined by real-time RT-PCR. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from 5–7 rats per treatment (\*  $p < 0.05$ ). (C) Representative micrographs of HSF1-, HSF2-, and HSPA2-stained testes from untreated (0) and EB-treated (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) adult (PND90) rats from PND1 to PND5. The red fluorescent signal corresponds to HSF1-positive or HSPA2-positive cells, while the green fluorescent signal corresponds to HSF2-positive cells. Nuclei were counterstained with DAPI (blue signal).

**Figure 3. MiR-18a is an upstream regulator of the HSF2/HSPA2 pathway.** (A) In silico analysis of the Hsf2 3'UTR shows the likely formation of a duplex between Hsf2 and miR-18a. The binding site is conserved among several mammalian species. The

seed-recognizing site is marked in bold. (B) Mature miR-18a levels in immature (PND6), juvenile (PND21 and PND30), and adult (PND90) rat testes from unexposed (Ct) or EB-exposed (2.5 µg/d) rats were quantified by real-time PCR. Histograms represent relative miRNA levels normalized to small nucleolar RNA levels. Results are expressed as the mean ± SEM determined from 7–8 rats (\* p < 0.05). (C) The apoptotic rate in a testicular germ cell line (GC1) was determined by flow cytometry after transient transfection (16 h) with a scrambled miRNA mimic (scrambled) or a miR-18a mimic. Apoptotic (annexin V-positive) cells were observed in the upper left quadrant. Representative histograms of GC1 cells stained with FITC-labeled annexin V and PI are shown. (D) GC1 cells were transiently transfected (16 h for CASP3 and CLEAVED-CASP3, and 48 h for HSF2 and HSPA2) with a scrambled miRNA or a miR-18a mimic before protein levels were evaluated. Data are presented as the mean ± SD from three independent experiments (n=4 for each experiment; \* p < 0.05) (C, D).

**Figure 4. MiR-29 family members induce germ cell apoptosis by reducing DNMT expression, resulting in increased expression of HSF1.** (A) CpG sites (vertical bars) and islands (pink box) around the transcription start site of the Hsf1 gene were predicted (RGD: 620913, chr7: 114,523,000...114,528,464) using Methyl Primer Express (Applied Biosystems). The primer set used to amplify the CpG island upstream of the transcription start site was designed using Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). (B) The methylation status of HSF1, Line1, and H19 was performed by comparing expression between MeDIP DNA and input DNA by real-time PCR in testes from untreated (0) or EB-treated (2.5 µg/d) adult rats. Results are expressed as the mean ± SEM determined from at least seven rats (\* p < 0.05). (C) The HSF1 protein level in GC-1 cells transiently transfected (48 h) with siRNA directed against DNMT1, 3a, or 3b was determined. Representative autoradiograms are shown. Histograms represent the HSF1 protein level expressed as a percentage of the ratio (HSF1 protein/actin) detected in cells incubated with scrambled (siCTRL) or siRNA DNMTs. Results are expressed as the mean ± SEM determined from at least three independent experiments, with quadruplicate data points in each experiment (\* p < 0.05). (D) The apoptotic rate in GC-1 cells was visualized by annexin-V-FITC/PI flow cytometry after transfection with control miRNA (scrambled) or a miRNA mimic for miR-29a or c. Apoptotic (annexin V-positive) cells

were observed in the upper left quadrant, and at least 10,000 events were counted. The apoptotic rate (histogram) is expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from at least three independent experiments, with quadruplicate data points in each experiment (\*  $p < 0.05$ ). The apoptotic rate was analyzed similarly after transfection with control siRNA (siRNA0) or siRNA raised against DNMT3A (siDNMT3A). (E) Mature miR-29a, b, and c levels in immature (PND6), juvenile (PND21 and PND30), or adult (PND90) testes from untreated rats were quantified by real-time PCR (left). Mature miR-29a, b, and c levels were determined in the testes from untreated (Ct) rats or rats neonatally exposed to EB (2.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ , EB) at different ages (PND6, PND21, PND30, and PND90) (right). Histograms represent relative miRNA levels normalized to small nucleolar RNA levels. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from 7–8 rats (\*  $p < 0.05$ ). (F) The protein levels of HSF1, DNMT3B, and DNMT3A were determined in GC-1 cells transiently transfected (48 h) with scrambled miRNA (scrambled) or a miRNA mimic for miR-29a, b, or c. Representative autoradiograms are shown. Histograms represent protein levels expressed as a percentage of the ratio (target protein/actin) detected in the scramble-treated control cells. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM from at least four independent experiments (\*  $p < 0.05$ ). (G) GC1 cells were transiently transfected (48 h) with control siRNA (siRNA0), or siRNA against HSPA2 or HSF2. HSF1 protein levels were analyzed by Western blotting. Results (histograms) are expressed as the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments ( $n=4$  for each experiment; \*  $p < 0.05$ ).

**Figure 5. Adult exposure to EB induces reversible hypospermatogenesis.** Adult rats (PND90) were untreated (0) or treated for 5 days with EB (2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ , EB). Thereafter, animals were sacrificed just after treatment (PND90) or left without additional treatment until PND150 to determine the reversibility of the EB effects. (A) TUNEL was performed in testes. The green fluorescent signal (arrow) corresponds to TUNEL-positive (apoptotic) cells. Nuclei were counterstained with DAPI (blue signal). Histograms represent the number of TUNEL-positive cells per 100 seminiferous tubules. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM from at least six rats (\*  $p < 0.05$ ). (B) HSF1, HSF2, and HSPA2 levels were quantified by Western blot analysis in testes. Representative autoradiograms (right) are shown. Histograms (left) represent protein levels expressed as a percentage ratio (target protein/actin) detected in untreated rats. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM from at least eight rats (\*  $p$

<0.05). (C) Mature miR-18a, miR-29a, b, and c levels were quantified by qPCR in testes. Histograms represent relative miRNA levels normalized to small nucleolar RNA levels. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM from at least eight rats (\* p <0.05).

**Figure 6. MiR-18a and miR-29 as circulating biomarkers of hypospermatogenesis.** (A) Mature miR-18a, 29a, 29b, and 29c levels were quantified by qPCR in blood from adult (PND90) rats unexposed (0) or EB-exposed at neonatal period (2.5  $\mu$ g/d). Histograms represent relative miRNA levels normalized to the cel-miR-39 level. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from 7–8 animals (\*, P < 0.05). (B) Mature miR-18a, 29a, 29b, and 29c levels were quantified by qPCR in the blood from men with normal spermograms (SPGN) or with moderate (Oligo M) or severe (Oligo S) oligospermia or azoospermia (Azoo). Histograms represent relative miRNA levels normalized to the cel-miR-39 level. Results are expressed mean  $\pm$  SEM (\*, P < 0.05).

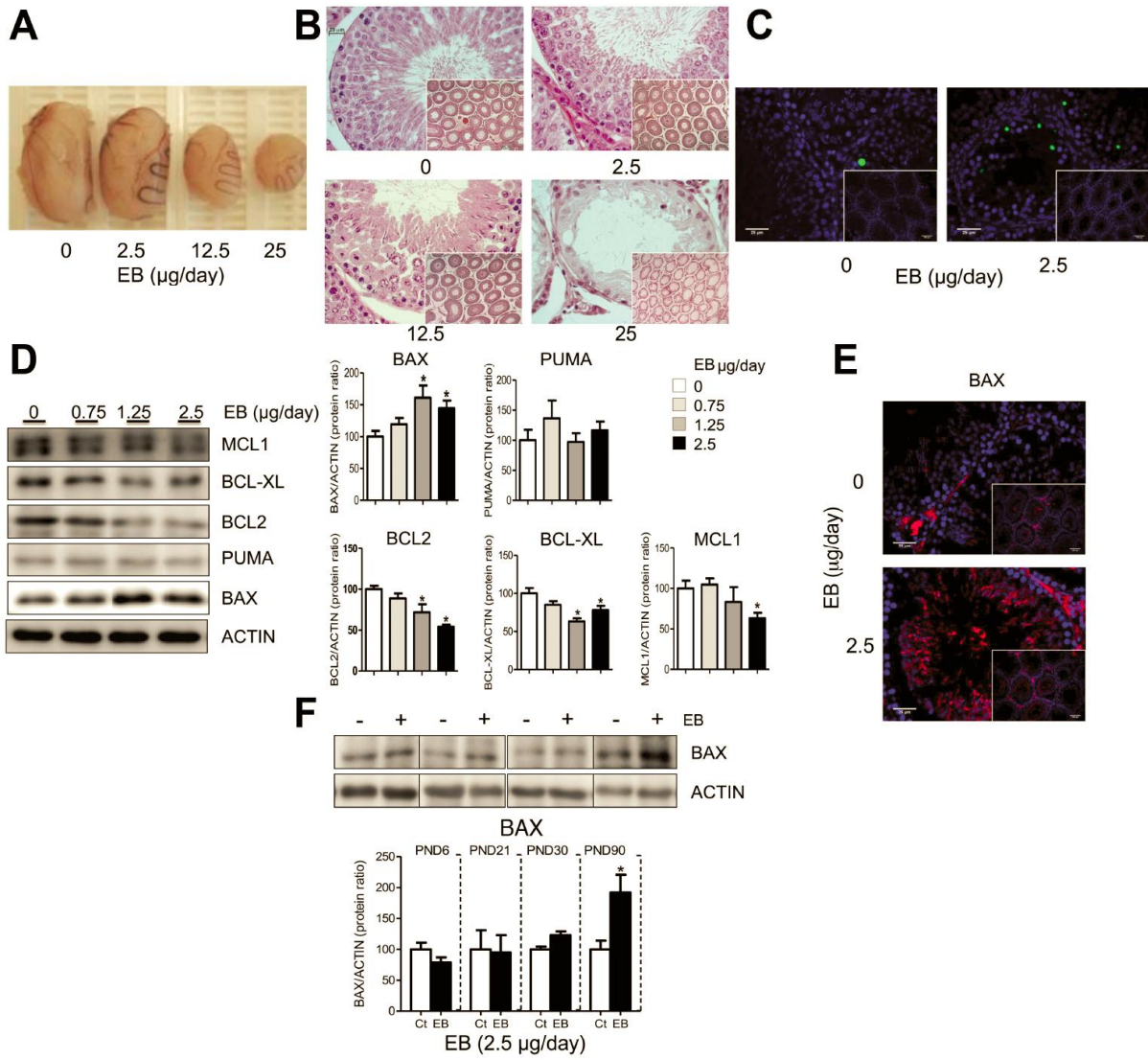
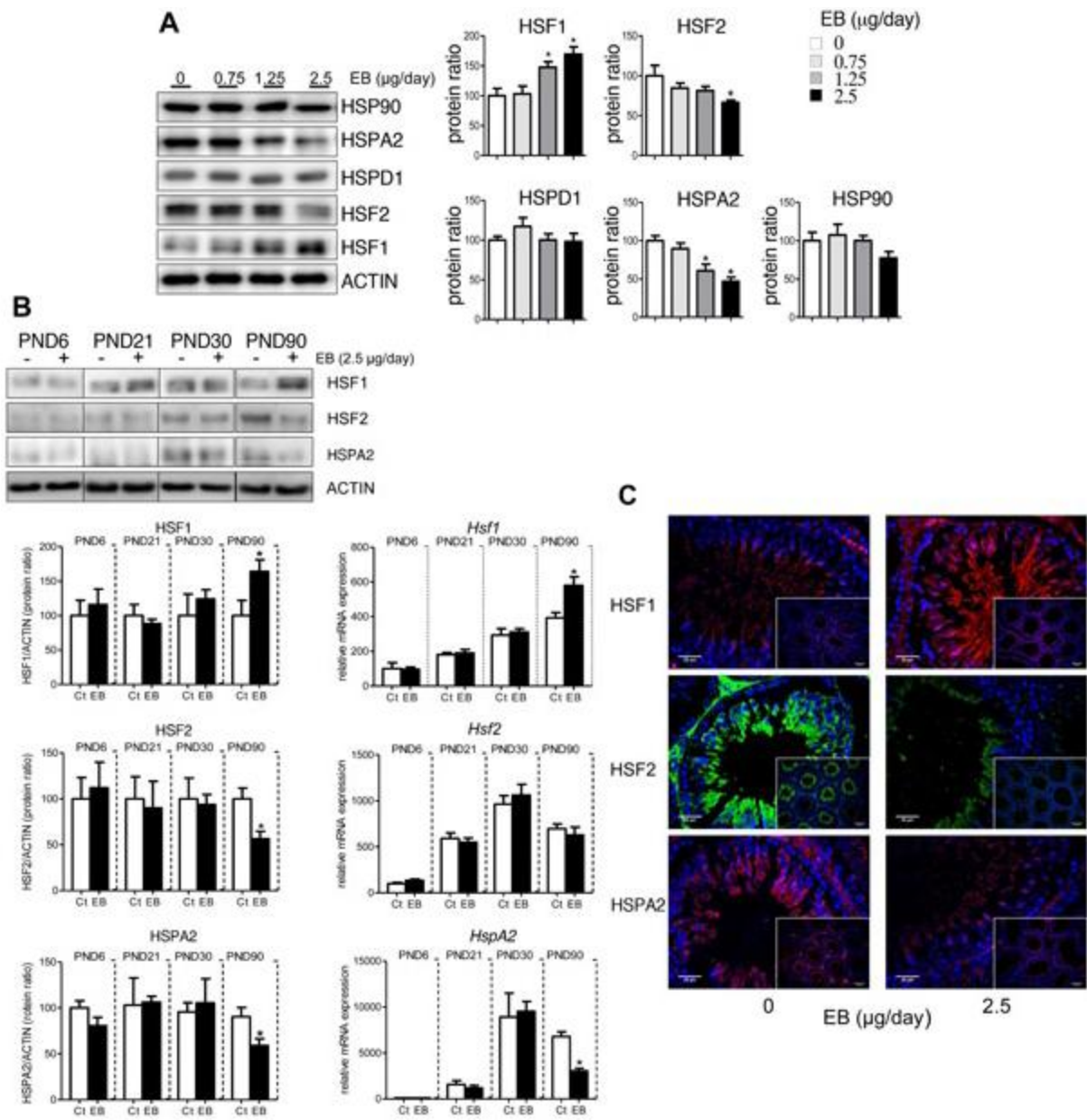


Figure 1

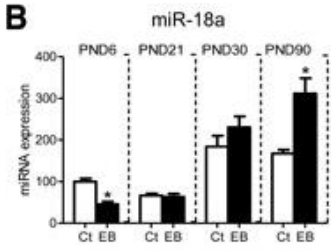
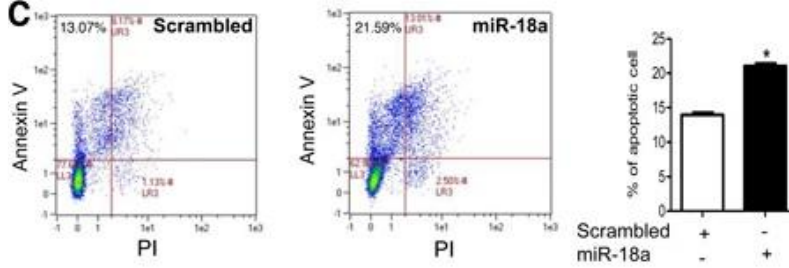
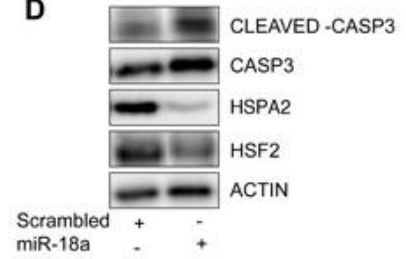


**Figure 2**



**A**

*Homo sapiens* (Position 127-133 of HSF2 3' UTR) 5' ACUGUGGAAUAAAA**GCACCUU**UUGC 3'  
*Mus musculus* (Position 102-108 of HSF2 3' UTR) 5' ACUGUGGAAUCAAA**GCACCUU**UUGC 3'  
*Rattus norvegicus* (Position 116-122 of HSF2 3' UTR) 5' ACUGUGGAAUAAAA**GCACCUU**UUGC 3'  
 miR-18a 3' GAUAGACGUGAUCUAC**CGUGGAAU** 5'

**B****C****D****Figure 3**

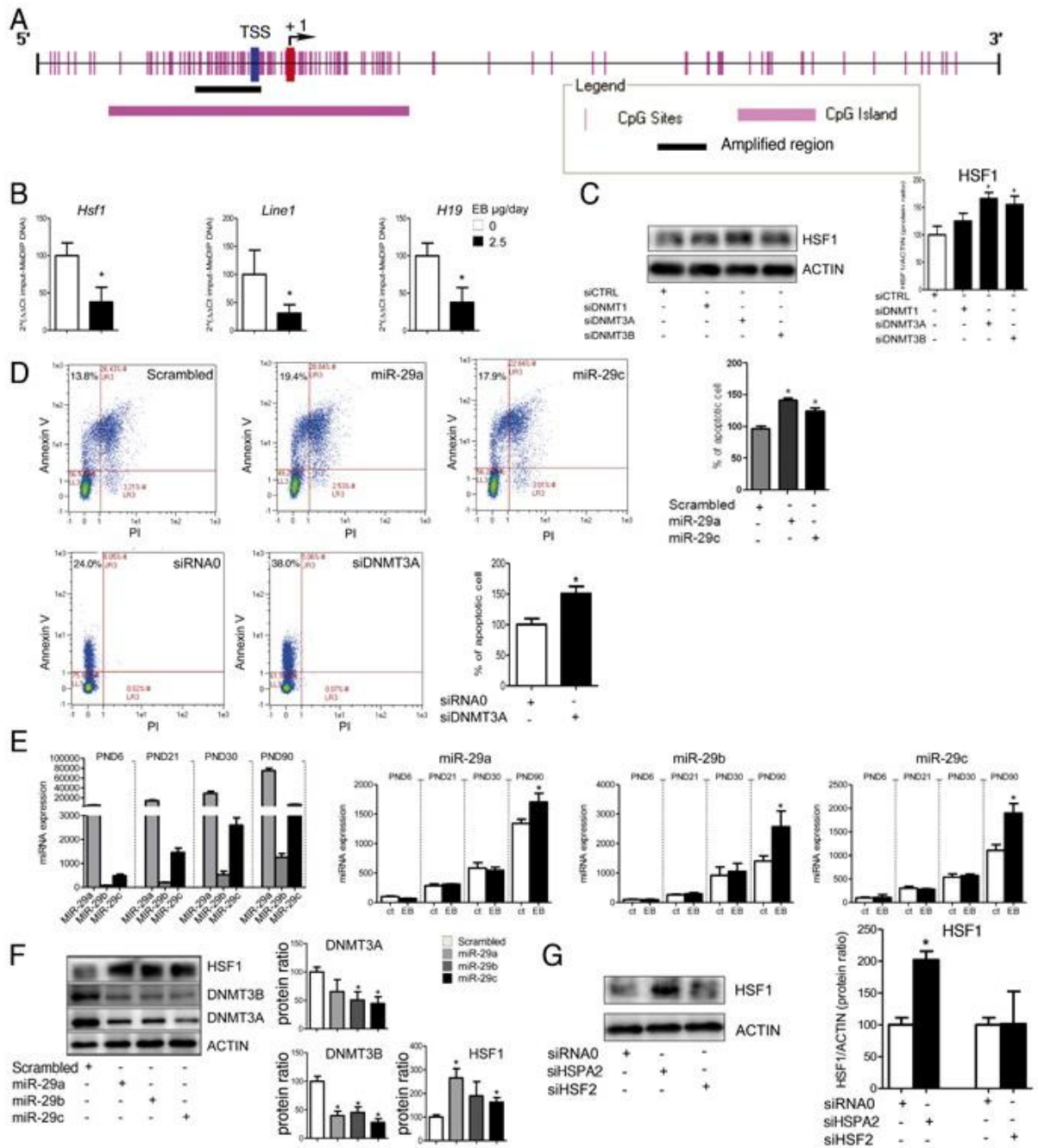


Figure 4

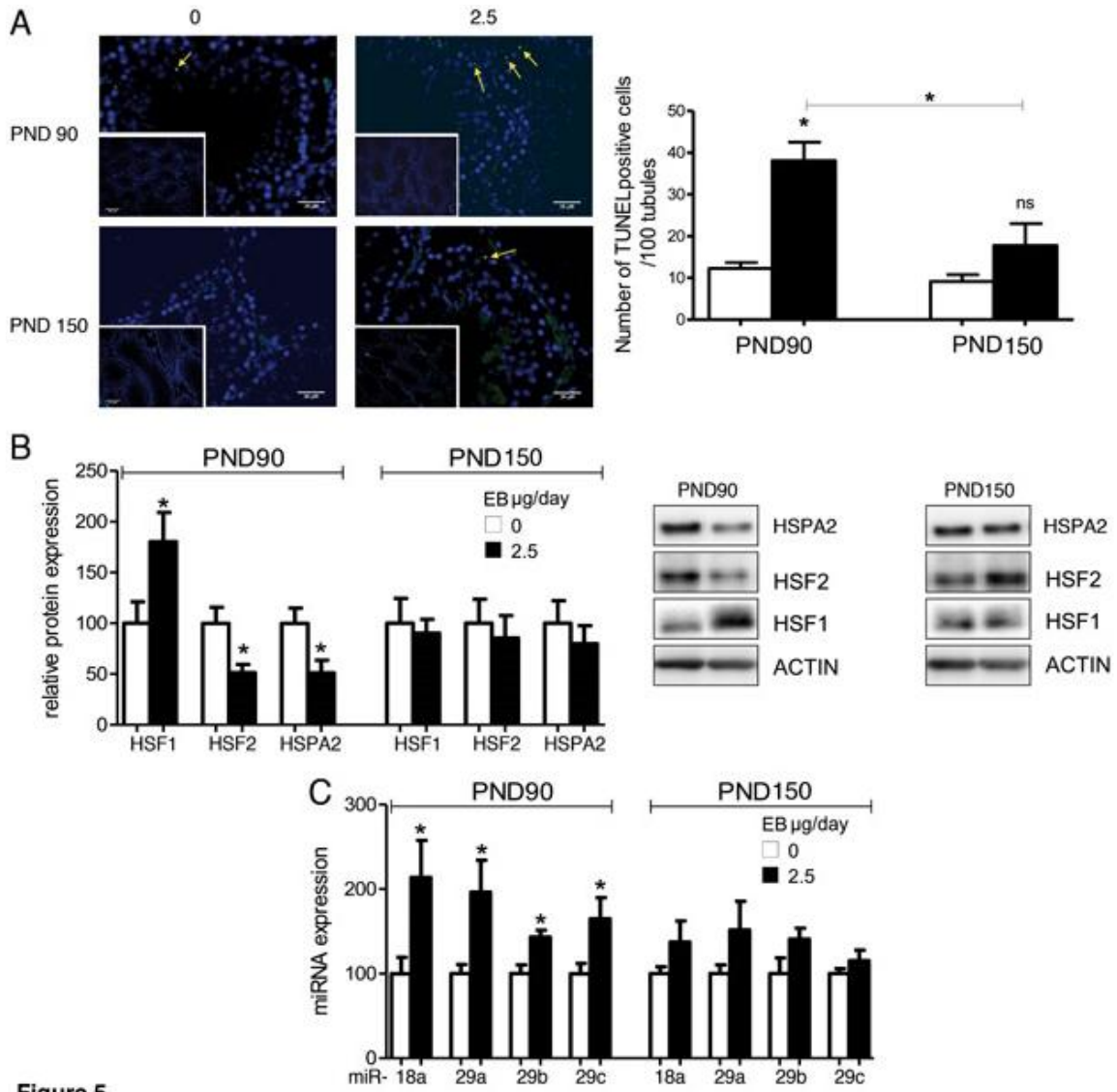
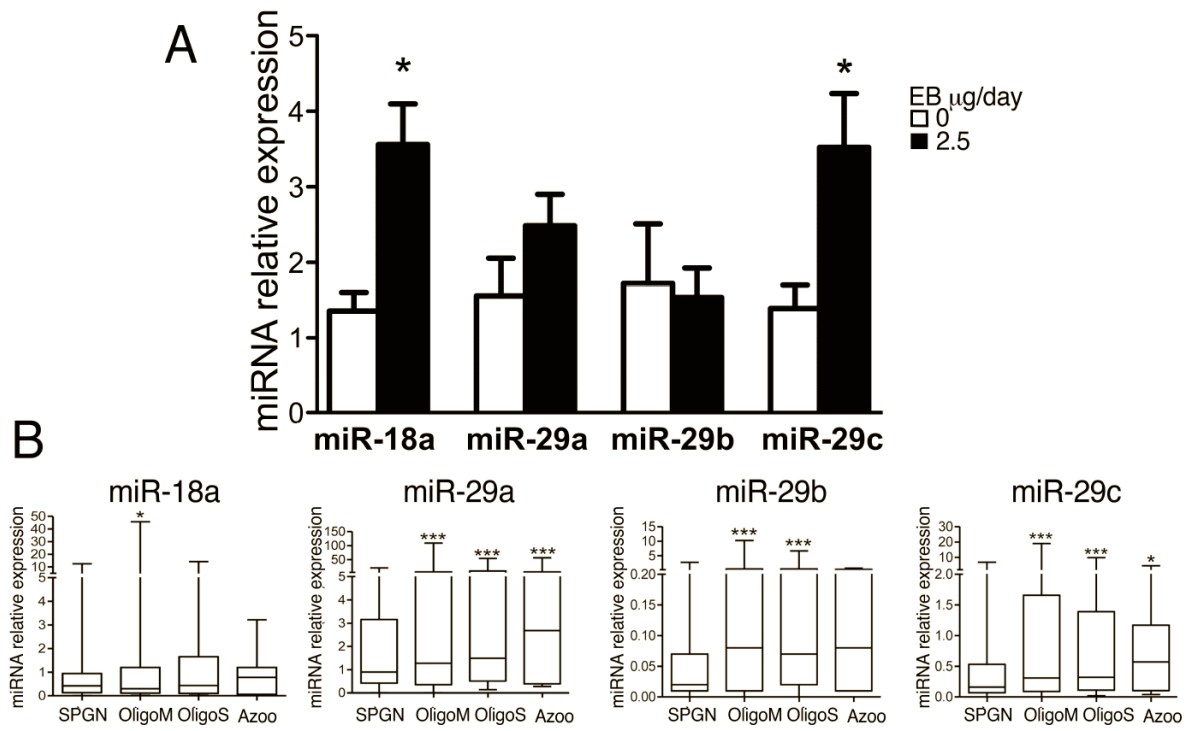


Figure 5



**Figure 6**

## ***III. Discussion***

# *Discussion*

Nous vivons dans un monde où les produits industriels sont omniprésents dans notre vie de tous les jours. Nous « baignons » quotidiennement dans environ 100 000 molécules chimiques. A partir de 1997, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a posé le problème des effets potentiels de ces produits sur la santé humaine et de la faune sauvage (en particulier à travers la perturbation du système hormonal des individus (notion de perturbateurs endocriniens). Pour essayer d'apporter les preuves d'un lien entre PEE et santé humaine, différentes équipes, dont notre laboratoire a mis en place des modèles expérimentaux d'exposition périnatale aux PEE (estrogénomimétique, anti-androgènes). En 2002, à partir des données obtenues des études épidémiologiques et des modèles expérimentaux, l'OMS a reconnu le risque que représentaient les PEEs pour certaines catégories de la population comme les femmes enceintes/le fœtus, les enfants ou bien pour la fertilité des populations. Dans ce contexte, le nouveau défi était d'identifier les mécanismes d'action des PEE de manière à déterminer des biomarqueurs de leur action et de mettre en place des outils pour le criblage de ces molécules.

## ***1- Exposition néonatale à l'EB : présentation d'un modèle expérimental isomorphe pour l'étude de l'hypospermatogenèse due à une apoptose chronique des cellules germinales.***

Le modèle que nous avons utilisé, au cours ce travail de thèse, est celui d'une exposition néonatale (jours 1 à 5 après la naissance) à un analogue d'estrogènes (estradiol benzoate, EB). L'EB est un estrogène pur qui en tant que tel, sert de composé modèle pour les PEEs ayant une activité estrogénique. La période jours 1 à 5 chez le rat correspond, chez l'homme, à la période développementale entre le second et le troisième trimestre de grossesse [717] soit la phase d'organisation du tractus génital mâle. L'exposition néonatale à l'EB provoque chez les rats mâles adultes des altérations tractus génital, proche du syndrome de dysgénésie testiculaire: une hypospermatogenèse plus ou moins sévère, éventuellement associée aux plus fortes doses à une cryptorchidie. Ainsi, aux doses les plus fortes (12,5 et 25 ug/jour) nous observons une diminution du poids testiculaire de l'ordre de 50%. Ces résultats sont en accord avec la littérature puisque 20 µg/j d'EB diminuent le poids du testicule et de l'épididyme

[122] ou 15 et 150 µg/j diminuent le poids des différents lobes prostatiques [718]. Avec les plus faibles doses d'EB, nous n'identifions pas de modifications du poids du testicule. De façon similaire, aucune modification du poids prostatique n'est observée à des doses inférieures ou égales à 1,5 µg/j [718]. Cette diminution du poids testiculaire à 12,5 et 25 µg/jour d'EB est associée à une 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 [122, 718-720]. Les fortes doses d'EB que nous avons utilisé, et plus généralement des PEEs environnementaux, ont été pertinentes pour identifier un phénotype clair: la dysgénésie testiculaire. Ces données suggèrent que notre modèle expérimental est isomorphe, il reproduit une pathologie humaine. Toutefois, les fortes doses 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 où les cellules germinales post-méiotiques représentent presque 1/4 de la population cellulaire. Cette situation peut provoquer des interprétations fausses car résultant d'une perte cellulaire et non d'une régulation génique et protéique. En revanche, aux doses plus faibles (0,75-2,5 µg/j) nous n'observons peu ou pas de modifications cellulaires. Ce sont ces doses que nous avons choisies pour nos études d'expression.

L'hypospermatogénèse chez l'animal adulte exposé pendant la vie néonatale à l'EB, est caractérisée par une apoptose chronique des cellules germinales testiculaires. Cette apoptose a été identifiée par la fragmentation de l'ADN mais aussi l'augmentation d'expression de molécules pro-apoptotiques (caspase 3 activée, BAX) et la diminution de facteurs antiapoptotiques (BCL2, BCLx1, MCL-1). A notre connaissance, notre travail est un des premiers à relier l'hypospermatogénèse induite par une exposition néonatale à un composé estrogénique, avec une activation chronique de l'apoptose au sein des cellules germinales via un déséquilibre de la balance des molécules régulant l'apoptose.

## ***2- Exposition néonatale à l'EB : modèle expérimental pour l'étude de la programmation développementale d'une pathologie adulte.***

Différentes explications pourraient être évoquées pour expliquer l'hypospermatogénèse. Compte-tenu que l'apoptose qui est observée à l'âge adulte, l'exposition aux estrogènes en période néonatale pourrait programmer le devenir et la fonction des cellules germinales mais également des cellules somatiques du testicule.

(1) Les cellules germinales les moins différenciées (les spermatogonies) expriment le récepteur beta des estrogènes (ESR2) qui a un effet antiprolifératif et proapoptotique sur la maturation des cellules germinales [721]. L'EB pourrait directement affecter la différenciation des spermatogonies souches [722]. En effet, l'administration de fortes doses (12,5 ug/j) d'EB entre les jours 5 et 15 après la naissance diminue le nombre des spermatogonies B et leur différenciation en spermatocytes pachytènes [722]. Toutefois, nous n'observons pas de modification du taux de prolifération (par la technique de PCNA) des spermatogonies et des spermatocytes préleptotènes dans notre modèle aux doses utilisées (0,75 – 2,5 ug/j).

(2) L'EB agirait indirectement sur les cellules de Leydig en régulant négativement la synthèse de testostérone [721]. Si dans notre modèle certaines données vont dans le sens de cette hypothèse (diminution d'expression du gène *Star* mais pas des autres gènes de la stéroïdogénèse, résultats non publiés), d'autre vont à l'encontre, (taux de testostérone plasmatique inchangé, résultats non publiés). De même, la seule étude montrant une diminution significative de testostérone plasmatique utilisait de très fortes doses d'EB (150 µg/j). Un élément pour infirmer ou confirmer cette hypothèse serait de mesurer les taux de testostérone intratesticulaire.

(3) L'EB contrôlerait la prolifération des cellules de Sertoli via ESR2 [723]. Toutefois, nous n'observons pas de modification d'expression de gènes Sertolien (*Tubuline beta 3*, *Amhr2*, *Scf*, *Shbg*, *Gsta2*, *Rhox5* et *Gpd1*, résultats non publiés) aux doses d'EB (0,75-2,5 ug/j) que nous avons utilisées. Il est 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 les jours 5-15 après la naissance [719].

Une donnée importante est que la mort des cellules germinales survient à l'âge adulte (principalement les cellules au cours de la méiose –spermatocytes- et les cellules post-méiotiques – spermatides-) soit ici 90 jours après la naissance, alors que l'apoptose n'est pas différente des animaux contrôles chez les rats immatures (6 jours) ou bien prépubères (21 ou 30 jours). Ceci place notre modèle dans le contexte de la programmation néonatale d'une pathologie adulte et du concept de « programming » édicté par D.J. Barker [54]. Dans ce contexte, nous avons exploré l'implication de mécanismes de type épigénétique dans notre modèle, c'est-à-dire l'implication de la méthylation de l'ADN à travers l'expression de ses



enzymes (DNMTs) et du taux de méthylation de certains gènes mais aussi l'implication des petits ARNs non codant que sont les microARNs.

### ***3- Programmation développementale de l'hypospermatogenèse par l'EB: la voie miR-29 – DNMTs/MCL-1 – HSF1***

Une étude miRNome dans notre modèle a montré qu'une vingtaine de miARNs sont surexprimés dans le testicule adulte. Parmi ceux-ci deux clusters de miARNs (miR-29s et miR17-92) sont plus particulièrement impliqués dans la mort cellulaire programmée, ce sont des apoptomiRs [724]. Comme l'apoptose est au cœur de la pathologie développée dans notre modèle, nous avons choisi d'étudier ces miARNs (miR-29s, miR-18a appartenant au cluster miR-17-92).

Dans notre modèle expérimental, l'exposition néonatale à l'EB entraîne une augmentation dépendante de la dose de l'expression de miR-29a, b et c. Ceci est observé uniquement dans le testicule adulte et non dans le testicule avant la puberté (jours 6, 21, 30). Les augmentations les plus fortes sont observées pour les miR-29b (46%) et miR-29c (42%) alors que la hausse du miR-29a (23%) est plus modeste. Au cours du développement testiculaire, le miR-29a est le plus exprimé (notre étude). A l'inverse, le miR-29b est deux fois plus exprimé dans la gonade femelle en développement que dans la gonade mâle, suggérant que miR-29b serait plus spécifiquement impliqué dans la maturation des cellules germinales femelles [725]. Nos résultats suggèrent que l'exposition néonatale à l'EB induirait de manière inappropriée un programme de « maturation femelle » ou « démasculinisation » via une stimulation de l'expression de miR-29b au sein des cellules germinales mâles.

Les apoptomiRs de la famille des miR-29s seraient responsables de façon directe ou indirecte de l'apoptose dans notre modèle.

#### ***- Voie directe : miR-29 – MCL-1 – apoptose:***

Plusieurs données et résultats soutiennent cette hypothèse : les miR-29s ciblent la molécule antiapoptotique MCL-1 impliquée dans la voie mitochondriale [726] ; in vitro, dans une lignée de cellules germinales (GC1), nous montrons que des miR29s synthétiques diminuent l'expression de MCL-1 et induisent l'apoptose (cytométrie de flux) ; enfin, l'expression de la protéine MCL-1 est diminuée dans le testicule adulte des animaux exposés à l'EB.

- **Voie indirecte : miR-29 – DNMTs -HSF1 –apoptose:**

Les miR-29 pourraient induire l'apoptose en modulant le statut de méthylation de certains gènes en régulant l'expression des enzymes responsables. En effet, les miR-29 régulent l'expression des DNMTs sur des tissus humains et murins [725-727]. Dans notre modèle, cette hypothèse est suggérée par plusieurs arguments : (1) L'expression des DNMT1, 3A et 3B est diminuée dans le testicule adulte (et non dans le testicule d'animaux plus jeunes). (2) Le logiciel TargetScan indique que les DNMTs sont des cibles potentielles des miR-29s. (3) Ceci est validé in vitro. Nous montrons que la transfection de la lignée GC1 par des analogues synthétiques de miR-29 induit une diminution d'expression des DNMT3A, 3B. (4) Cette diminution des DNMTs est fonctionnelle dans notre modèle puisque nous observons une diminution de la méthylation de plusieurs cibles des DNMTs : Hsf1, Line-1, H19, Cdkn2a, Gstp1, associée à une augmentation de leur expression chez les animaux exposés à l'EB.

Différentes données de la littérature confortent l'idée selon laquelle la voie des miR-29/DNMTs soit impliquée dans l'apoptose des cellules germinales dans notre modèle. Ainsi, plusieurs études ont impliqué la méthylation de l'ADN dans l'effet des perturbateurs endocriniens sur l'appareil reproducteur femelle (estrogène DES) [728] ou mâle (antiandrogène vinclozolin) [128]. L'exposition à la vinclozoline pendant la période fœtale entraîne une diminution de l'expression de *Dnmt3A*, *Dnmt1* et *Dnmt3L* dans le testicule fœtal (16 jpc) de rats à la génération F1 (mais également F2 et F3), qui se traduit, à l'âge adulte, par une modification des profils de méthylation du sperme ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose des cellules germinales [128, 729]. Cette étude n'a toutefois pas été totalement confirmée puisque à la différence de ce qui a été observé pour le testicule embryonnaire, dans le testicule adulte une augmentation d'expression de DNMT3B et aucune modification de DNMT3A n'ont été observées [131].

Les enzymes de méthylation de l'ADN DNMT3A, 3B et 1 sont fortement impliquées tout au long de la maturation de cellules germinales [730, 731]. En effet, 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 [732-734]. Des 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 [735, 736].

L'inactivation de *Dnmt3A/3B* spécifiquement dans les cellules souches germinales empêche ces cellules d'initier une spermatogenèse normale (diminution du nombre de spermatides et de spermatozoïdes) lorsqu'elles sont transplantées dans un testicule receveur [737]. Enfin, l'inactivation transitoire de *Dnmt1* dans les cellules souches germinales induit une apoptose massive de ces cellules [737].

En aval des DNMTs, le mécanisme d'apoptose ou d'hypospermatogenèse pourrait être une altération d'expression des éléments transposables (ex. *LINE-1*). En effet, une chute du taux de Line-1 entraîne une instabilité génomique qui induit l'apoptose des cellules germinales [738]. De plus, chez les 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 [739].

L'hypométhylation et la surexpression de HSF1 seraient un autre élément d'induction de l'apoptose dans les cellules germinales. En effet, des souris génétiquement modifiées pour surexprimer le transgène HSF1 présentent une infertilité due à une apoptose des spermatocytes. HSF1 régule plusieurs partenaires de l'apoptose tels que, des protéines de la famille Bcl2, TP53, la voie des récepteurs de mort [301]. De plus, HSF1 réprime l'expression dans plusieurs gènes cruciaux (*SOP11*, *PIWIL2*, *TDRD1*, *MOV10L1*) pour les spermatocytes [304]. Ainsi, l'absence de *SOP11* altère l'assemblage des chromosomes et obère la progression vers le stade zygotène. L'absence d'expression de *PIWIL2*, *TDRD1* et *MOV10L1* provoque une levée de la répression des rétrotransposons (principalement *LINE-1*) ce qui est associé à une spermatogenèse altérée comme nous l'avons dit plus haut [305, 306, 740].

#### **4- Programmation développementale de l'hypospermatogenèse par l'EB: la voie miR-18a – HSF2 – HSPA2**

Le second apoptomiR que nous avons étudié appartient au cluster miR-17-92, c'est le miR-18a. Après exposition néonatale à l'EB, son expression est augmentée dans le testicule adulte mais pas dans le testicule pré-pubère (21, 30 jours). Par utilisation du logiciel TargetScan nous avons identifié des cibles potentielles du miR-18a comme étant la protéine de choc thermique HSPA2 et son facteur de transcription HSF2. Dans notre modèle, l'expression de HSF2 et HSPA2 diminue dans le testicule adulte (et pas dans le testicule avant

la puberté). Nous avons validé *in vitro* cette voie puisque l'incubation d'une lignée de cellules germinales avec un analogue synthétique de miR-18a diminue l'expression d'HSF2, d'HSPA2 et induit l'apoptose (augmentation de la caspase-3 activée et cytométrie de flux).

La voie miR18a - HSF2 joue un rôle clé dans la maturation des cellules germinales [310]. En effet, l'expression de miR- 18a et HSF2 sont inversement corrélés au cours de la spermatogenèse et l'inhibition de miR- 18a augmente le taux de HSF2, qui est impliqué dans la maturation et la survie des cellules germinales [310]. Dans notre modèle expérimental, l'altération de la voie miR-18a – HSF2 – HSPA2 contribue au phénotype d'apoptose des cellules germinales adultes, ce de façon comparable à celle observée dans les souris invalidées génétiquement pour HSF2 [307, 308] ou pour HSPA2 KO [232, 741]. MiR- 18a et HSF2 sont tous deux présents dans les spermatocytes (méiose) pachytènes et spermatides post-méiotiques rondes [310, 742, 743], les cellules germinales où le processus de mort cellulaire à lieu.

Les deux voies miRNA -HSR sont susceptibles d'être interconnectés. En effet, l'augmentation de HSF1 associée à la diminution de HSF2 pourraient expliquer la réduction spectaculaire des niveaux HSPA2. HSF2 en se liant au promoteur d'Hspa2, maintient cette zone de la chromatine dans un état décondensé (processus appelé "bookmarking") [311]. Ce processus contribue à maintenir les gènes Hsp dans un état compétent pour la transcription de manière à permettre une activation rapide et robuste d'HSPA2 lors d'un stress en particulier par l'intervention du facteur de transcription HSF1 [312]. Par conséquent, la diminution du niveau HSPA2 que nous observons pourrait résulter d'une réduction de HSF2 qui rend HSF1 incapable d'exercer son effet stimulant sur la protéine de choc thermique. En outre, la diminution de HSPA2 pourrait contribuer à maintenir la surexpression de HSF1. En effet, HSPA2 est connu pour inhiber HSF1 en se liant directement à son promoteur [277]. L'augmentation de HSF1 que nous avons induite *in vitro* après knock-down de HSPA2 dans les cellules CG1 valide cette hypothèse. L'augmentation d'expression de HSF1 dans notre modèle expérimental pourrait résulter non seulement du statut déméthylé de son promoteur, mais aussi de la baisse du niveau de HSPA2.

### ***5- L'exposition à l'EB à l'âge adulte induit une hypospermatogenèse réversible***

Lorsque nous exposons des rats mâles adultes à l'EB, aux mêmes doses et pour la même durée que les nouveau-nés, nous observons de, façon similaire, une apoptose des cellules

germinales associée à une dérégulation des voies miR-29s - DNMT - HSF1 et miR-18a - HSF2 – HSPA2. Alors que ces altérations sont chroniques lors d'une exposition néonatale, elles sont réversibles, deux mois après l'arrêt du traitement, lorsque l'exposition a lieu à l'âge l'adulte. Nous avons déjà identifié un tel phénomène avec l'antiandrogène flutamide [152]. Ces données renforcent l'idée que la période néonatale représente une période critique et vulnérable menant à la programmation d'une pathologie irréversible chez les adultes. Ainsi, l'infertilité masculine peut être maintenant considérée dans le contexte général de l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD) [54, 744]. Le concept de DOHaD permet d'expliquer comment une exposition précoce au cours du développement influence l'apparition de la maladie plus tard dans la vie [745]. Ce concept, d'abord proposé par David JP Barker [54], englobe maintenant les effets de nombreuses expositions sur l'initiation du cancer, les troubles du développement, les maladies neurologiques et le syndrome métabolique [746]. Les principaux changements épigénétiques se produisent pendant la période de fœtale/néonatale, ce qui explique que ces phases soient très vulnérables et qu'elles puissent potentiellement conduire à la programmation épigénétique de maladie chez l'adulte [747]. Ceci est suggéré par plusieurs études [744, 748, 749]. Il convient également de noter que l'expression d'autres effecteurs épigénétiques telles que les histones méthyltransférases G9a [115] et le gène polycomb EZH2 (activateur de zeste homologue 2; manuscrit en préparation), peuvent également être modifiée dans notre modèle expérimental et être une autre voie d'induction de l'apoptose dans les cellules germinales adultes.

## **6- *MicroARNs, marqueurs non-invasifs de l'infertilité masculine ?***

Dans notre modèle expérimental, l'apoptose des cellules germinales adultes observée après une exposition néonatale à l'EB a été clairement liée à la dérégulation de l'expression de miARNs dans le tissu testiculaire. Dans ce contexte, il était intéressant d'analyser le niveau des miARNs dans le plasma pour déterminer si ces molécules pourraient être de potentiels biomarqueurs circulants. En effet, ces dernières années, les miARNs ont été identifiés dans les cellules, les tissus mais également dans les liquides extracellulaires tels que le plasma, le sérum, la salive, l'urine, le sperme, les sécrétions vaginales et le sang menstruel [497, 750, 751]. Les miARNs circulants présentent plusieurs caractéristiques qui pourraient constituer les attributs de biomarqueurs: ils sont dosables via des techniques non-invasives, ils sont peu coûteux à quantifier et sont spécifiques de la maladie d'intérêt. De plus, la conservation de

séquence de ces molécules entre l'homme et les modèles expérimentaux impose les miARNs extracellulaires comme des candidats idéaux pour des êtres biomarqueurs [707].

Les rats adultes exposés pendant la vie néonatale à l'EB présentent des taux élevés de miR-18a et de miR-29c dans le plasma sanguin. Nous n'avons pas réussi à détecter des changements chez le rat pour les miR-29a et miR-29b. Il est possible que certains miARN tel que le miR-29b sont moins stables dans le sang [472]. Ces observations suggèrent que la mort des cellules germinales adultes liée à l'augmentation de l'expression de miR-29 et miR-18a se reflète dans le plasma sanguin. Il s'agit du premier travail indiquant, après exposition néonatale à un xénobiotique, un changement d'expression, chez l'adulte, de miRNA à la fois dans le tissu et le plasma. Ces données pourraient être d'un grand intérêt à l'égard de l'utilisation des miARNs circulant comme biomarqueurs pour évaluer la toxicité des produits chimiques/drogues sur la fonction de reproduction. Dans ce contexte, il nous paraissait important de mesurer les taux de miARNs chez les patients infertiles. L'infertilité est un problème de santé qui affecte 15-24% de couples [22], 60-75 % des cas d'infertilité masculine sont idiopathiques [752]. Une proportion importante de l'infertilité masculine idiopathique est accompagné par chute plus ou moins importante du nombre des spermatozoïdes (oligospermie modérée à sévère, azoospermie). Les données présentées dans notre travail montrent clairement, pour la première fois, que le taux des miARNs miR29a, b, c et miR-18a sont plus élevés chez les patients présentant une diminution du nombre de spermatozoïdes. Toutefois, alors que les taux circulant de miR-18a et miR-29s sont plus élevés dans le modèle expérimental et chez les patients oligo ou azoospermiques, des différences sont à noter. Dans le modèle expérimental, les miR-18a et miR-29c semblent être les biomarqueurs les plus appropriés. En revanche, chez les patients ce sont les miR-29a, 29c (et dans une moindre mesure, 29b) qui sont le plus clairement corrélés à la numération des spermatozoïdes chez l'homme. Nous ne savons pas à l'heure actuelle les raisons de ces différences. Il est possible que le transport et la stabilité des miARNs soient différents chez le rongeur et chez l'homme. Récemment, une altération des taux de miARNs a été identifiée dans le plasma séminal et dans les spermatozoïdes de patients infertiles [706, 753]. Toutefois, notre travail est le premier rapport démontrant, dans le plasma sanguin de patients infertiles, une altération du taux des miARNs.

De plus, nos données expérimentales in vivo et in vitro rapportant une dérégulation de l'expression des miRNA et de HSPA2, ainsi que les données de la littérature identifiant une chute de l'expression de HSPA2 dans le plasma séminal de patients infertiles [233, 234]

fournit des bases pour tenter d'expliquer le mécanisme de certaines oligospermies/azoospermies chez l'homme. Ainsi, le miR-18a sanguin pourrait être le reflet de l'apoptose des cellules germinales testiculaires liée à un défaut de la voie des protéines du choc thermique. L'évaluation des niveaux de miARNs dans le plasma pourrait donc être utilisé non seulement comme biomarqueurs de diagnostic non invasif de l'infertilité, mais aussi comme cibles thérapeutiques potentielles. Enfin, l'identification de la dérégulation des miR-29s et miR-18a à la fois dans notre modèle expérimental et chez les patients infertiles suggèrent que notre modèle animal est isomorphique et pertinent pour l'identification de nouveaux biomarqueurs dans les maladies humaines.

## ***IV. Conclusion***



# *En conclusion*

Nos résultats indiquent que l'hypospermatogénèse due à une apoptose chronique des cellules germinales observée chez l'animal adulte après exposition néonatale à l'EB met en jeu une modification d'expression de plusieurs effecteurs épigénétiques clés : miR-29s, miR-18a et DNMTs.

L'altération de ces effecteurs épigénétiques modifie l'expression des protéines impliquées dans l'apoptose via la voie mitochondriale et le système de réponse au choc thermique (HSF/HSP, facteur de transcription et protéines de choc thermique). Ceci a des répercussions sur la stabilité du génome et l'expression de gènes importants au cours du processus de spermatogénèse. 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.

Enfin, nous avons identifiés les miR-29s et miR-18a comme étant des biomarqueurs circulants non-invasifs de la stérilité masculine dans le contexte d'une oligo ou azoospermie chez l'homme.

# *V. Perspectives*

# *Perspectives*

Notre travail a permis, dans le cadre de l'origine développementale des pathologies adultes, initialement suggéré pour le syndrome métabolique, d'impliquer d'autres pathologies comme les pathologies testiculaires.

Ce travail devrait se poursuivre selon les axes suivants:

- Continuer l'identification des différents miRNAs et de leurs cibles impliqués dans le phénotype de l'apoptose.
- Identifier en amont les causes de la dérégulation de l'expression des miRNAs (épigénome, transcriptome).
- Caractériser les miRNAs pertinents en tant que biomarqueurs non invasifs et en tant que cibles thérapeutiques.
- Elargir aux autres petits ARNs non codant par l'utilisation la technologie de Deep-sequencing.

## ***VI. Références bibliographiques***

# Références bibliographiques

1. Soler, C., C.H. Yeung, and T.G. Cooper, *Development of sperm motility patterns in the murine epididymis*. Int J Androl, 1994. **17**(5): p. 271-8.
2. Holstein, A.F., W. Schulze, and M. Davidoff, *Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 107.
3. Setchell, B.P., *Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis*. Adv Exp Med Biol, 2008. **636**: p. 212-33.
4. Johnson, L., D.L. Thompson, Jr., and D.D. Varner, *Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis*. Anim Reprod Sci, 2008. **105**(1-2): p. 23-51.
5. Mruk, D.D. and C.Y. Cheng, *Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis*. Endocr Rev, 2004. **25**(5): p. 747-806.
6. Petersen, C. and O. Soder, *The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size*. Horm Res, 2006. **66**(4): p. 153-61.
7. Hagenas, L., et al., *Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP)*. Mol Cell Endocrinol, 1975. **2**(5): p. 339-50.
8. Ying, S.Y., *Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone*. Endocr Rev, 1988. **9**(2): p. 267-93.
9. Imbeaud, S., et al., *Molecular genetics of the persistent mullerian duct syndrome: a study of 19 families*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(1): p. 125-31.
10. Josso, N., et al., *Anti-mullerian hormone: the Jost factor*. Recent Prog Horm Res, 1993. **48**: p. 1-59.
11. Nagano, R., et al., *Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis*. Anat Rec, 2000. **258**(2): p. 210-20.
12. Bellve, A.R., et al., *Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization*. J Cell Biol, 1977. **74**(1): p. 68-85.
13. Lie, P.P., C.Y. Cheng, and D.D. Mruk, *Coordinating cellular events during spermatogenesis: a biochemical model*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(7): p. 366-73.
14. Haider, S.G., *Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria*. Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2581-2.
15. Tran, N., G. Servos, and S.G. Haider, *Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium*. Anat Embryol (Berl), 2006. **211**(4): p. 273-82.
16. Wosnitzer, M.S. and D.A. Paduch, *Endocrinological issues and hormonal manipulation in children and men with Klinefelter syndrome*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2013. **163C**(1): p. 16-26.
17. Saez, J.M., *Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation*. Endocr Rev, 1994. **15**(5): p. 574-626.
18. Roser, J.F., *Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems*. Anim Reprod Sci, 2008. **107**(3-4): p. 179-96.
19. Ruwanpura, S.M., R.I. McLachlan, and S.J. Meachem, *Hormonal regulation of male germ cell development*. J Endocrinol, 2010. **205**(2): p. 117-31.
20. Hedger, M.P. and W.R. Winnall, *Regulation of activin and inhibin in the adult testis and the evidence for functional roles in spermatogenesis and immunoregulation*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **359**(1-2): p. 30-42.
21. Syed, V., et al., *Identification, ontogeny, and regulation of an interleukin-6-like factor in the rat seminiferous tubule*. Endocrinology, 1993. **132**(1): p. 293-9.
22. Slama, R., et al., *Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis*. Hum Reprod, 2012. **27**(5): p. 1489-98.
23. Ezech, U.I., et al., *Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia*. Hum Reprod, 1999. **14**(4): p. 1005-12.
24. Nicopoullou, J.D., et al., *Assisted reproduction in the azoospermic couple*. BJOG, 2004. **111**(11): p. 1190-203.
25. Oates, R.D., *The genetic basis of male reproductive failure*. Urol Clin North Am, 2008. **35**(2): p. 257-70, ix.

26. Huyghe, E., et al., [*Optimal evaluation of the infertile male. 2007 French urological association guidelines*]. Prog Urol, 2008. **18**(2): p. 95-101.
27. Rigot, J.M., [*The clinical workup is already a prognostic factor*]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2007. **36 Suppl 3**: p. S74-7.
28. Robin, G., et al., [*Why and how to assess hypospermia?*]. Gynecol Obstet Fertil, 2008. **36**(10): p. 1035-42.
29. Soufir, J.C., [*Azoospermia, asthenozoospermia and seminal biochemistry*]. Ann Biol Clin (Paris), 1985. **43**(1): p. 67-70.
30. La Vignera, S., et al., *High levels of lipid peroxidation in semen of diabetic patients*. Andrologia, 2012. **44 Suppl 1**: p. 565-70.
31. Bhasin, S., *Approach to the infertile man*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 1995-2004.
32. Schiff, J.D., P.S. Li, and M. Goldstein, *Correlation of ultrasonographic and orchidometer measurements of testis volume in adults*. BJU Int, 2004. **93**(7): p. 1015-7.
33. Marcelli, F., et al., [*Role of deep seminal tract imaging in the diagnosis of unilateral agenesis of the vas deferens. Case report of a patient with CFTR gene mutation*]. Prog Urol, 2006. **16**(5): p. 617-9.
34. Simoni, M., E. Bakker, and C. Krausz, *EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004*. Int J Androl, 2004. **27**(4): p. 240-9.
35. de la Taille, A., et al., *Correlation between genito-urinary anomalies, semen analysis and CFTR genotype in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens*. Br J Urol, 1998. **81**(4): p. 614-9.
36. Robin, G., et al., [*Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis*]. Ann Pathol, 2010. **30**(3): p. 182-95.
37. Silber, S.J., et al., *Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure*. Hum Reprod, 1997. **12**(11): p. 2422-8.
38. McLachlan, R.I., et al., *Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review*. Hum Reprod, 2007. **22**(1): p. 2-16.
39. Seo, J.T. and W.J. Ko, *Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients*. Int J Androl, 2001. **24**(5): p. 306-10.
40. Ishikawa, T., H. Fujioka, and M. Fujisawa, *Clinical and hormonal findings in testicular maturation arrest*. BJU Int, 2004. **94**(9): p. 1314-6.
41. Osmanagaoglu, K., et al., *Cumulative delivery rates after ICSI treatment cycles with freshly retrieved testicular sperm: a 7-year follow-up study*. Hum Reprod, 2003. **18**(9): p. 1836-40.
42. Ma, S., et al., *Analysis of early meiotic events and aneuploidy in nonobstructive azoospermic men: a preliminary report*. Fertil Steril, 2006. **85**(3): p. 646-52.
43. Sun, F., et al., *Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia*. Fertil Steril, 2007. **87**(3): p. 565-71.
44. Hammadeh, M.E., et al., *Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome*. Hum Reprod, 1999. **14**(2): p. 363-7.
45. Ald, M., C.S. Niederberger, and L.S. Ross, *Surgical sperm retrieval for assisted reproduction*. Minerva Ginecol, 2004. **56**(3): p. 217-22.
46. Boitrelle, F., et al., *A predictive score for testicular sperm extraction quality and surgical ICSI outcome in non-obstructive azoospermia: a retrospective study*. Hum Reprod, 2011. **26**(12): p. 3215-21.
47. Barker, D.J., *Fetal origins of coronary heart disease*. BMJ, 1995. **311**(6998): p. 171-4.
48. Barker, D.J., *Intrauterine programming of adult disease*. Mol Med Today, 1995. **1**(9): p. 418-23.
49. Godfrey, K.M. and D.J. Barker, *Fetal programming and adult health*. Public Health Nutr, 2001. **4**(2B): p. 611-24.
50. Barker, D.J., *The origins of the developmental origins theory*. J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 412-7.
51. Power, C., D. Kuh, and S. Morton, *From developmental origins of adult disease to life course research on adult disease and aging: insights from birth cohort studies*. Annu Rev Public Health, 2013. **34**: p. 7-28.
52. Boekelheide, K., et al., *Predicting later-life outcomes of early-life exposures*. Environ Health Perspect, 2012. **120**(10): p. 1353-61.

53. Li, J., et al., *Prenatal stress exposure related to maternal bereavement and risk of childhood overweight*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11896.
54. Barker, D.J., et al., *Weight in infancy and death from ischaemic heart disease*. Lancet, 1989. **2**(8663): p. 577-80.
55. Hales, C.N. and D.J. Barker, *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis*. Diabetologia, 1992. **35**(7): p. 595-601.
56. Pulizzi, N., et al., *Interaction between prenatal growth and high-risk genotypes in the development of type 2 diabetes*. Diabetologia, 2009. **52**(5): p. 825-9.
57. Raghupathy, P., et al., *Glucose tolerance, insulin resistance and insulin secretion in young south Indian adults: Relationships to parental size, neonatal size and childhood body mass index*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(2): p. 283-92.
58. Johnson, K.J., et al., *Developmental origins of cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(16): p. 6375-7.
59. Heijmans, B.T., et al., *The epigenome: archive of the prenatal environment*. Epigenetics, 2009. **4**(8): p. 526-31.
60. Virtanen, H.E. and J. Toppari, *Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(1): p. 49-58.
61. Skakkebaek, N.E., E. Rajpert-De Meyts, and K.M. Main, *Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects*. Hum Reprod, 2001. **16**(5): p. 972-8.
62. Jorgensen, N., et al., *Testicular dysgenesis syndrome comprises some but not all cases of hypospadias and impaired spermatogenesis*. Int J Androl, 2010. **33**(2): p. 298-303.
63. Walschaerts, M., et al., *Doubling of testicular cancer incidence rate over the last 20 years in southern France*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(2): p. 155-61.
64. Wohlfahrt-Veje, C., K.M. Main, and N.E. Skakkebaek, *Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(4): p. 459-65.
65. Leung, A.K. and W.L. Robson, *Hypospadias: an update*. Asian J Androl, 2007. **9**(1): p. 16-22.
66. Toppari, J. and M. Kaleva, *Maldescendus testis*. Horm Res, 1999. **51**(6): p. 261-9.
67. Richiardi, L., et al., *Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(12): p. 2157-66.
68. Caione, P., *Prevalence of hypospadias in European countries: is it increasing?* Eur Urol, 2009. **55**(5): p. 1027-9; discussion 1029-30.
69. Lutke Holzik, M.F., et al., *Clinical and genetic aspects of testicular germ cell tumours*. Hered Cancer Clin Pract, 2008. **6**(1): p. 3-14.
70. Ivell, R. and S. Hartung, *The molecular basis of cryptorchidism*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(4): p. 175-81.
71. Junien, C., A. Gabory, and L. Attig, *[Sexual dimorphism in the XXI(st) century]*. Med Sci (Paris), 2012. **28**(2): p. 185-92.
72. Wood, H.M. and J.S. Elder, *Cryptorchidism and testicular cancer: separating fact from fiction*. J Urol, 2009. **181**(2): p. 452-61.
73. Peng, X., et al., *The association risk of male subfertility and testicular cancer: a systematic review*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5591.
74. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: a landscape takes shape*. Cell, 2007. **128**(4): p. 635-8.
75. Ramlau-Hansen, C.H., et al., *Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study*. Am J Epidemiol, 2007. **165**(12): p. 1372-9.
76. Damgaard, I.N., et al., *Cryptorchidism and maternal alcohol consumption during pregnancy*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(2): p. 272-7.
77. Gluckman, P.D., et al., *Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(1): p. 61-73.
78. Ferguson-Smith, A.C. and M.E. Patti, *You are what your dad ate*. Cell Metab, 2011. **13**(2): p. 115-7.
79. Dietz, D.M. and E.J. Nestler, *From father to offspring: paternal transmission of depressive-like behaviors*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(1): p. 311-2.
80. PNRPE, [www.anses.fr/fr/documents/CDLR-mg-PNRPE2012.pdf](http://www.anses.fr/fr/documents/CDLR-mg-PNRPE2012.pdf). 2012.
81. Mauduit, C., et al., *[Long-term effects of environmental endocrine disruptors on male fertility]*. Gynecol Obstet Fertil, 2006. **34**(10): p. 978-84.
82. Rodriguez-Carrasco, Y., et al., *Exposure estimates to Fusarium mycotoxins through cereals intake*. Chemosphere, 2013. **93**(10): p. 2297-303.
83. Swendenborg, E., et al., *Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders*. J Mol Endocrinol, 2009. **43**(1): p. 1-10.

84. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement*. *Endocr Rev*, 2009. **30**(4): p. 293-342.
85. Meunier, L., et al., *Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and Mcl-1*. *Endocrinology*, 2012. **153**(4): p. 1936-47.
86. Dolinoy, D.C. and R.L. Jirtle, *Environmental epigenomics in human health and disease*. *Environ Mol Mutagen*, 2008. **49**(1): p. 4-8.
87. Page, A., *HIV/AIDS and childbirth: a feminist midwife's view*. *Aust J Adv Nurs*, 1991. **8**(4): p. 4-9.
88. Schwartz, D. and F. Collins, *Medicine. Environmental biology and human disease*. *Science*, 2007. **316**(5825): p. 695-6.
89. Perera, F. and J. Herbstman, *Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease*. *Reprod Toxicol*, 2011. **31**(3): p. 363-73.
90. Liu, L., Y. Li, and T.O. Tollefsbol, *Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases*. *Curr Issues Mol Biol*, 2008. **10**(1-2): p. 25-36.
91. Choudhuri, S., Y. Cui, and C.D. Klaassen, *Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. **245**(3): p. 378-93.
92. Kundakovic, M. and F.A. Champagne, *Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A*. *Brain Behav Immun*, 2011. **25**(6): p. 1084-93.
93. Halden, R.U., *Plastics and health risks*. *Annu Rev Public Health*, 2010. **31**: p. 179-94.
94. Doherty, L.F., et al., *In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer*. *Horm Cancer*, 2010. **1**(3): p. 146-55.
95. Morgan, H.D., et al., *Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse*. *Nat Genet*, 1999. **23**(3): p. 314-8.
96. Dolinoy, D.C., D. Huang, and R.L. Jirtle, *Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(32): p. 13056-61.
97. Ho, S.M., et al., *Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4*. *Cancer Res*, 2006. **66**(11): p. 5624-32.
98. Prins, G.S., et al., *Developmental exposure to bisphenol A increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated*. *Fertil Steril*, 2008. **89**(2 Suppl): p. e41.
99. Tang, W.Y., et al., *Neonatal exposure to estradiol/bisphenol A alters promoter methylation and expression of Nsbp1 and Hpcal1 genes and transcriptional programs of Dnmt3a/b and Mbd2/4 in the rat prostate gland throughout life*. *Endocrinology*, 2012. **153**(1): p. 42-55.
100. Doshi, T., et al., *Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A*. *Toxicology*, 2011. **289**(2-3): p. 74-82.
101. Bromer, J.G., et al., *Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response*. *FASEB J*, 2010. **24**(7): p. 2273-80.
102. Yaoi, T., et al., *Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **376**(3): p. 563-7.
103. Weng, Y.I., et al., *Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. **248**(2): p. 111-21.
104. Avissar-Whiting, M., et al., *Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells*. *Reprod Toxicol*, 2010. **29**(4): p. 401-6.
105. H, C., Cho, H.; Kim, S.; Park, H.-W.; Oh, M.-J.; Yu, S.; Lee, S.; Park, C.; Han, J.; Oh, J.-H. Hwang, S.; et al. *A relationship between miRNA and gene expression in the mouse sertoli cell line after exposure to bisphenol A*. *BioChip J*. 2010, **4**, 75–81. *BioChip J*, 2010.
106. Kang, S.C. and B.M. Lee, *DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates*. *J Toxicol Environ Health A*, 2005. **68**(23-24): p. 1995-2003.
107. Wu, S., et al., *Dynamic effect of di-2-(ethylhexyl) phthalate on testicular toxicity: epigenetic changes and their impact on gene expression*. *Int J Toxicol*, 2010. **29**(2): p. 193-200.
108. Newbold, R.R., E. Padilla-Banks, and W.N. Jefferson, *Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations*. *Endocrinology*, 2006. **147**(6 Suppl): p. S11-7.
109. Klip, H., et al., *Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study*. *Lancet*, 2002. **359**(9312): p. 1102-7.



110. Palmer, J.R., et al., *Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study*. Environ Health, 2009. **8**: p. 37.
111. Cederroth, C.R., et al., *Estrogen receptor alpha is a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism*. Endocrinology, 2007. **148**(11): p. 5507-19.
112. Toppari, J., *Environmental endocrine disruptors*. Sex Dev, 2008. **2**(4-5): p. 260-7.
113. Goyal, H.O., et al., *Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood*. Biol Reprod, 2003. **68**(6): p. 2081-91.
114. Mathews, E., et al., *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*. Toxicol Sci, 2009. **112**(2): p. 331-43.
115. Volle, D.H., et al., *The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3752-64.
116. Vandenberg, L.N., et al., *Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption*. Endocr Rev, 2009. **30**(1): p. 75-95.
117. Bouskine, A., et al., *Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(7): p. 1053-8.
118. Bushnell, A., et al., *Donor-specific unresponsiveness to cardiac allografts in the mouse: an examination of mechanisms*. Transplant Proc, 1991. **23**(1 Pt 1): p. 726-8.
119. Li, M.W., et al., *Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics?* Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(11): p. 2302-14.
120. Salian, S., T. Doshi, and G. Vanage, *Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis*. Toxicology, 2009. **265**(1-2): p. 56-67.
121. Salian, S., T. Doshi, and G. Vanage, *Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring*. Life Sci, 2009. **85**(21-22): p. 742-52.
122. Nagao, T., et al., *Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate*. Reprod Toxicol, 1999. **13**(4): p. 303-11.
123. Williams, K., et al., *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*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(3): p. 236-47.
124. Toyama, Y. and S. Yuasa, *Effects of neonatal administration of 17beta-estradiol, beta-estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis*. Reprod Toxicol, 2004. **19**(2): p. 181-8.
125. Kato, H., et al., *Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats*. Reprod Toxicol, 2006. **22**(1): p. 20-9.
126. Nellesmann, C., et al., *The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo*. Toxicol Sci, 2003. **71**(2): p. 251-62.
127. Wolf, C.J., et al., *Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin*. Toxicol Sci, 2000. **55**(1): p. 152-61.
128. Anway, M.D., et al., *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility*. Science, 2005. **308**(5727): p. 1466-9.
129. Anway, M.D., S.S. Rekow, and M.K. Skinner, *Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome*. Genomics, 2008. **91**(1): p. 30-40.
130. Elzeinova, F., et al., *Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice*. Reprod Toxicol, 2008. **26**(3-4): p. 231-8.
131. Cowin, P.A., et al., *Vinclozolin exposure in utero induces postpubertal prostatitis and reduces sperm production via a reversible hormone-regulated mechanism*. Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 783-92.
132. Anway, M.D., S.S. Rekow, and M.K. Skinner, *Comparative anti-androgenic actions of vinclozolin and flutamide on transgenerational adult onset disease and spermatogenesis*. Reprod Toxicol, 2008. **26**(2): p. 100-6.
133. Eustache, F., et al., *Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(8): p. 1272-9.
134. Anway, M.D., C. Leathers, and M.K. Skinner, *Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5515-23.

135. Guerrero-Bosagna, C., et al., *Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of altered Sertoli cell transcriptome and epigenome: molecular etiology of male infertility*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59922.
136. Goldspiel, B.R. and D.R. Kohler, *Flutamide: an antiandrogen for advanced prostate cancer*. DICP, 1990. **24**(6): p. 616-23.
137. Balk, S.P., *Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer*. Urology, 2002. **60**(3 Suppl 1): p. 132-8; discussion 138-9.
138. Peets, E.A., M.F. Henson, and R. Neri, *On the mechanism of the anti-androgenic action of flutamide (alpha-alpha-alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide) in the rat*. Endocrinology, 1974. **94**(2): p. 532-40.
139. Katchen, B. and S. Buxbaum, *Disposition of a new, nonsteroid, antiandrogen, alpha,alpha,alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide (Flutamide), in men following a single oral 200 mg dose*. J Clin Endocrinol Metab, 1975. **41**(2): p. 373-9.
140. Simard, J., et al., *Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues*. Mol Cell Endocrinol, 1986. **44**(3): p. 261-70.
141. Kempainen, J.A., et al., *Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones*. J Biol Chem, 1992. **267**(2): p. 968-74.
142. Viguier-Martinez, M.C., et al., *Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidences on fertility*. Acta Endocrinol (Copenh), 1983. **104**(2): p. 246-52.
143. Husmann, D.A. and M.J. McPhaul, *Time-specific androgen blockade with flutamide inhibits testicular descent in the rat*. Endocrinology, 1991. **129**(3): p. 1409-16.
144. Imperato-McGinley, J., et al., *Comparison of the effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies*. Endocrinology, 1992. **131**(3): p. 1149-56.
145. McIntyre, B.S., N.J. Barlow, and P.M. Foster, *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**(2): p. 236-49.
146. Miyata, K., et al., *Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormones and androgen-dependent organs in F1 male rats*. J Toxicol Sci, 2002. **27**(1): p. 19-33.
147. Okahara, A., et al., *Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 5). Effects of repeated doses of flutamide for 2 and 4 weeks*. J Toxicol Sci, 2000. **25 Spec No**: p. 63-70.
148. Andrews, P., et al., *Feasibility and potential gains of enhancing the subacute rat study protocol (OECD test guideline no. 407) by additional parameters selected to determine endocrine modulation. A pre-validation study to determine endocrine-mediated effects of the antiandrogenic drug flutamide*. Arch Toxicol, 2001. **75**(2): p. 65-73.
149. Kunimatsu, T., et al., *Evaluation for reliability and feasibility of the draft protocol for the enhanced rat 28-day subacute study (OECD Guideline 407) using androgen antagonist flutamide*. Toxicology, 2004. **200**(1): p. 77-89.
150. Kotula-Balak, M., et al., *Prenatal and neonatal exposure to flutamide affects function of Leydig cells in adult boar*. Domest Anim Endocrinol, 2012. **42**(3): p. 142-54.
151. Mylchreest, E., et al., *Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. **156**(2): p. 81-95.
152. Omezzine, A., 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**(2): p. 648-61.
153. Bozec, A., 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**(1): p. 79-90.
154. Maire, M., 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**(12): p. 5135-43.
155. Chandolia, R.K., et al., *Comparative effects of chronic administration of the non-steroidal antiandrogens flutamide and Casodex on the reproductive system of the adult male rat*. Acta Endocrinol (Copenh), 1991. **125**(5): p. 547-55.

156. Toyoda, K., et al., *Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals*. Arch Toxicol, 2000. **74**(3): p. 127-32.
157. Marchetti, B. and F. Labrie, *Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in the rat*. J Steroid Biochem, 1988. **29**(6): p. 691-8.
158. Rider, C.V., et al., *A mixture of seven antiandrogens induces reproductive malformations in rats*. Int J Androl, 2008. **31**(2): p. 249-62.
159. Andersen, H.R., et al., *Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro*. Toxicol Appl Pharmacol, 2002. **179**(1): p. 1-12.
160. Vinggaard, A.M., et al., *Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz*. Toxicol Sci, 2002. **69**(2): p. 344-53.
161. Vinggaard, A.M., et al., *Antiandrogenic effects in short-term in vivo studies of the fungicide fenarimol*. Toxicology, 2005. **207**(1): p. 21-34.
162. Laier, P., et al., *Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **213**(2): p. 160-71.
163. Noriega, N.C., et al., *Late gestational exposure to the fungicide prochloraz delays the onset of parturition and causes reproductive malformations in male but not female rat offspring*. Biol Reprod, 2005. **72**(6): p. 1324-35.
164. Vinggaard, A.M., et al., *Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring*. Toxicol Sci, 2005. **85**(2): p. 886-97.
165. Vinggaard, A.M., et al., *Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action*. Int J Androl, 2006. **29**(1): p. 186-92.
166. Montani, C., et al., *Genistein is an efficient estrogen in the whole-body throughout mouse development*. Toxicol Sci, 2008. **103**(1): p. 57-67.
167. Montani, C., et al., *Estrogen receptor-mediated transcriptional activity of genistein in the mouse testis*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1163**: p. 475-7.
168. Fraser, L.R., et al., *Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa*. Hum Reprod, 2006. **21**(5): p. 1184-93.
169. Delclos, K.B., et al., *Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats*. Reprod Toxicol, 2001. **15**(6): p. 647-63.
170. Wisniewski, A.B., et al., *Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats*. J Urol, 2003. **169**(4): p. 1582-6.
171. Masutomi, N., et al., *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, 2003. **192**(2-3): p. 149-70.
172. Faqi, A.S., et al., *Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats*. Reprod Toxicol, 2004. **18**(4): p. 605-11.
173. Assinder, S., et al., *Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells*. Reproduction, 2007. **133**(1): p. 11-9.
174. Zinedine, A., et al., *Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin*. Food Chem Toxicol, 2007. **45**(1): p. 1-18.
175. Kuiper, G.G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4252-63.
176. Parveen, M., Y. Zhu, and R. Kiyama, *Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes*. FEBS Lett, 2009. **583**(14): p. 2377-84.
177. Ruzsas, C., et al., *Effect of the fungal toxin (zearalenone) on the reproductive system and fertility of male and female rats*. Acta Biol Acad Sci Hung, 1979. **30**(4): p. 335-45.
178. Filipiak, E., et al., *Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis*. Folia Histochem Cytobiol, 2009. **47**(5): p. S113-20.
179. Kim, I.H., et al., *Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats*. Toxicol Lett, 2003. **138**(3): p. 185-92.
180. Yang, J.Y., et al., *Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice*. Reprod Toxicol, 2007. **24**(3-4): p. 381-7.
181. Yang, J., et al., *Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**(4): p. 558-65.

182. Zhang, Y., et al., [*Preparation of immunoaffinity column of zearalenone*]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 2007. **41**(2): p. 110-3.
183. Koraichi, F., et al., *Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of ABC transporter expression in testis*. *Toxicology*, 2013. **310**: p. 29-38.
184. Gajicka, M., *The effect of low-dose experimental zearalenone intoxication on the immunoexpression of estrogen receptors in the ovaries of pre-pubertal bitches*. *Pol J Vet Sci*, 2012. **15**(4): p. 685-91.
185. Pistol, G.C., et al., *Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro- and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF-kappaB signalling molecules in pigs*. *Br J Nutr*, 2013: p. 1-13.
186. Cho, E.S., et al., *Effects of red ginseng extract on zearalenone induced spermatogenesis impairment in rat*. *J Ginseng Res*, 2011. **35**(3): p. 294-300.
187. Shaha, C., R. Tripathi, and D.P. Mishra, *Male germ cell apoptosis: regulation and biology*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010. **365**(1546): p. 1501-15.
188. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
189. Nicholson, D.W., *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(11): p. 1028-42.
190. Chua, B.T., K. Guo, and P. Li, *Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(7): p. 5131-5.
191. Russell, L.D., et al., *Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis*. *Biol Reprod*, 2002. **66**(4): p. 950-8.
192. Rucker, E.B., 3rd, et al., *Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis*. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(7): p. 1038-52.
193. Furuchi, T., et al., *Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia*. *Development*, 1996. **122**(6): p. 1703-9.
194. Rodriguez, I., et al., *An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis*. *EMBO J*, 1997. **16**(9): p. 2262-70.
195. Yan, W., et al., *Overexpression of Bcl-W in the testis disrupts spermatogenesis: revelation of a role of BCL-W in male germ cell cycle control*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(9): p. 1868-79.
196. Yamamoto, C.M., et al., *Impairment of spermatogenesis in transgenic mice with selective overexpression of Bcl-2 in the somatic cells of the testis*. *J Androl*, 2001. **22**(6): p. 981-91.
197. Yan, W., et al., *Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro*. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. **165**(1-2): p. 115-29.
198. Feki, A., et al., *BARD1 expression during spermatogenesis is associated with apoptosis and hormonally regulated*. *Biol Reprod*, 2004. **71**(5): p. 1614-24.
199. Xu, X., et al., *Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice*. *Development*, 2003. **130**(9): p. 2001-12.
200. Rasoulpour, R.J. and K. Boekelheide, *NF-kappaB is activated in the rat testis following exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate*. *Biol Reprod*, 2005. **72**(2): p. 479-86.
201. Weikert, S., et al., *The inhibitor of apoptosis (IAP) survivin is expressed in human testicular germ cell tumors and normal testes*. *Cancer Lett*, 2005. **223**(2): p. 331-7.
202. Lee, J., et al., *The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis*. *Endocrinology*, 1997. **138**(5): p. 2081-8.
203. Lin, Y.C., P.L. Yao, and J.H. Richburg, *FasL gene-deficient mice display a limited disruption in spermatogenesis and inhibition of mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced germ cell apoptosis*. *Toxicol Sci*, 2010. **114**(2): p. 335-45.
204. Jacobo, P.V., et al., *Involvement of soluble Fas Ligand in germ cell apoptosis in testis of rats undergoing autoimmune orchitis*. *Cytokine*, 2012. **60**(2): p. 385-92.
205. Pentikainen, V., K. Erkkila, and L. Dunkel, *Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(2 Pt 1): p. E310-6.
206. Berendes, H.D., *The induction of changes in chromosomal activity in different polytene types of cell in Drosophila hydei*. *Dev Biol*, 1965. **11**(3): p. 371-84.
207. Berendes, H.D., *Factors involved in the expression of gene activity in polytene chromosomes*. *Chromosoma*, 1968. **24**(4): p. 418-37.
208. Ashburner, M., *Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila. V. Responses to environmental treatments*. *Chromosoma*, 1970. **31**(3): p. 356-76.

209. Leenders, H.J. and H.D. Berendes, *The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in Drosophila. I. The induction of gene activity*. Chromosoma, 1972. **37**(4): p. 433-44.
210. Burel, C., et al., *Mammalian heat shock protein families. Expression and functions*. Experientia, 1992. **48**(7): p. 629-34.
211. Hunt, C. and R.I. Morimoto, *Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(19): p. 6455-9.
212. Kampinga, H.H., et al., *Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins*. Cell Stress Chaperones, 2009. **14**(1): p. 105-11.
213. Feige, U. and B.S. Polla, *Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications*. Experientia, 1994. **50**(11-12): p. 979-86.
214. McCarty, J.S., et al., *The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system*. J Mol Biol, 1995. **249**(1): p. 126-37.
215. Gunther, E. and L. Walter, *Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates*. Experientia, 1994. **50**(11-12): p. 987-1001.
216. Velazquez, J.M. and S. Lindquist, *hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery*. Cell, 1984. **36**(3): p. 655-62.
217. Welch, W.J. and J.P. Suhan, *Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress*. J Cell Biol, 1986. **103**(5): p. 2035-52.
218. Bukau, B. and A.L. Horwich, *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines*. Cell, 1998. **92**(3): p. 351-66.
219. Lanneau, D., et al., *Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27*. Prion, 2007. **1**(1): p. 53-60.
220. Li, C.Y., et al., *Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25665-71.
221. Beere, H.M., et al., *Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 469-75.
222. Steel, R., et al., *Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51490-9.
223. Stankiewicz, A.R., et al., *Regulation of heat-induced apoptosis by Mcl-1 degradation and its inhibition by Hsp70*. Cell Death Differ, 2009. **16**(4): p. 638-47.
224. Stankiewicz, A.R., et al., *Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation*. J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38729-39.
225. Gurbuxani, S., et al., *Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor*. Oncogene, 2003. **22**(43): p. 6669-78.
226. Gyrd-Hansen, M., J. Nylandsted, and M. Jaattela, *Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity*. Cell Cycle, 2004. **3**(12): p. 1484-5.
227. Nylandsted, J., et al., *Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 425-35.
228. Wu, F.H., et al., *Extracellular HSPA1A promotes the growth of hepatocarcinoma by augmenting tumor cell proliferation and apoptosis-resistance*. Cancer Lett, 2012. **317**(2): p. 157-64.
229. Garrido, C., et al., *Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties*. Cell Cycle, 2006. **5**(22): p. 2592-601.
230. Mosser, D.D. and R.I. Morimoto, *Molecular chaperones and the stress of oncogenesis*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2907-18.
231. Son, W.Y., et al., *Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis*. Fertil Steril, 2000. **73**(6): p. 1138-44.
232. Dix, D.J., et al., *Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3264-8.
233. Motiei, M., et al., *Evaluation of HSPA2 in fertile and infertile individuals*. Andrologia, 2013. **45**(1): p. 66-72.
234. Cedenho, A.P., et al., *Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa*. Hum Reprod, 2006. **21**(7): p. 1791-4.
235. Redgrove, K.A., et al., *The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50851.
236. Sasaki, T., et al., *Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis*. J Cell Biol, 2008. **182**(3): p. 449-58.

237. Chi, M.N., et al., *The RNA-binding protein ELAVL1/HuR is essential for mouse spermatogenesis, acting both at meiotic and postmeiotic stages*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(16): p. 2875-85.
238. Matsumoto, M. and H. Fujimoto, *Cloning of a hsp70-related gene expressed in mouse spermatids*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **166**(1): p. 43-9.
239. Matsumoto, M., et al., *Haploid specific activations of protamine 1 and hsc70t genes in mouse spermatogenesis*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1174**(3): p. 274-8.
240. Neuhaus, E.M., et al., *A specific heat shock protein enhances the expression of mammalian olfactory receptor proteins*. Chem Senses, 2006. **31**(5): p. 445-52.
241. Chanoux, R.A., et al., *Hsc70 negatively regulates epithelial sodium channel trafficking at multiple sites in epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(7): p. C776-87.
242. Jakobsson, M.E., et al., *Identification and characterization of a novel human methyltransferase modulating Hsp70 protein function through lysine methylation*. J Biol Chem, 2013. **288**(39): p. 27752-63.
243. Li, L., et al., *Glioma pathogenesis-related protein 1 induces prostate cancer cell death through Hsc70-mediated suppression of AURKA and TPX2*. Mol Oncol, 2013. **7**(3): p. 484-96.
244. Wu, Y., Y. Pei, and Y. Qin, *Developmental expression of heat shock proteins 60, 70, 90, and A2 in rabbit testis*. Cell Tissue Res, 2011. **344**(2): p. 355-63.
245. Pei, Y., Y. Wu, and Y. Qin, *Effects of chronic heat stress on the expressions of heat shock proteins 60, 70, 90, A2, and HSC70 in the rabbit testis*. Cell Stress Chaperones, 2012. **17**(1): p. 81-7.
246. de Thonel, A., A. Le Mouel, and V. Mezger, *Transcriptional regulation of small HSP-HSF1 and beyond*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(10): p. 1593-612.
247. Kappe, G., J.A. Leunissen, and W.W. de Jong, *Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins*. Prog Mol Subcell Biol, 2002. **28**: p. 1-17.
248. Ingolia, T.D. and E.A. Craig, *Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(7): p. 2360-4.
249. Landry, J., et al., *Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells*. J Cell Biol, 1989. **109**(1): p. 7-15.
250. Garrido, C., et al., *Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27*. Eur J Biochem, 1996. **237**(3): p. 653-9.
251. Garrido, C., et al., *HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs*. Cancer Res, 1997. **57**(13): p. 2661-7.
252. Horwitz, J., T. Emmons, and L. Takemoto, *The ability of lens alpha crystallin to protect against heat-induced aggregation is age-dependent*. Curr Eye Res, 1992. **11**(8): p. 817-22.
253. Jakob, U., et al., *Small heat shock proteins are molecular chaperones*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1517-20.
254. Zavialov, A., et al., *The effect of the intersubunit disulfide bond on the structural and functional properties of the small heat shock protein Hsp25*. Int J Biol Macromol, 1998. **22**(3-4): p. 163-73.
255. Lambert, H., et al., *HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9378-85.
256. Boelens, W.C., et al., *Negative charges in the C-terminal domain stabilize the alphaB-crystallin complex*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28085-90.
257. Arrigo, A.P. and W.J. Welch, *Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein*. J Biol Chem, 1987. **262**(32): p. 15359-69.
258. Rogalla, T., et al., *Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18947-56.
259. Arrigo, A.P., *The monovalent ionophore monensin maintains the nuclear localization of the human stress protein hsp28 during heat shock recovery*. J Cell Sci, 1990. **96 ( Pt 3)**: p. 419-27.
260. Arrigo, A.P., et al., *Characterization of the prosome from Drosophila and its similarity to the cytoplasmic structures formed by the low molecular weight heat-shock proteins*. EMBO J, 1985. **4**(2): p. 399-406.
261. Landry, J., et al., *Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II*. J Biol Chem, 1992. **267**(2): p. 794-803.

262. Butt, E., et al., *Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants.* J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7108-13.
263. Stokoe, D., et al., *Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins.* FEBS Lett, 1992. **313**(3): p. 307-13.
264. Huot, J., et al., *Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27.* Eur J Biochem, 1995. **227**(1-2): p. 416-27.
265. Mehlen, P., et al., *Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **241**(1): p. 187-92.
266. Ehrnsperger, M., et al., *Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation.* EMBO J, 1997. **16**(2): p. 221-9.
267. During, R.L., et al., *Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation.* EMBO J, 2007. **26**(9): p. 2240-50.
268. Landry, J. and J. Huot, *Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27).* Biochem Soc Symp, 1999. **64**: p. 79-89.
269. Didelot, C., et al., *Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death.* Handb Exp Pharmacol, 2006(172): p. 171-98.
270. Rocchi, P., et al., *Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation in vitro.* BJU Int, 2006. **98**(5): p. 1082-9.
271. Bruey, J.M., et al., *Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 645-52.
272. Concannon, C.G., S. Orrenius, and A. Samali, *Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c.* Gene Expr, 2001. **9**(4-5): p. 195-201.
273. Samali, A., et al., *Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli.* Cell Stress Chaperones, 2001. **6**(1): p. 49-58.
274. Paul, C., et al., *Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 816-34.
275. Pandey, P., et al., *Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3.* Oncogene, 2000. **19**(16): p. 1975-81.
276. Kamradt, M.C., F. Chen, and V.L. Cryns, *The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation.* J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16059-63.
277. Anckar, J. and L. Sistonen, *Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease.* Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 1089-115.
278. Havasi, A., et al., *Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism.* J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 12305-13.
279. Chauhan, D., et al., *Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance.* Blood, 2003. **102**(9): p. 3379-86.
280. Mehlen, P., K. Schulze-Osthoff, and A.P. Arrigo, *Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death.* J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16510-4.
281. Charette, S.J., et al., *Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(20): p. 7602-12.
282. Arrigo, A.P., et al., *Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels.* Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(3-4): p. 414-22.
283. Trinklein, N.D., et al., *The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1254-61.
284. Akerfelt, M., R.I. Morimoto, and L. Sistonen, *Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(8): p. 545-55.
285. Nakai, A. and R.I. Morimoto, *Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(4): p. 1983-97.

286. Tanabe, M., et al., *The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27845-56.
287. Baniwal, S.K., et al., *Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors*. J Biosci, 2004. **29**(4): p. 471-87.
288. Pirkkala, L., P. Nykanen, and L. Sistonen, *Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1118-31.
289. McMillan, D.R., et al., *Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7523-8.
290. Xiao, X., et al., *HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice*. EMBO J, 1999. **18**(21): p. 5943-52.
291. Morimoto, R.I. and M.G. Santoro, *Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(9): p. 833-8.
292. Craig, E.A. and C.A. Gross, *Is hsp70 the cellular thermometer?* Trends Biochem Sci, 1991. **16**(4): p. 135-40.
293. Voellmy, R., *Feedback regulation of the heat shock response*. Handb Exp Pharmacol, 2006(172): p. 43-68.
294. Satyal, S.H., et al., *Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1*. Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 1962-74.
295. Cotto, J.J., M. Kline, and R.I. Morimoto, *Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation*. J Biol Chem, 1996. **271**(7): p. 3355-8.
296. Anckar, J., et al., *Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(3): p. 955-64.
297. Hietakangas, V., et al., *Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(8): p. 2953-68.
298. Inouye, S., et al., *Activation of heat shock genes is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a single exposure to high temperatures*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(16): p. 5882-95.
299. Zhang, Y., et al., *Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones*. J Cell Biochem, 2002. **86**(2): p. 376-93.
300. Nakai, A., M. Suzuki, and M. Tanabe, *Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1*. EMBO J, 2000. **19**(7): p. 1545-54.
301. Vydra, N., et al., *Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells*. Cell Death Differ, 2006. **13**(2): p. 212-22.
302. Widlak, W., et al., *Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific hst70 gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(2): p. 535-41.
303. Widlak, W., et al., *Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70 kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testes*. Genes Cells, 2007. **12**(4): p. 487-99.
304. Kus-Liskiewicz, M., et al., *Impact of heat shock transcription factor 1 on global gene expression profiles in cells which induce either cytoprotective or pro-apoptotic response following hyperthermia*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 456.
305. De Fazio, S., et al., *The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements*. Nature, 2011. **480**(7376): p. 259-63.
306. Zheng, K., et al., *Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11841-6.
307. Kallio, M., et al., *Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice*. EMBO J, 2002. **21**(11): p. 2591-601.
308. Wang, G., et al., *Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis*. Genesis, 2003. **36**(1): p. 48-61.
309. Mou, L., et al., *A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia*. Hum Genet, 2013. **132**(2): p. 159-65.
310. Bjork, J.K., et al., *miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis*. Development, 2010. **137**(19): p. 3177-84.



311. Xing, H., et al., *Mechanism of hsp70i gene bookmarking*. Science, 2005. **307**(5708): p. 421-3.
312. Ostling, P., et al., *Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7077-86.
313. Wang, Q.T., et al., *A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo*. Dev Cell, 2004. **6**(1): p. 133-44.
314. Yang, I.V. and D.A. Schwartz, *Epigenetic mechanisms and the development of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(6): p. 1243-55.
315. Huang, Y., et al., *Molecular functions of small regulatory noncoding RNA*. Biochemistry (Mosc), 2013. **78**(3): p. 221-30.
316. Qi, X., F.S. Bao, and Z. Xie, *Small RNA deep sequencing reveals role for Arabidopsis thaliana RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4971.
317. Dalakouras, A., et al., *A hairpin RNA construct residing in an intron efficiently triggered RNA-directed DNA methylation in tobacco*. Plant J, 2009. **60**(5): p. 840-51.
318. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 126-39.
319. Siomi, M.C., et al., *PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(4): p. 246-58.
320. Aravin, A.A., et al., *Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control*. Science, 2007. **316**(5825): p. 744-7.
321. Kuramochi-Miyagawa, S., et al., *DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes*. Genes Dev, 2008. **22**(7): p. 908-17.
322. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
323. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
324. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
325. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D152-7.
326. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 642-55.
327. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
328. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
329. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
330. Ketting, R.F., et al., *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans*. Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2654-9.
331. Amrouche, L., R. Bonifay, and D. Anglicheau, *[MicroRNAs in pathophysiology of renal disease: an increasing interest]*. Med Sci (Paris), 2011. **27**(4): p. 398-404.
332. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
333. Borchert, G.M., W. Lanier, and B.L. Davidson, *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1097-101.
334. Seitz, H. and P.D. Zamore, *Rethinking the microprocessor*. Cell, 2006. **125**(5): p. 827-9.
335. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
336. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
337. Yang, J.S. and E.C. Lai, *Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 892-903.
338. Kim, Y.K. and V.N. Kim, *Processing of intronic microRNAs*. Embo J, 2007. **26**(3): p. 775-83.
339. Okamura, K., et al., *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. Cell, 2007. **130**(1): p. 89-100.
340. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 83-6.

341. Babiarz, J.E., et al., *Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs*. *Genes Dev*, 2008. **22**(20): p. 2773-85.
342. Glazov, E.A., et al., *A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach*. *Genome Res*, 2008. **18**(6): p. 957-64.
343. Flynt, A.S., et al., *MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in Drosophila*. *Mol Cell*, 2010. **38**(6): p. 900-7.
344. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. *Rna*, 2004. **10**(2): p. 185-91.
345. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
346. Okada, C., et al., *A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery*. *Science*, 2009. **326**(5957): p. 1275-9.
347. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. *Science*, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
348. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. *Cell*, 2005. **123**(4): p. 631-40.
349. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
350. Lee, Y., et al., *The role of PACT in the RNA silencing pathway*. *Embo J*, 2006. **25**(3): p. 522-32.
351. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. *Cell*, 2003. **115**(2): p. 199-208.
352. Cheloufi, S., et al., *A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis*. *Nature*, 2010. **465**(7298): p. 584-9.
353. Yang, J.S., et al., *Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(34): p. 15163-8.
354. Yang, J.S., T. Maurin, and E.C. Lai, *Functional parameters of Dicer-independent microRNA biogenesis*. *Rna*, 2012. **18**(5): p. 945-57.
355. Maurin, T., et al., *RNase III-independent microRNA biogenesis in mammalian cells*. *Rna*, 2012. **18**(12): p. 2166-73.
356. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(2): p. 102-14.
357. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
358. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. *Cell*, 2009. **136**(2): p. 215-33.
359. Shin, C., et al., *Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing*. *Mol Cell*, 2010. **38**(6): p. 789-802.
360. Doench, J.G. and P.A. Sharp, *Specificity of microRNA target selection in translational repression*. *Genes Dev*, 2004. **18**(5): p. 504-11.
361. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. *Cell*, 2005. **120**(1): p. 15-20.
362. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. *Mol Cell*, 2007. **27**(1): p. 91-105.
363. Brodersen, P. and O. Voinnet, *Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(2): p. 141-8.
364. Tay, Y., et al., *MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation*. *Nature*, 2008. **455**(7216): p. 1124-8.
365. Witkos, T.M., E. Koscianska, and W.J. Krzyzosiak, *Practical Aspects of microRNA Target Prediction*. *Curr Mol Med*, 2011. **11**(2): p. 93-109.
366. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. *Science*, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
367. Meister, G., et al., *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. *Mol Cell*, 2004. **15**(2): p. 185-97.
368. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 913-63.

369. Humphreys, D.T., et al., *MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(47): p. 16961-6.
370. Wang, B., et al., *Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro*. Mol Cell, 2006. **22**(4): p. 553-60.
371. Mathonnet, G., et al., *MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1764-7.
372. Gebauer, F. and M.W. Hentze, *Molecular mechanisms of translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 827-35.
373. Richter, J.D. and N. Sonenberg, *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*. Nature, 2005. **433**(7025): p. 477-80.
374. Maroney, P.A., et al., *Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1102-7.
375. Seggerson, K., L. Tang, and E.G. Moss, *Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation*. Dev Biol, 2002. **243**(2): p. 215-25.
376. Petersen, C.P., et al., *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 533-42.
377. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
378. Brennecke, J., et al., *bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila*. Cell, 2003. **113**(1): p. 25-36.
379. Zeng, Y., E.J. Wagner, and B.R. Cullen, *Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1327-33.
380. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
381. Llave, C., et al., *Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2053-6.
382. Kiriakidou, M., et al., *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1141-51.
383. Schmitter, D., et al., *Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(17): p. 4801-15.
384. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
385. Vasudevan, S. and J.A. Steitz, *AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1105-18.
386. Chekulaeva, M. and W. Filipowicz, *Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(3): p. 452-60.
387. Breving, K. and A. Esquela-Kerscher, *The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(8): p. 1316-29.
388. Carmell, M.A., et al., *The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2733-42.
389. Song, J.J., et al., *Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1434-7.
390. Parker, J.S., S.M. Roe, and D. Barford, *Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity*. EMBO J, 2004. **23**(24): p. 4727-37.
391. Yuan, Y.R., et al., *Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage*. Mol Cell, 2005. **19**(3): p. 405-19.
392. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
393. Pillai, R.S., C.G. Artus, and W. Filipowicz, *Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis*. RNA, 2004. **10**(10): p. 1518-25.
394. Pillai, R.S., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1573-6.
395. Tritschler, F., E. Huntzinger, and E. Izaurralde, *Role of GW182 proteins and PABPC1 in the miRNA pathway: a sense of deja vu*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 379-84.
396. Wakiyama, M., et al., *Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system*. Genes Dev, 2007. **21**(15): p. 1857-62.

397. Jakymiw, A., et al., *The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 8): p. 1317-23.
398. Meister, G., et al., *Identification of novel argonaute-associated proteins*. Curr Biol, 2005. **15**(23): p. 2149-55.
399. Sheth, U. and R. Parker, *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies*. Science, 2003. **300**(5620): p. 805-8.
400. Liu, J., et al., *A role for the P-body component GW182 in microRNA function*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(12): p. 1261-6.
401. Sen, G.L. and H.M. Blau, *Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(6): p. 633-6.
402. Monteyts, A.M., et al., *Structure and activity of putative intronic miRNA promoters*. Rna, 2010. **16**(3): p. 495-505.
403. Wang, X., et al., *High-resolution human core-promoter prediction with CoreBoost\_HM*. Genome Res, 2009. **19**(2): p. 266-75.
404. Lee, Y.S. and A. Dutta, *MicroRNAs in cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 199-227.
405. Ozsolak, F., et al., *Chromatin structure analyses identify miRNA promoters*. Genes Dev, 2008. **22**(22): p. 3172-83.
406. Iwai, N. and H. Naraba, *Polymorphisms in human pre-miRNAs*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(4): p. 1439-44.
407. Harnprasopwat, R., et al., *Alteration of processing induced by a single nucleotide polymorphism in pri-miR-126*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **399**(2): p. 117-22.
408. Sun, G., et al., *SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function*. Rna, 2009. **15**(9): p. 1640-51.
409. Hu, Z., et al., *Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2600-8.
410. Libri, V., et al., *Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(19): p. 3525-44.
411. Trabucchi, M., et al., *The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 1010-4.
412. Zhang, X., et al., *The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response*. Mol Cell, 2011. **41**(4): p. 371-83.
413. Briata, P., et al., *PI3K/AKT signaling determines a dynamic switch between distinct KSRP functions favoring skeletal myogenesis*. Cell Death Differ, 2012. **19**(3): p. 478-87.
414. Kawahara, Y. and A. Mieda-Sato, *TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. 3347-52.
415. Wu, H., et al., *A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing*. Mol Cell, 2010. **38**(1): p. 67-77.
416. Newman, M.A., J.M. Thomson, and S.M. Hammond, *Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing*. Rna, 2008. **14**(8): p. 1539-49.
417. Piskounova, E., et al., *Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms*. Cell, 2011. **147**(5): p. 1066-79.
418. Heo, I., et al., *Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA*. Mol Cell, 2008. **32**(2): p. 276-84.
419. Piskounova, E., et al., *Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28*. J Biol Chem, 2008. **283**(31): p. 21310-4.
420. Nam, Y., et al., *Molecular basis for interaction of let-7 microRNAs with Lin28*. Cell, 2011. **147**(5): p. 1080-91.
421. Blow, M.J., et al., *RNA editing of human microRNAs*. Genome Biol, 2006. **7**(4): p. R27.
422. Yang, W., et al., *Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(1): p. 13-21.
423. Scadden, A.D., *The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(6): p. 489-96.
424. Michlewski, G., et al., *Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops*. Mol Cell, 2008. **32**(3): p. 383-93.
425. Guil, S. and J.F. Caceres, *The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(7): p. 591-6.
426. Michlewski, G. and J.F. Caceres, *Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(8): p. 1011-8.
427. Davis-Dusenbery, B.N. and A. Hata, *Mechanisms of control of microRNA biogenesis*. J Biochem, 2010. **148**(4): p. 381-92.

428. Zisoulis, D.G., et al., *Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute*. *Nature*, 2012. **486**(7404): p. 541-4.
429. McIver, S.C., et al., *A unique combination of male germ cell miRNAs coordinates gonocyte differentiation*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35553.
430. Hwang, H.W., E.A. Wentzel, and J.T. Mendell, *A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import*. *Science*, 2007. **315**(5808): p. 97-100.
431. Barad, O., et al., *Efficiency and specificity in microRNA biogenesis*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(6): p. 650-2.
432. Fukuda, T., et al., *DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(5): p. 604-11.
433. Davis, B.N., et al., *SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation*. *Nature*, 2008. **454**(7200): p. 56-61.
434. Davis, B.N., et al., *Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha*. *Mol Cell*, 2010. **39**(3): p. 373-84.
435. Blahna, M.T. and A. Hata, *Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis*. *FEBS Lett*, 2012. **586**(14): p. 1906-12.
436. Suzuki, H.I., et al., *Modulation of microRNA processing by p53*. *Nature*, 2009. **460**(7254): p. 529-33.
437. Kawai, S. and A. Amano, *BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex*. *J Cell Biol*, 2012. **197**(2): p. 201-8.
438. Yu, B., et al., *The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(29): p. 10073-8.
439. Gruber, J.J., et al., *Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation*. *Cell*, 2009. **138**(2): p. 328-39.
440. Hong, S., et al., *Signaling by p38 MAPK stimulates nuclear localization of the microprocessor component p68 for processing of selected primary microRNAs*. *Sci Signal*, 2013. **6**(266): p. ra16.
441. Yamagata, K., et al., *Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor*. *Mol Cell*, 2009. **36**(2): p. 340-7.
442. Sakamoto, S., et al., *The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(13): p. 3754-69.
443. Brownawell, A.M. and I.G. Macara, *Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins*. *J Cell Biol*, 2002. **156**(1): p. 53-64.
444. Grimm, D., et al., *Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways*. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 537-41.
445. Bennasser, Y., et al., *Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(3): p. 323-7.
446. Nothnick, W.B., C. Healy, and X. Hong, *Steroid regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1*. *Endocrine*, 2010. **37**(2): p. 265-73.
447. Koscianska, E., J. Starega-Roslan, and W.J. Krzyzosiak, *The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28548.
448. Paroo, Z., et al., *Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling*. *Cell*, 2009. **139**(1): p. 112-22.
449. Choudhury, N.R. and G. Michlewski, *Terminal loop-mediated control of microRNA biogenesis*. *Biochem Soc Trans*, 2012. **40**(4): p. 789-93.
450. Rau, F., et al., *Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(7): p. 840-5.
451. Heo, I., et al., *TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation*. *Cell*, 2009. **138**(4): p. 696-708.
452. Newman, M.A., V. Mani, and S.M. Hammond, *Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification*. *Rna*, 2011. **17**(10): p. 1795-803.
453. Heo, I., et al., *Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs*. *Cell*, 2012. **151**(3): p. 521-32.
454. Xhemalce, B., S.C. Robson, and T. Kouzarides, *Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing*. *Cell*, 2012. **151**(2): p. 278-88.
455. Park, J.E., et al., *Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing*. *Nature*, 2011. **475**(7355): p. 201-5.
456. Suzuki, H.I., et al., *MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation*. *Mol Cell*, 2011. **44**(3): p. 424-36.

457. Nishikura, K., *Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 321-49.
458. Kawahara, Y., et al., *RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex*. EMBO Rep, 2007. **8**(8): p. 763-9.
459. Heale, B.S., et al., *Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNA pathways*. Embo J, 2009. **28**(20): p. 3145-56.
460. Hellwig, S. and B.L. Bass, *A starvation-induced noncoding RNA modulates expression of Dicer-regulated genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 12897-902.
461. Diederichs, S. and D.A. Haber, *Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1097-108.
462. O'Carroll, D., et al., *A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway*. Genes Dev, 2007. **21**(16): p. 1999-2004.
463. Adams, B.D., K.P. Claffey, and B.A. White, *Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells*. Endocrinology, 2009. **150**(1): p. 14-23.
464. Rudel, S., et al., *Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding*. Nucleic Acids Res, 2012. **39**(6): p. 2330-43.
465. Bail, S., et al., *Differential regulation of microRNA stability*. Rna, 2010. **16**(5): p. 1032-9.
466. Gantier, M.P., et al., *Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(13): p. 5692-703.
467. Ruegger, S. and H. Grosshans, *MicroRNA turnover: when, how, and why*. Trends Biochem Sci, 2012. **37**(10): p. 436-46.
468. Krol, J., et al., *Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs*. Cell, 2010. **141**(4): p. 618-31.
469. Sethi, P. and W.J. Lukiw, *Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex*. Neurosci Lett, 2009. **459**(2): p. 100-4.
470. Rajasethupathy, P., et al., *Characterization of small RNAs in Aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB*. Neuron, 2009. **63**(6): p. 803-17.
471. Rissland, O.S., S.J. Hong, and D.P. Bartel, *MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 993-1004.
472. Zhang, Z., et al., *Uracils at nucleotide position 9-11 are required for the rapid turnover of miR-29 family*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(10): p. 4387-95.
473. Huang, Y., et al., *Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1*. Nature, 2009. **461**(7265): p. 823-7.
474. Zhao, Y., et al., *The Arabidopsis nucleotidyl transferase HESO1 uridylylates unmethylated small RNAs to trigger their degradation*. Curr Biol, 2012. **22**(8): p. 689-94.
475. Kamminga, L.M., et al., *Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish*. Embo J, 2010. **29**(21): p. 3688-700.
476. Schmidt, M.J., S. West, and C.J. Norbury, *The human cytoplasmic RNA terminal U-transferase ZCCHC11 targets histone mRNAs for degradation*. Rna, 2011. **17**(1): p. 39-44.
477. Westholm, J.O., et al., *Common and distinct patterns of terminal modifications to mirtrons and canonical microRNAs*. Rna, 2012. **18**(2): p. 177-92.
478. Burroughs, A.M., et al., *A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness*. Genome Res, 2010. **20**(10): p. 1398-410.
479. Hagan, J.P., E. Piskounova, and R.I. Gregory, *Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(10): p. 1021-5.
480. Jones, M.R., et al., *Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1157-63.
481. Katoh, T., et al., *Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2*. Genes Dev, 2009. **23**(4): p. 433-8.
482. Backes, S., et al., *Degradation of host microRNAs by poxvirus poly(A) polymerase reveals terminal RNA methylation as a protective antiviral mechanism*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(2): p. 200-10.
483. Ramachandran, V. and X. Chen, *Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis*. Science, 2008. **321**(5895): p. 1490-2.
484. Kai, Z.S. and A.E. Pasquinelli, *MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(1): p. 5-10.

485. Gy, I., et al., *Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors*. Plant Cell, 2007. **19**(11): p. 3451-61.
486. Ballarino, M., et al., *Coupled RNA processing and transcription of intergenic primary microRNAs*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(20): p. 5632-8.
487. Chatterjee, S. and H. Grosshans, *Active turnover modulates mature microRNA activity in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2009. **461**(7263): p. 546-9.
488. Chatterjee, S., et al., *Target-mediated protection of endogenous microRNAs in C. elegans*. Dev Cell, 2011. **20**(3): p. 388-96.
489. Das, S.K., et al., *Human polynucleotide phosphorylase (hPNPase(old-35)): an evolutionary conserved gene with an expanding repertoire of RNA degradation functions*. Oncogene, 2011. **30**(15): p. 1733-43.
490. Thomas, M.F., et al., *Eri1 regulates microRNA homeostasis and mouse lymphocyte development and antiviral function*. Blood, 2012. **120**(1): p. 130-42.
491. Chen, A.J., et al., *STAR RNA-binding protein Quaking suppresses cancer via stabilization of specific miRNA*. Genes Dev, 2012. **26**(13): p. 1459-72.
492. Tomari, Y., T. Du, and P.D. Zamore, *Sorting of Drosophila small silencing RNAs*. Cell, 2007. **130**(2): p. 299-308.
493. Ameres, S.L., et al., *Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs*. Science, 2010. **328**(5985): p. 1534-9.
494. Baccarini, A., et al., *Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells*. Curr Biol, 2011. **21**(5): p. 369-76.
495. Gilad, S., et al., *Serum microRNAs are promising novel biomarkers*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3148.
496. Stoorvogel, W., et al., *The biogenesis and functions of exosomes*. Traffic, 2002. **3**(5): p. 321-30.
497. Boon, R.A. and K.C. Vickers, *Intercellular transport of microRNAs*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(2): p. 186-92.
498. Allegra, A., et al., *Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review)*. Int J Oncol, 2012. **41**(6): p. 1897-912.
499. Xu, L., B.F. Yang, and J. Ai, *MicroRNA transport: a new way in cell communication*. J Cell Physiol, 2013. **228**(8): p. 1713-9.
500. Mause, S.F. and C. Weber, *Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange*. Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1047-57.
501. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 423-33.
502. Turchinovich, A., et al., *Characterization of extracellular circulating microRNA*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(16): p. 7223-33.
503. Arroyo, J.D., et al., *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 5003-8.
504. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **110**(1): p. 13-21.
505. Hunter, M.P., et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3694.
506. Mittelbrunn, M., et al., *Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 282.
507. Gallo, A., et al., *The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e30679.
508. Bryant, R.J., et al., *Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer*. Br J Cancer, 2012. **106**(4): p. 768-74.
509. Bellingham, S.A., B.M. Coleman, and A.F. Hill, *Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(21): p. 10937-49.
510. Berardi, E., et al., *miRNAs in ESC differentiation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(8): p. H931-9.
511. Cobb, B.S., et al., *A role for Dicer in immune regulation*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2519-27.
512. Wang, Y., et al., *DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 380-5.

513. Johnson, C.D., et al., *The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(16): p. 7713-22.
514. Akao, Y., Y. Nakagawa, and T. Naoe, *MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers*. *Oncol Rep*, 2006. **16**(4): p. 845-50.
515. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. *Cancer Res*, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
516. Pekarsky, Y., et al., *Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181*. *Cancer Res*, 2006. **66**(24): p. 11590-3.
517. Costinean, S., et al., *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(18): p. 7024-9.
518. Ma, L., et al., *miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis*. *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(3): p. 247-56.
519. Wang, Z., et al., *Suppression of p21 by c-Myc through members of miR-17 family at the post-transcriptional level*. *Int J Oncol*, 2010. **37**(5): p. 1315-21.
520. Zhang, B., et al., *A dosage-dependent pleiotropic role of Dicer in prostate cancer growth and metastasis*. *Oncogene*, 2013.
521. Faber, C., et al., *Overexpression of Dicer predicts poor survival in colorectal cancer*. *Eur J Cancer*, 2011. **47**(9): p. 1414-9.
522. Chiosea, S., et al., *Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(5): p. 1812-20.
523. Ma, Z., et al., *Up-regulated Dicer expression in patients with cutaneous melanoma*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e20494.
524. Jafari, N., et al., *Expression levels of microRNA machinery components Drosha, Dicer and DGCR8 in human (AGS, HepG2, and KEYSE-30) cancer cell lines*. *Int J Clin Exp Med*, 2013. **6**(4): p. 269-74.
525. Kuang, Y., et al., *Repression of Dicer is associated with invasive phenotype and chemoresistance in ovarian cancer*. *Oncol Lett*, 2013. **5**(4): p. 1149-1154.
526. Sugito, N., et al., *RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(24): p. 7322-8.
527. Zhang, J., et al., *Up-regulation of Ago2 expression in gastric carcinoma*. *Med Oncol*, 2013. **30**(3): p. 628.
528. Gonzalez-Gonzalez, E., P.P. Lopez-Casas, and J. del Mazo, *The expression patterns of genes involved in the RNAi pathways are tissue-dependent and differ in the germ and somatic cells of mouse testis*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1779**(5): p. 306-11.
529. Wu, Q., et al., *The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(30): p. 25173-90.
530. Bernstein, E., et al., *Dicer is essential for mouse development*. *Nat Genet*, 2003. **35**(3): p. 215-7.
531. Papaioannou, M.D., et al., *Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice*. *Dev Biol*, 2009. **326**(1): p. 250-9.
532. Papaioannou, M.D., et al., *Loss of Dicer in Sertoli cells has a major impact on the testicular proteome of mice*. *Mol Cell Proteomics*, 2011. **10**(4): p. M900587MCP200.
533. Maatouk, D.M., et al., *Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline*. *Biol Reprod*, 2008. **79**(4): p. 696-703.
534. Yadav, R.P. and N. Kotaja, *Small RNAs in spermatogenesis*. *Mol Cell Endocrinol*, 2013.
535. Romero, Y., et al., *Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25241.
536. Liu, D., et al., *Inactivation of Dicer1 has a severe cumulative impact on the formation of mature germ cells in mouse testes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **422**(1): p. 114-20.
537. Murchison, E.P., et al., *Critical roles for Dicer in the female germline*. *Genes Dev*, 2007. **21**(6): p. 682-93.
538. Korhonen, H.M., et al., *Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e24821.
539. Greenlee, A.R., et al., *Deregulated sex chromosome gene expression with male germ cell-specific loss of Dicer1*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46359.
540. Murchison, E.P., et al., *Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(34): p. 12135-40.
541. Kanellopoulou, C., et al., *Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing*. *Genes Dev*, 2005. **19**(4): p. 489-501.



542. Modzelewski, A.J., et al., *AGO4 regulates entry into meiosis and influences silencing of sex chromosomes in the male mouse germline*. Dev Cell, 2012. **23**(2): p. 251-64.
543. Hayashi, K., et al., *MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1738.
544. Real, F.M., et al., *A MicroRNA (mmu-miR-124) Prevents Sox9 Expression in Developing Mouse Ovarian Cells*. Biol Reprod, 2013. **89**(4): p. 78.
545. Wainwright, E.N., et al., *SOX9 regulates microRNA miR-202-5p/3p expression during mouse testis differentiation*. Biol Reprod, 2013. **89**(2): p. 34.
546. Rakoczy, J., et al., *MicroRNAs-140-5p/140-3p modulate Leydig cell numbers in the developing mouse testis*. Biol Reprod, 2013. **88**(6): p. 143.
547. Song, R., et al., *Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation*. Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 488-93.
548. Papaioannou, M.D. and S. Nef, *microRNAs in the testis: building up male fertility*. J Androl, 2010. **31**(1): p. 26-33.
549. McIver, S.C., et al., *miRNA and mammalian male germ cells*. Hum Reprod Update, 2012. **18**(1): p. 44-59.
550. Yan, N., et al., *A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues*. Reproduction, 2007. **134**(1): p. 73-9.
551. Buchold, G.M., et al., *Analysis of microRNA expression in the prepubertal testis*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15317.
552. Smorag, L., et al., *MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203 and -34b-5p mediated spermatogenesis regulation*. Biol Cell, 2012. **104**(11): p. 677-92.
553. Marcon, E., et al., *miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus*. Chromosome Res, 2008. **16**(2): p. 243-60.
554. Meunier, J., et al., *Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes*. Genome Res, 2013. **23**(1): p. 34-45.
555. Huszar, J.M. and C.J. Payne, *MicroRNA 146 (Mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice*. Biol Reprod, 2013. **88**(1): p. 15.
556. Yang, Q.E., et al., *MicroRNAs 221 and 222 regulate the undifferentiated state in mammalian male germ cells*. Development, 2013. **140**(2): p. 280-90.
557. Tong, M.H., et al., *Two miRNA clusters, Mir-17-92 (Mirc1) and Mir-106b-25 (Mirc3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice*. Biol Reprod, 2012. **86**(3): p. 72.
558. Niu, Z., et al., *MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(31): p. 12740-5.
559. Bouhallier, F., et al., *Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis*. RNA, 2010. **16**(4): p. 720-31.
560. Liang, X., et al., *MicroRNA-34c enhances murine male germ cell apoptosis through targeting ATF1*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33861.
561. Bao, J., et al., *MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway*. J Biol Chem, 2012. **287**(26): p. 21686-98.
562. Dai, L., et al., *Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: implications of its role in germ cell development*. J Biol Chem, 2011. **286**(52): p. 44306-18.
563. Yu, Z., T. Raabe, and N.B. Hecht, *MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage*. Biol Reprod, 2005. **73**(3): p. 427-33.
564. Hamatani, T., *Human spermatozoal RNAs*. Fertil Steril, 2012. **97**(2): p. 275-81.
565. Liu, W.M., et al., *Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(2): p. 490-4.
566. Hill, D.A., et al., *DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma*. Science, 2009. **325**(5943): p. 965.
567. de Boer, C.M., et al., *DICER1 RNase IIIb domain mutations are infrequent in testicular germ cell tumours*. BMC Res Notes, 2012. **5**: p. 569.
568. Sabbaghian, N., et al., *Germ-line DICER1 mutations do not make a major contribution to the etiology of familial testicular germ cell tumours*. BMC Res Notes, 2013. **6**: p. 127.

569. Novotny, G.W., et al., *MicroRNA expression profiling of carcinoma in situ cells of the testis*. *Endocr Relat Cancer*, 2012. **19**(3): p. 365-79.
570. Liu, L., et al., *MicroRNA-302a sensitizes testicular embryonal carcinoma cells to cisplatin-induced cell death*. *J Cell Physiol*, 2013. **228**(12): p. 2294-304.
571. Bing, Z., et al., *MicroRNA expression profiles of seminoma from paraffin-embedded formalin-fixed tissue*. *Virchows Arch*, 2012. **461**(6): p. 663-8.
572. Huang, Z., et al., *Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(1): p. 118-26.
573. Giraldez, M.D., et al., *Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a genome-wide profiling and validation study*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013. **11**(6): p. 681-8 e3.
574. Luo, X., et al., *Identification and evaluation of plasma MicroRNAs for early detection of colorectal cancer*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e62880.
575. Vega, A.B., et al., *microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers*. *Oncol Rep*, 2013. **30**(1): p. 320-6.
576. Faltejškova, P., et al., *Circulating miR-17-3p, miR-29a, miR-92a and miR-135b in serum: Evidence against their usage as biomarkers in colorectal cancer*. *Cancer Biomark*, 2012. **12**(4): p. 199-204.
577. Pu, X.X., et al., *Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010. **25**(10): p. 1674-80.
578. Meunier, L., et al., *Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and Mcl-1*. *Endocrinology*. **153**(4): p. 1936-47.
579. Cheng, H., et al., *Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e17745.
580. Paraskevi, A., et al., *Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease*. *J Crohns Colitis*, 2012. **6**(9): p. 900-4.
581. Wang, L.G. and J. Gu, *Serum microRNA-29a is a promising novel marker for early detection of colorectal liver metastasis*. *Cancer Epidemiol*, 2012. **36**(1): p. e61-7.
582. Maclellan, S.A., et al., *Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions*. *Cancer Med*, 2012. **1**(2): p. 268-74.
583. Zeng, X., et al., *Circulating miR-17, miR-20a, miR-29c, and miR-223 combined as non-invasive biomarkers in nasopharyngeal carcinoma*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46367.
584. Xie, L., et al., *Cell-free miRNAs may indicate diagnosis and docetaxel sensitivity of tumor cells in malignant effusions*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 591.
585. Weber, J.A., et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. *Clin Chem*, 2010. **56**(11): p. 1733-41.
586. Kaduthanam, S., et al., *Serum miR-142-3p is associated with early relapse in operable lung adenocarcinoma patients*. *Lung Cancer*, 2013. **80**(2): p. 223-7.
587. Wei, C., et al., *Circulating miRNAs as potential marker for pulmonary hypertension*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64396.
588. Ueda, T., et al., *Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(2): p. 136-46.
589. Morimura, R., et al., *Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer*. *Br J Cancer*, 2011. **105**(11): p. 1733-40.
590. Oyama, R., et al., *Circulating microRNA associated with TNF-alpha signaling pathway in patients with plaque psoriasis*. *J Dermatol Sci*, 2011. **61**(3): p. 209-11.
591. Greenberg, E., et al., *A comparative analysis of total serum miRNA profiles identifies novel signature that is highly indicative of metastatic melanoma: a pilot study*. *Biomarkers*, 2013. **18**(6): p. 502-8.
592. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
593. Brase, J.C., et al., *Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(3): p. 608-16.
594. Jung, E.J., et al., *Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients*. *Cancer*, 2012. **118**(10): p. 2603-14.
595. Moussay, E., et al., *MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(16): p. 6573-8.

596. Yang, Q., et al., *Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women.* Clin Chim Acta, 2011. **412**(23-24): p. 2167-73.
597. Cogswell, J.P., et al., *Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways.* J Alzheimers Dis, 2008. **14**(1): p. 27-41.
598. Zhu, S., et al., *Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects.* Clin Chim Acta, 2013. **424**: p. 66-72.
599. Goren, Y., et al., *Serum levels of microRNAs in patients with heart failure.* Eur J Heart Fail, 2012. **14**(2): p. 147-54.
600. Ikonomidis, J.S., et al., *Plasma biomarkers for distinguishing etiologic subtypes of thoracic aortic aneurysm disease.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2013. **145**(5): p. 1326-33.
601. Devaux, Y., et al., *A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70644.
602. Karolina, D.S., et al., *Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome.* J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(12): p. E2271-6.
603. Nielsen, L.B., et al., *Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression.* Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 896362.
604. Zampetaki, A., et al., *Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes.* Circ Res, 2010. **107**(6): p. 810-7.
605. Zhang, Q., I. Kandic, and M.J. Kutryk, *Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease.* Biochem Biophys Res Commun, 2011. **405**(1): p. 42-6.
606. Adams, B.D., H. Furneaux, and B.A. White, *The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines.* Mol Endocrinol, 2007. **21**(5): p. 1132-47.
607. Zhao, J.J., et al., *MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer.* J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 31079-86.
608. Xiong, J., et al., *An estrogen receptor alpha suppressor, microRNA-22, is downregulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer cell lines and clinical samples.* FEBS J, 2010. **277**(7): p. 1684-94.
609. Yang, Z. and L. Wang, *Regulation of microRNA expression and function by nuclear receptor signaling.* Cell Biosci, 2011. **1**(1): p. 31.
610. Wu, J., et al., *MicroRNA-184 downregulates nuclear receptor corepressor 2 in mouse spermatogenesis.* BMC Dev Biol, 2011. **11**: p. 64.
611. Yokoi, T. and M. Nakajima, *microRNAs as mediators of drug toxicity.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013. **53**: p. 377-400.
612. Rieger, J.K., et al., *Expression variability of absorption, distribution, metabolism, excretion-related microRNAs in human liver: influence of nongenetic factors and association with gene expression.* Drug Metab Dispos, 2013. **41**(10): p. 1752-62.
613. Zhang, Y., et al., *MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a.* J Mol Med (Berl), 2009. **87**(1): p. 43-51.
614. Marczylo, E.L., et al., *Smoking induces differential miRNA expression in human spermatozoa: a potential transgenerational epigenetic concern?* Epigenetics, 2012. **7**(5): p. 432-9.
615. Wang, Y., et al., *Identification of rat lung-specific microRNAs by microRNA microarray: valuable discoveries for the facilitation of lung research.* BMC Genomics, 2007. **8**: p. 29.
616. Satoh, M., et al., *Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy.* J Card Fail, 2010. **16**(5): p. 404-10.
617. Grueter, C.E., et al., *A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of MED13.* Cell, 2012. **149**(3): p. 671-83.
618. Fukushima, T., et al., *MicroRNAs expression in the ethylene glycol monomethyl ether-induced testicular lesion.* J Toxicol Sci, 2011. **36**(5): p. 601-11.
619. Fullston, T., et al., *Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content.* FASEB J, 2013. **27**(10): p. 4226-43.
620. Choi, J.S., et al., *miRNA regulation of cytotoxic effects in mouse Sertoli cells exposed to nonylphenol.* Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 126.

621. Luense, L.J., et al., *Developmental programming: gestational testosterone treatment alters fetal ovarian gene expression*. *Endocrinology*, 2011. **152**(12): p. 4974-83.
622. Veiga-Lopez, A., et al., *Developmental programming: gestational bisphenol-A treatment alters trajectory of fetal ovarian gene expression*. *Endocrinology*, 2013. **154**(5): p. 1873-84.
623. Yao, N., et al., *Follicle-stimulating hormone regulation of microRNA expression on progesterone production in cultured rat granulosa cells*. *Endocrine*, 2010. **38**(2): p. 158-66.
624. Mondou, E., et al., *Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development*. *Mol Hum Reprod*, 2012. **18**(9): p. 425-34.
625. Lim, W., et al., *Expression and regulation of beta-defensin 11 in the oviduct in response to estrogen and in ovarian tumors of chickens*. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. **366**(1): p. 1-8.
626. Lim, W., et al., *Differential expression of secreted phosphoprotein 1 in response to estradiol-17beta and in ovarian tumors in chickens*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **422**(3): p. 494-500.
627. Zhao, Y., et al., *Effect of luteal-phase support on endometrial microRNA expression following controlled ovarian stimulation*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012. **10**: p. 72.
628. Fu, T.Y., C.T. Lin, and P.C. Tang, *Steroid hormone-regulated let-7b mediates cell proliferation and basigin expression in the mouse endometrium*. *J Reprod Dev*, 2011. **57**(5): p. 627-35.
629. Williams, K.C., et al., *The microRNA (miR)-199a/214 cluster mediates opposing effects of progesterone and estrogen on uterine contractility during pregnancy and labor*. *Mol Endocrinol*, 2012. **26**(11): p. 1857-67.
630. Nold, C., et al., *Prevention of preterm birth by progestational agents: what are the molecular mechanisms?* *Am J Obstet Gynecol*, 2013. **208**(3): p. 223 e1-7.
631. Jenny, M.J., N. Aluru, and M.E. Hahn, *Effects of short-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on microRNA expression in zebrafish embryos*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012. **264**(2): p. 262-73.
632. Zhao, Y., Q. Xiong, and P. Xie, *Analysis of microRNA expression in embryonic developmental toxicity induced by MC-RR*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22676.
633. Zhang, L., et al., *MicroRNA expression changes during zebrafish development induced by perfluorooctane sulfonate*. *J Appl Toxicol*, 2011. **31**(3): p. 210-22.
634. Lee, Y.M., et al., *MicroRNA regulation via DNA methylation during the morula to blastocyst transition in mice*. *Mol Hum Reprod*, 2012. **18**(4): p. 184-93.
635. Taki, K., et al., *Microarray analysis of 6-mercaptopurine-induced-toxicity-related genes and microRNAs in the rat placenta*. *J Toxicol Sci*, 2013. **38**(1): p. 159-67.
636. Cindrova-Davies, T., et al., *Reduced cystathionine gamma-lyase and increased miR-21 expression are associated with increased vascular resistance in growth-restricted pregnancies: hydrogen sulfide as a placental vasodilator*. *Am J Pathol*, 2013. **182**(4): p. 1448-58.
637. Tilghman, S.L., et al., *Endocrine disruptor regulation of microRNA expression in breast carcinoma cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32754.
638. Teng, Y., et al., *Endocrine disruptors fludioxonil and fenhexamid stimulate miR-21 expression in breast cancer cells*. *Toxicol Sci*, 2013. **131**(1): p. 71-83.
639. Lee, Y.M., et al., *miRNA-34b as a tumor suppressor in estrogen-dependent growth of breast cancer cells*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(6): p. R116.
640. Antoon, J.W., et al., *Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase alters microRNA expression and reverses epithelial-to-mesenchymal transition*. *Int J Oncol*, 2013. **42**(4): p. 1139-50.
641. Bai, J.X., et al., *Tamoxifen represses miR-200 microRNAs and promotes epithelial-to-mesenchymal transition by up-regulating c-Myc in endometrial carcinoma cell lines*. *Endocrinology*, 2013. **154**(2): p. 635-45.
642. Hsu, P.Y., et al., *Xenoestrogen-induced epigenetic repression of microRNA-9-3 in breast epithelial cells*. *Cancer Res*, 2009. **69**(14): p. 5936-45.
643. Zhang, G., et al., *Cisplatin treatment leads to changes in nuclear protein and microRNA expression*. *Mutat Res*. **746**(1): p. 66-77.
644. Cufi, S., et al., *Metformin lowers the threshold for stress-induced senescence: a role for the microRNA-200 family and miR-205*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(6): p. 1235-46.
645. Kim, Y.J., et al., *MicroRNA 21 regulates the proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and high-fat diet-induced obesity alters microRNA 21 expression in white adipose tissues*. *J Cell Physiol*, 2012. **227**(1): p. 183-93.
646. Parra, P., F. Serra, and A. Palou, *Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice*. *PLoS One*, 2010. **5**(9): p. e13005.

647. Takanabe, R., et al., *Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **376**(4): p. 728-32.
648. Farraj, A.K., et al., *ST depression, arrhythmia, vagal dominance, and reduced cardiac micro-RNA in particulate-exposed rats*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. **44**(2): p. 185-96.
649. Vacchi-Suzzi, C., et al., *Perturbation of microRNAs in rat heart during chronic doxorubicin treatment*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40395.
650. Singh, N.P., et al., *Prenatal exposure to TCDD triggers significant modulation of microRNA expression profile in the thymus that affects consequent gene expression*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45054.
651. Izzotti, A., et al., *Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke*. *FASEB J*, 2009. **23**(3): p. 806-12.
652. Schembri, F., et al., *MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(7): p. 2319-24.
653. Kalscheuer, S., et al., *Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(12): p. 2394-9.
654. Wang, F., et al., *Effect of exposure to volatile organic compounds (VOCs) on airway inflammatory response in mice*. *J Toxicol Sci*, 2012. **37**(4): p. 739-48.
655. Izzotti, A., et al., *Relationships between pulmonary micro-RNA and proteome profiles, systemic cytogenetic damage and lung tumors in cigarette smoke-exposed mice treated with chemopreventive agents*. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(10): p. 2322-9.
656. Bourdon, J.A., et al., *Carbon black nanoparticle intratracheal installation results in large and sustained changes in the expression of miR-135b in mouse lung*. *Environ Mol Mutagen*, 2012. **53**(6): p. 462-8.
657. Cui, F.M., et al., *Radon-induced alterations in micro-RNA expression profiles in transformed BEAS2B cells*. *J Toxicol Environ Health A*, 2013. **76**(2): p. 107-19.
658. Bolleyn, J., et al., *Effect of Trichostatin A on miRNA expression in cultures of primary rat hepatocytes*. *Toxicol In Vitro*, 2011. **25**(6): p. 1173-82.
659. Zhang, B. and X. Pan, *RDX induces aberrant expression of microRNAs in mouse brain and liver*. *Environ Health Perspect*, 2009. **117**(2): p. 231-40.
660. Fukushima, T., et al., *Changes of micro-RNA expression in rat liver treated by acetaminophen or carbon tetrachloride--regulating role of micro-RNA for RNA expression*. *J Toxicol Sci*, 2007. **32**(4): p. 401-9.
661. Elyakim, E., et al., *hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy*. *Cancer Res*, 2010. **70**(20): p. 8077-87.
662. Pogribny, I.P., et al., *Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure*. *Mutat Res*, 2007. **619**(1-2): p. 30-7.
663. Starckx, S., et al., *Evaluation of miR-122 and other biomarkers in distinct acute liver injury in rats*. *Toxicol Pathol*, 2013. **41**(5): p. 795-804.
664. Dippold, R.P., et al., *Chronic ethanol feeding enhances miR-21 induction during liver regeneration while inhibiting proliferation in rats*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012. **303**(6): p. G733-43.
665. Dai, B.H., et al., *microRNA-199a-5p protects hepatocytes from bile acid-induced sustained endoplasmic reticulum stress*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e604.
666. Ahn, J., et al., *Lycopene inhibits hepatic steatosis via microRNA-21-induced downregulation of fatty acid-binding protein 7 in mice fed a high-fat diet*. *Mol Nutr Food Res*, 2012. **56**(11): p. 1665-74.
667. Yang, Y.M., et al., *Decrease of microRNA-122 causes hepatic insulin resistance by inducing protein tyrosine phosphatase 1B, which is reversed by licorice flavonoid*. *Hepatology*, 2012. **56**(6): p. 2209-20.
668. Boesch-Saadatmandi, C., et al., *Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver in vivo - role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b*. *Pharmacol Res*, 2012. **65**(5): p. 523-30.
669. Yin, H., et al., *MicroRNA-217 promotes ethanol-induced fat accumulation in hepatocytes by down-regulating SIRT1*. *J Biol Chem*. **287**(13): p. 9817-26.
670. Juhasz, K., et al., *Very early effect of DMBA and MNU on microRNA expression*. *In Vivo*, 2013. **27**(1): p. 113-7.
671. Fabbri, M., et al., *Whole genome analysis and microRNAs regulation in HepG2 cells exposed to cadmium*. *Altex*. **29**(2): p. 173-82.

672. Song, M.K., Y.K. Park, and J.C. Ryu, *Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-mediated upregulation of hepatic microRNA-181 family promotes cancer cell migration by targeting MAPK phosphatase-5, regulating the activation of p38 MAPK*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. **273**(1): p. 130-139.
673. Benoit, C., et al., *Early leptin blockade predisposes fat-fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs*. *J Endocrinol*, 2013. **218**(1): p. 35-47.
674. Pogue, A.I., et al., *Characterization of an NF-kappaB-regulated, miRNA-146a-mediated down-regulation of complement factor H (CFH) in metal-sulfate-stressed human brain cells*. *J Inorg Biochem*, 2009. **103**(11): p. 1591-5.
675. Lukiw, W.J. and A.I. Pogue, *Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells*. *J Inorg Biochem*, 2007. **101**(9): p. 1265-9.
676. Sathyan, P., H.B. Golden, and R.C. Miranda, *Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium*. *J Neurosci*, 2007. **27**(32): p. 8546-57.
677. Zhou, R., et al., *Evidence for selective microRNAs and their effectors as common long-term targets for the actions of mood stabilizers*. *Neuropsychopharmacology*, 2009. **34**(6): p. 1395-405.
678. Launay, J.M., et al., *Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16*. *Transl Psychiatry*, 2011. **1**: p. e56.
679. Wang, F., et al., *Prenatal and neonatal exposure to perfluorooctane sulfonic acid results in changes in miRNA expression profiles and synapse associated proteins in developing rat brains*. *Environ Sci Technol*, 2012. **46**(12): p. 6822-9.
680. Bocchio-Chiavetto, L., et al., *Blood microRNA changes in depressed patients during antidepressant treatment*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2013. **23**(7): p. 602-11.
681. Wu, J., et al., *Alteration of serum miR-206 and miR-133b is associated with lung carcinogenesis induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. **267**(3): p. 238-46.
682. Ward, J., et al., *Plasma microRNA profiles distinguish lethal injury in acetaminophen toxicity: a research study*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(22): p. 2798-804.
683. Khan, S.Y., et al., *Distinctive microRNA expression signatures in proton-irradiated mice*. *Mol Cell Biochem*, 2013. **382**(1-2): p. 225-35.
684. Saikumar, J., et al., *Expression, circulation, and excretion profile of microRNA-21, -155, and -18a following acute kidney injury*. *Toxicol Sci*. **129**(2): p. 256-67.
685. Bollati, V., et al., *Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes*. *Environ Health Perspect*, 2010. **118**(6): p. 763-8.
686. Wagner, A.E., et al., *Anti-inflammatory potential of allyl-isothiocyanate--role of Nrf2, NF-(kappa) B and microRNA-155*. *J Cell Mol Med*, 2012. **16**(4): p. 836-43.
687. Guida, M., et al., *Association between exposure to dioxin-like polychlorinated biphenyls and miR-191 expression in human peripheral blood mononuclear cells*. *Mutat Res*, 2013. **753**(1): p. 36-41.
688. Rossi, L., E. Bonmassar, and I. Faraoni, *Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro*. *Pharmacol Res*, 2007. **56**(3): p. 248-53.
689. Parasramka, M.A., et al., *Garcinol sensitizes human pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine in association with microRNA signatures*. *Mol Nutr Food Res*, 2013. **57**(2): p. 235-48.
690. Cao, Y., et al., *MicroRNA-dependent regulation of PTEN after arsenic trioxide treatment in bladder cancer cell line T24*. *Tumour Biol*, 2011. **32**(1): p. 179-88.
691. Marsit, C.J., K. Eddy, and K.T. Kelsey, *MicroRNA responses to cellular stress*. *Cancer Res*, 2006. **66**(22): p. 10843-8.
692. Mishima, T., et al., *RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS*. *Brain Res*, 2007. **1131**(1): p. 37-43.
693. Chang, J., et al., *miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1*. *RNA Biol*, 2004. **1**(2): p. 106-13.
694. Chen, X.M., *MicroRNA signatures in liver diseases*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(14): p. 1665-72.

695. Nimmo, R.A. and F.J. Slack, *An elegant miRror: microRNAs in stem cells, developmental timing and cancer*. *Chromosoma*, 2009. **118**(4): p. 405-18.
696. Shi, Y. and Y. Jin, *MicroRNA in cell differentiation and development*. *Sci China C Life Sci*, 2009. **52**(3): p. 205-11.
697. Hebert, S.S. and B. De Strooper, *Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease*. *Trends Neurosci*, 2009. **32**(4): p. 199-206.
698. Xiao, C. and K. Rajewsky, *MicroRNA control in the immune system: basic principles*. *Cell*, 2009. **136**(1): p. 26-36.
699. Sun, B.K. and H. Tsao, *Small RNAs in development and disease*. *J Am Acad Dermatol*, 2008. **59**(5): p. 725-37; quiz 738-40.
700. Cortez, M.A. and G.A. Calin, *MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases*. *Expert Opin Biol Ther*, 2009. **9**(6): p. 703-711.
701. Hanke, M., et al., *A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer*. *Urol Oncol*, 2010. **28**(6): p. 655-61.
702. Zubakov, D., et al., *MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation*. *Int J Legal Med*, 2010. **124**(3): p. 217-26.
703. Park, N.J., et al., *Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(17): p. 5473-7.
704. Davaliev, K., et al., *Human seminal plasma proteome study: a search for male infertility biomarkers*. *Balkan J Med Genet*, 2012. **15**(Suppl): p. 35-8.
705. Lian, J., et al., *Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: p. 13.
706. Wang, C., et al., *Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility*. *Clin Chem*, 2011. **57**(12): p. 1722-31.
707. Wu, W., et al., *Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status*. *Mol Hum Reprod*, 2012. **18**(10): p. 489-97.
708. Liu, T., et al., *Microarray analysis of microRNA expression patterns in the semen of infertile men with semen abnormalities*. *Mol Med Rep*, 2012. **6**(3): p. 535-42.
709. Krawetz, S.A., et al., *A survey of small RNAs in human sperm*. *Hum Reprod*, 2011. **26**(12): p. 3401-12.
710. Dieckmann, K.P., et al., *MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours*. *Br J Cancer*, 2012. **107**(10): p. 1754-60.
711. Belge, G., et al., *Serum levels of microRNAs miR-371-3: a novel class of serum biomarkers for testicular germ cell tumors?* *Eur Urol*, 2012. **61**(5): p. 1068-9.
712. Rippe, V., et al., *The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas*. *PLoS One*, 2010. **5**(3): p. e9485.
713. Ebert, M.S., J.R. Neilson, and P.A. Sharp, *MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells*. *Nat Methods*, 2007. **4**(9): p. 721-6.
714. Lanford, R.E., et al., *Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection*. *Science*, 2010. **327**(5962): p. 198-201.
715. Anway, M.D., et al., *Transgenerational effect of the endocrine disruptor vinclozolin on male spermatogenesis*. *J Androl*, 2006. **27**(6): p. 868-79.
716. Barker, P., *Mental health. Rules of engagement*. *Nurs Times*, 1989. **85**(51): p. 58-60.
717. Marty, M.S., et al., *Development and maturation of the male reproductive system*. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2003. **68**(2): p. 125-36.
718. Putz, O., et al., *Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: II. Effects on male puberty and the reproductive tract*. *Biol Reprod*, 2001. **65**(5): p. 1506-17.
719. Walczak-Jedrejowska, R., et al., *During seminiferous tubule maturation testosterone and synergistic action of FSH with estradiol support germ cell survival while estradiol alone has pro-apoptotic effect*. *Folia Histochem Cytobiol*, 2007. **45 Suppl 1**: p. S59-64.
720. Atanassova, N., et al., *Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood*. *Endocrinology*, 1999. **140**(11): p. 5364-73.
721. Delbes, G., C. Levacher, and R. Habert, *Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development*. *Reproduction*, 2006. **132**(4): p. 527-38.

722. Kula, K., et al., *Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **178**(1-2): p. 89-97.
723. Delbes, G., et al., *Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life*. Endocrinology, 2004. **145**(7): p. 3395-403.
724. Vecchione, A. and C.M. Croce, *Apoptomirs: small molecules have gained the license to kill*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(1): p. F37-50.
725. Takada, S., et al., *Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos*. RNA, 2009. **15**(8): p. 1507-14.
726. Garzon, R., et al., *MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia*. Blood, 2009. **114**(26): p. 5331-41.
727. Fabbri, M., et al., *MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15805-10.
728. Li, S., et al., *Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus*. Cancer Res, 1997. **57**(19): p. 4356-9.
729. Anway, M.D. and M.K. Skinner, *Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the prostate transcriptome and adult onset disease*. Prostate, 2008. **68**(5): p. 517-29.
730. La Salle, S., et al., *Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells*. Dev Biol, 2004. **268**(2): p. 403-15.
731. La Salle, S. and J.M. Trasler, *Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse*. Dev Biol, 2006. **296**(1): p. 71-82.
732. Bourc'his, D., et al., *Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints*. Science, 2001. **294**(5551): p. 2536-9.
733. Yaman, R. and V. Grandjean, *Timing of entry of meiosis depends on a mark generated by DNA methyltransferase 3a in testis*. Mol Reprod Dev, 2006. **73**(3): p. 390-7.
734. Kaneda, M., et al., *Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting*. Nature, 2004. **429**(6994): p. 900-3.
735. Doerksen, T., G. Benoit, and J.M. Trasler, *Deoxyribonucleic acid hypomethylation of male germ cells by mitotic and meiotic exposure to 5-azacytidine is associated with altered testicular histology*. Endocrinology, 2000. **141**(9): p. 3235-44.
736. Kelly, T.L., E. Li, and J.M. Trasler, *5-aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome*. J Androl, 2003. **24**(6): p. 822-30.
737. Takashima, S., et al., *Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects*. Biol Reprod, 2009. **81**(1): p. 155-64.
738. Kazazian, H.H., Jr. and J.L. Goodier, *LINE drive: retrotransposition and genome instability*. Cell, 2002. **110**(3): p. 277-80.
739. Soper, S.F., et al., *Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis*. Dev Cell, 2008. **15**(2): p. 285-97.
740. Vagin, V.V., et al., *Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members*. Genes Dev, 2009. **23**(15): p. 1749-62.
741. Mori, C., et al., *Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice*. Dev Dyn, 1997. **208**(1): p. 125-36.
742. Alastalo, T.P., et al., *Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 17): p. 3557-70.
743. Sarge, K.D., S.P. Murphy, and R.I. Morimoto, *Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(3): p. 1392-407.
744. Hanson, M.A. and P.D. Gluckman, *Developmental origins of health and disease: new insights*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008. **102**(2): p. 90-3.
745. Bernal, A.J. and R.L. Jirtle, *Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010. **88**(10): p. 938-44.
746. Barker, D.J., *In utero programming of cardiovascular disease*. Theriogenology, 2000. **53**(2): p. 555-74.
747. Szyf, M., *How do environments talk to genes?* Nat Neurosci, 2013. **16**(1): p. 2-4.
748. Mathers, J.C. and J.A. McKay, *Epigenetics - potential contribution to fetal programming*. Adv Exp Med Biol, 2009. **646**: p. 119-23.



749. Wadhwa, P.D., et al., *Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms*. *Semin Reprod Med*, 2009. **27**(5): p. 358-68.
750. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. *Cell Res*, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
751. Hanson, E.K., H. Lubenow, and J. Ballantyne, *Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs*. *Anal Biochem*, 2009. **387**(2): p. 303-14.
752. Guzick, D.S., et al., *Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(19): p. 1388-93.
753. Abu-Halima, M., et al., *Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments*. *Fertil Steril*, 2013. **99**(5): p. 1249-1255 e16.

## ***VII. Annexes***

# *Annexes*

- **Article n°1 :**

Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of ABC transporter expression in testis. Koraïchi F, Inoubli L, **Lakhdari N**, Meunier L, Vega A, Mauduit C, Benahmed M, Prouillac C, Lecoœur S. *Toxicology*. 2013; S0300-483X(13)00123-6.



## Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of ABC transporter expression in testis

Farah Koraïchi<sup>a,c</sup>, Lilia Inoubli<sup>b</sup>, Nadjem Lakhdari<sup>b</sup>, Léo Meunier<sup>b</sup>, Aurélie Vega<sup>b</sup>, Claire Mauduit<sup>b</sup>, Mohamed Benahmed<sup>b</sup>, Caroline Prouillac<sup>c</sup>, Sylvaine Lecoeur<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CarMeN, INRA 1235/INSERM 1060/UCBL1/INSA Lyon/HCL, Faculté de Médecine, LYON SUD-BP 12, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69921 Oullins Cedex, France

<sup>b</sup> U895 INSERM-Université de Nice-Sophia Antipolis, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, 151 route de Ginestière, 06204 Nice, France

<sup>c</sup> RS2GP Rongeurs Sauvages, Risques Sanitaires et Gestion des Populations USC 1233 INRA UPSP, VetagroSup, F-69280 Marcy L'étoile, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 March 2013

Received in revised form 6 May 2013

Accepted 8 May 2013

Available online 22 May 2013

#### Keywords:

ABC transporters  
 Estrogen xenobiotics  
 Neonatal exposure  
 Rat  
 Sertoli  
 Testis

### ABSTRACT

Mycotoxin zearalenone (ZEN) is a cereal contaminant produced by various species of *Fusarium* fungi. When interacting with estrogen receptors, ZEN leads to animal fertility disturbances and other reproductive pathologies. Few data are available on the effects of perinatal exposure to ZEN, particularly in the blood–testis barrier. The aim of this study was to assess the impact of ZEN in adult rats exposed neonatally. We focused on the expression and cellular localization of major ABC transporters expressed in adult rat testis, comparing ZEN effects with those of Estradiol Benzoate (EB) neonatal exposure. Dose-dependent and long term modulations of mRNA and protein levels of Abcb1, Abcc1, Abcg2, Abcc4 and Abcc5 were observed, along with Abcc4 protein cellular delocalization. ZEN exposure of SerW3 Sertoli cells showed modulation of Abcb1, Abcc4 and Abcc5. Comparison with EB exposure showed similar modulation profiles for Abcg2 but differential modulations for Abcb1, Abcc1, Abcc4 and Abcc5 *in vivo*, and a similar profile for Abcb1 modulation by ZEN and EB, but differential modulation for Abcc4 and Abcc5 *in vitro*. ZEN and EB effects were inhibited by *in vitro* addition of the pure anti-estrogen ICI 182,780, suggesting the at least partial implication of ZEN estrogenic activity in these modulations. These results suggested that ZEN neonatal exposure could affect the exposure of testis to ABC transporter substrates, and negatively influence spermatogenesis and male fertility.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Estrogen receptors (ESRs/Esrs) are widely distributed in testicular cells from fetal life through to adulthood, and physiological estrogens play an important role in spermatogenesis, steroidogenesis and in the regulation of the rodent and human male reproductive function (Carreau et al., 2012). Exposure to endocrine disrupting chemicals and in particular to xenoestrogens, leads to an increasing incidence of male reproductive system disorders, *i.e.* gonadal dysgenesis, genital malformations, cryptorchidism, decreased fertility potential and testicular neoplastic changes (reviewed in Delbes

et al., 2006). Zearalenone (ZEN), a nonsteroidal estrogenic mycotoxin, is produced by various *Fusarium* fungi species and commonly contaminates cereal crops worldwide (Bennett and Klich, 2003). Animals and humans are exposed to ZEN *via* the consumption of cereals and by-products. ZEN is a full agonist of estrogen receptor  $\alpha$  (ESR1) and a partial agonist of estrogen receptor  $\beta$  (ESR2). Several *in vivo* studies report its toxicological effect on the reproductive systems of farm and laboratory animals (Zinedine et al., 2007). In the male reproductive system, ZEN is responsible for reduced numbers of germ and Sertoli cells (Jee et al., 2010; Kim et al., 2003), the alteration of testis morphological parameters (Filipiak et al., 2009; Perez-Martinez et al., 1997), abnormal testicular differentiation and disturbed fertility (Perez-Martinez et al., 1996).

The blood–testis barrier (BTB) consists of Sertoli cells closely linked by specialized junctions. Sertoli cells and spermatogenic cells are in close contact, which is primordial for the survival, proliferation and differentiation of the germ cell line (Cheng and Mruk, 2012). The BTB protects developing germ cells against harmful toxicants (*e.g.*, drugs, chemicals, environmental toxicants), but permits the entrance of vital nutrients (*e.g.*, amino acids, nucleosides) (Lui et al., 2003), allowing the outcome of a normal spermatogenesis cycle and maintaining fertility (reviewed in Cheng and Mruk, 2012).

**Abbreviations:** ABC, ATP Binding Cassette; ABCB1/Abcb1a-b, ATP Binding Cassette, subfamily B, member 1A-B; ABCC1-5/Abcc1-5, ATP Binding Cassette, subfamily C, member 1–5; ABCG2/Abcg2, ATP Binding Cassette, subfamily G, member 2; Actb, Actin, beta; BTB, blood testis barrier; DAPI, 4',6'-diaminido-2-phenylindole; E2, 17 $\beta$  estradiol; EB, Estradiol Benzoate; ESRs/Esrs, estrogen receptors; ESR1/Esr1, estrogen receptor  $\alpha$ ; ESR2/Esr2, estrogen receptor  $\beta$ ; Gapdh, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GD, gestational day; PND, post natal day; ZEN, zearalenone.

\* Corresponding author. Tel.: +33 6 76 83 35 55; fax: +33 4 26 23 59 16.  
 E-mail address: [sylvaine.lecoeur@lyon.inra.fr](mailto:sylvaine.lecoeur@lyon.inra.fr) (S. Lecoeur).

0300-483X/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.05.002>

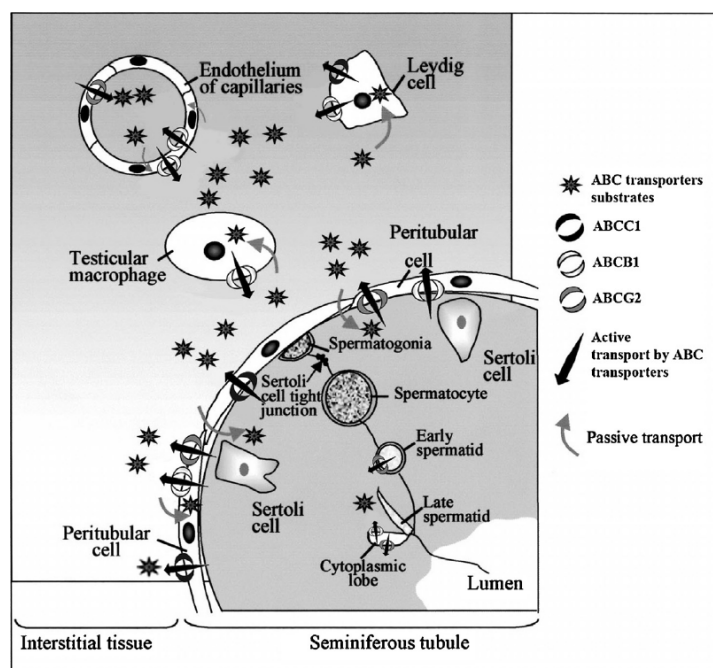


Fig. 1. Localization of Abcb1, Abcg2 and Abcc1 in testis according to Melaine et al. (2002) with modifications.

Several transporters are involved in the transport of molecules across the BTB (Bart et al., 2004). Among them members of ATP Binding Cassette efflux transporters are part of the BTB and play an important role in protecting germ cells from harmful xenobiotic substrates (e.g., drugs, phytoestrogens, pollutants) and maintaining the barrier functional. ABCB1/Abcb1 is expressed in Sertoli and Leydig cells, macrophages, peritubular myoid cells and colocalizes with tight junctions (Melaine, 2002; Su et al., 2009). ABCG2/Abcg2 is found in peritubular myoid and endothelial cells (Bart et al., 2004) and in elongated spermatids (Scharenberg et al., 2009), where it has secretory functions (Fetsch et al., 2006). Much attention has been given to ABCC1/Abcc1, the ABCC transporter in Sertoli cells, where it is highly expressed (Cheng and Mruk, 2012). It is also found in Leydig and peritubular myoid cells (Bart et al., 2004) (Fig. 1). The exact localization of ABCC4/Abcc4 and ABCC5/Abcc5 has not been elucidated, but their role has been highlighted in the mitosis and meiosis of germ cells through the transport of nucleotides essential for these development processes (Wijnholds et al., 2000). Thus the first objective of this work was to determine the localization of ABCC4 and ABCC5 transporters in rat testicular slices by immuno-histochemistry.

Several studies reported the estrogeno-regulation of ABC transporters (Cao et al., 2002; Evseenko et al., 2007), and we have previously shown that ZEN was able to modulate their expression in various tissues of pregnant rats and in fetus (Koraiichi et al., 2012). Given that neonatal exposure may also be crucial for the development of adverse effects of endocrine disruptors (Williams et al., 2001), we aimed at evaluating the effects of neonatal exposure to three doses of ZEN on the expression of major ABC transporters in adult rat testis. A difference in localization could have crucial consequences on substrate transport and germ cell development, so we also assessed the impact of ZEN on cellular localization. In addition, we compared this impact to that of a pure estrogen, Estradiol Benzoate (EB) to explore the implication of the estrogenic activity of ZEN. Moreover, since Sertoli cells play a crucial role in protecting

germ cells, we evaluated the effects of ZEN and EB on the expression of ABC efflux pumps in an immature rat Sertoli cell line with and without a pure anti-estrogen.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

ZEN was purchased from COGER (Morillons, France). DMSO, Epidermal Growth Factor, Estradiol Benzoate (EB), Insulin-transferrin-sodium selenite media supplement, ICI 182.780 and Testosterone came from Sigma–Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). The Sodium Pyruvate came from Gibco BRL (Cergy Pontoise, France). The Rneasy<sup>®</sup> Mini kit, RNA Cell Protect<sup>®</sup> Reagent and the QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR kit were provided by Qiagen (Courtabouef, France). The Quant-it<sup>™</sup> RiboGreen<sup>®</sup> RNA Reagent and kit were obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

### 2.2. Animals

Pregnant Sprague Dawley rats at gestational day (GD)15 (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were individually housed in temperature-controlled rooms with 12-h light, 12-h dark cycles and given free access to water and feed. At birth, each pup was sexed, weighed, and identified. Male pups ( $\approx 20$  g body weight) were administered vehicle (corn oil; MP Biomedicals, Illkirch, France) or ZEN or EB by daily sc injections from post-natal day (PND) 1 to PND5 at doses of 0, 1, 50 or 100 and 0, 0.75, 1.25 or 2.5  $\mu\text{g}/\text{day}$ , respectively. From PND6, the rats were left without treatment and killed at PND90 by CO<sub>2</sub> inhalation. One of the testes was snap frozen for quantitative molecular analyses, whereas the other was fixed for immunohistochemical studies. Eight different animals from four different litters were used for each treatment group. This study was conducted in accordance with current regulations and standards approved by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale – Animal Care Committee* (protocol no. 2008-43).

### 2.3. Cell culture and treatments

The SerW3 Sertoli cell line (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Germany) from 17-day-old male Wistar rats, was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) containing 10% fetal calf serum (FCS, Gibco BRL) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin), at 35 °C as described previously (Pognan et al., 1997). To examine the effects of ZEN and EB, SerW3 Sertoli cells were cultured for 72 h in the presence of FCS. The cells were washed twice with serum free DMEM and incubated for 12 h in serum free Dulbecco's medium (SFDM) composed of



**Table 1**  
Sequences and concentrations of oligonucleotide primers and amplicon length.

Gene (GenBank accession number)	Primer sequence (5'–3')	Primer concentrations (nM)	Amplicon length (bp)
<i>Gapdh</i> (NM017008)	NP (Rn.Gapd.1.SGQuantiTect Primer Assay*)	FP500 RP500	149
<i>Actb</i> (NM031144)	NP (Rn.Actb.1.SGQuantiTect Primer Assay*)	FP500 RP500	145
<i>Abcb1a</i> (NM133401)	NP (Rn.Abcb1.2.SGQuantiTect Primer Assay*)	FP500 RP500	112
<i>Abcb1b</i> (NM012623)	FP ATGAAACTGCCCAACAATT RP CTTTCTGTGTCAGGCTGA	FP500 RP500	155
<i>Abcg2</i> (NM181381)	NP (Rn.Abcg2.1.SGQuantiTect Primer Assay*)	FP500 RP500	87
<i>Abcc1</i> (NM022281) <sup>a</sup>	FP CGAATGCTCTGAGATGGAGAC RP CTCTACACGGCTGAATGGG	FP400 RP400	138
<i>Abcc4</i> (NM133411.1)	FP TGCACACAGCTTACGGCTAC RP GAGAGCCTCCGGTAAATCA	FP250 RP250	146
<i>Abcc5</i> (NM053924.1)	FP CCGAGTTGAGGGTCTTTTC RP CTGGTCTTGGTGGTGT	FP250 RP250	133

NP, not provided by the manufacturer; \*, Qiagen product designation; FP, forward primer; RP, reverse primer.

<sup>a</sup> St-Pierre et al. (2004).

DMEM-antibiotics supplemented with Epidermal Growth Factor (10 ng/ml), insulin and transferrin (10 µg/ml), selenium (10 ng/ml), and testosterone (100 nM). ZEN and EB were diluted in DMSO stock solution and added in fresh SFDM medium. The cells were then exposed to three concentrations of either ZEN (0, 0.1, 5, and 10 nM) or EB (0, 0.05, 0.1 and 0.2 nM) for 48 h. The cells were immediately collected in RNA Cell Protect Reagent for mRNA quantification experiments and lysed for protein expression analyses by western blotting. For ZEN, the doses were 10<sup>3</sup>–10<sup>5</sup> times lower than the EC50 determined in preliminary experiments while no cytotoxicity was reached for EB in the range of doses tested (0–100 µM) (data not shown). Pure anti-estrogen ICI 182,780 was used to determine the implication of ZEN estrogenic activity in the modulation of ABC transporter mRNA expression. Cells were pre-exposed for 1 h to ICI 182,780 (0.1 and 10 µM), and then exposed to a mix of ZEN (10 nM) and ICI (0.1 and 10 µM) or a mix of EB (0.2 nM) and ICI (0.1 and 10 µM) according to the same protocol described above. The highest doses of ZEN and EB (10 nM and 0.2 nM, respectively) were used in this test, because they corresponded to the doses where the mRNAs expressions of all the ABC transporters were significantly modulated.

#### 2.4. Immunohistochemical localization of ABC transporters in PND90 rat testis

Testis were immediately fixed for 48 h in Bouin's fluid, dehydrated stepwise in graded ethanol baths and embedded in paraffin. Testis fixed in Bouin's fluid were then cut into 5 µm thick slices.

An unmasking treatment with citrate buffer was performed to localize the ABC transporters in the adult rat testis; the sections were incubated for 10 min in PBS 0.1% Triton X-100 at room temperature, then in PBS-5% FCS-1% protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO) for 30 min. The sections were incubated 1 h at room temperature and subsequently overnight at 4 °C with primary antibodies anti Abcc4 (SAB2500011; Sigma, St. Louis, MO) and anti Abcc5 (sc 5780; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) diluted at 1:50. The sections were then washed three times in PBS 0.1% Triton X-100 and incubated for 1 h at room temperature with fluorescein isothiocyanate (FITC), rabbit anti-goat (Dako, Glostrup, Denmark) diluted at 1:50. Afterwards, the sections were washed in 1 × PBS and counterstained with mounting medium containing 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

#### 2.5. Total RNA isolation, integrity and quantification

Testis and SerW3 total cell RNA were isolated and purified with the Rneasy<sup>®</sup> Mini Kit according to the supplier's instructions. All extractions were performed with a DNA elimination step. RNA integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis. Total RNA was quantified with the Quant-it<sup>™</sup> RiboGreen<sup>®</sup> RNA Reagent and kit according to the manufacturer's protocol.

#### 2.6. Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR was performed in an Mx3000 cyclor (Stratagene, Amsterdam, the Netherlands), using the SybrGreen dye (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) and the Two Step<sup>®</sup> protocol of the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 µg of total RNA was converted to cDNA by reverse transcription with the QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription Kit. Diluted cDNAs were then amplified in a total volume of 20 µl using the QuantiTect SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit. mRNA levels of each test gene were normalized to two reference genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), and Actin, beta (*Actb*). PCR cycling conditions were optimized and PCR slopes and efficiencies were calculated for each gene to allow efficiency-corrected quantitation (Pfaffl, 2001). Specific primers for *Gapdh*, *Actb*, *Abcb1a* and *Abcg2* were provided by Qiagen (confidential sequences). Published primer sequences were used for *Abcc1* (St-Pierre et al., 2004),

*Abcb1b*, *Abcc4* and *Abcc5* forward and reverse primers were designed with Primer3 (v. 0.4.0)<sup>®</sup> software (Table 1). Sequences were chosen to span exon–exon boundaries in order to avoid amplification from possible DNA contamination. Reactions were carried out in duplicate. Primer sequences, concentrations and product sizes are indicated in Table 1. The cycling parameters were as follows: PCR activation for 10 min at 95 °C; denaturing for 15 s at 95 °C; annealing for 60 s at 60 °C (55 °C for *Gapdh*, *Actin β*, *Abcb1b* and *Abcg2*) for 40 cycles, and extending for 30 s at 72 °C.

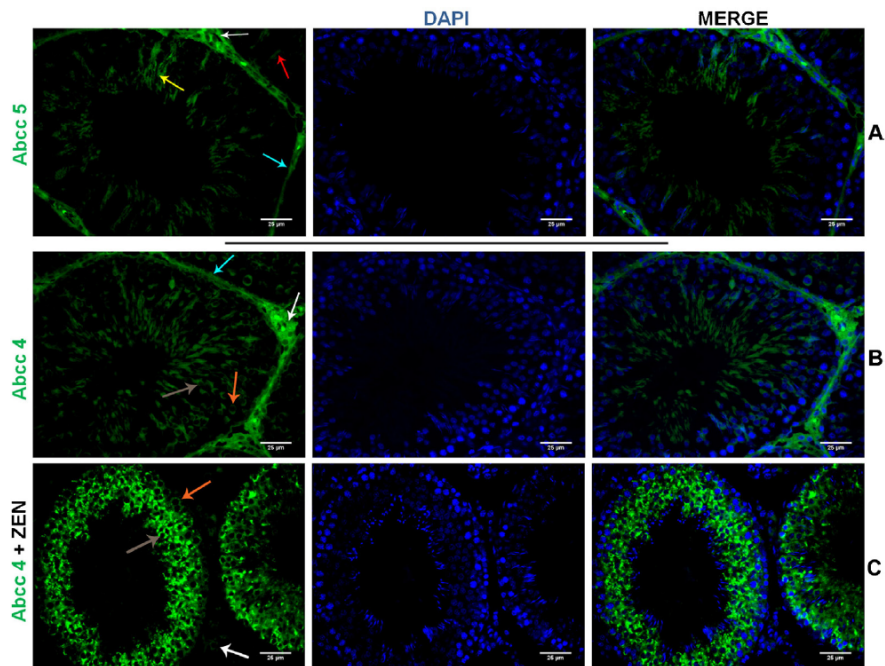
Primer pair specificity was tested at the end of every run by melting curve analysis, and amplification specificity was confirmed by electrophoresis in a 2% agarose gel. After GelRed<sup>™</sup> (Biotium, Hayward, USA) staining, visualization under Ultra Violet light showed a single band with the expected size for each gene.

#### 2.7. Western blot analysis

Frozen testicular tissue was ground in liquid nitrogen to obtain tissue powders. Aliquots of powder and SerW3 cells were lysed and homogenized in ice cold SLB buffer (Tris 20 mM, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glycerol 1 mM, Nonidet 1%, pH 8), supplemented with protease inhibitor cocktail, complete Ultra Tablets, Mini, EASY PACK (1 tablet/10 ml) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Extracts were incubated for 30 min on ice, then centrifuged at 12,000 × g for 30 min at 4 °C. Supernatants were removed and protein concentrations were determined by the colorimetric method using bicinchoninic acid (Smith et al., 1985). Lysates were diluted in lysis buffer, and then loading buffer was added and heated at 70 °C for 10 min. 15–20 µg of each sample was resolved on 8% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane in transfer buffer (Tris–glycine 1X, pH 8.5 containing 20% methanol). The transfer was performed at a constant voltage of 100 V for 1 h for low molecular weight proteins and 2 h for high molecular weight ones. Membranes were blocked in TBS 0.05% Tween supplemented with 5% nonfat milk on a rocker at room temperature for 2 h. Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4 °C raised against Abcb1 (Calbiochem C219, 517310/1:100, Darmstadt, Germany), Abcc1 (Santa Cruz sc-13960/1:500, Santa Cruz, CA, USA), Abcc4 (Abcam, ab77184/1:200, Cambridge, UK), Abcc5 (Santa Cruz sc-sc-5781/1:200, CA, USA), Abcg2 (Santa Cruz sc-25822/1:1000) and *Actb* (Sigma–Aldrich A5060/1:10000, Lyon, France). Then, membranes were incubated with secondary horse-radish peroxidase labeled antibodies: rabbit polyclonal anti mouse (Abcam ab97046/1:5000), goat anti rabbit (Santa Cruz sc-2004/1:5000) and rabbit polyclonal anti goat (Abcam ab6741/1:5000). The bands were detected using a chemiluminescence Pierce<sup>®</sup> ECL Western Blotting Substrate kit (Thermo Scientific, Saint Herblain, France) and visualized by the Molecular Imager<sup>®</sup> ChemiDac<sup>™</sup> XRS+ imaging system (Bio-RAD), and quantitation was carried out with Image Lab<sup>™</sup> software (Bio-RAD, Marnes-la-Coquette, France). Protein expression was normalized to *Actb*.

#### 2.8. Data analysis

Comparisons of protein expression were performed with the Student's *t*-test. A *p* value of 0.05 was taken to be significant. The MxPro<sup>™</sup> q PCR Software, version 4.10, was used to analyze the mRNA expression data. The relative expression ratios of the target genes were calculated based on the efficiencies and quantification cycle (C<sub>q</sub>) deviations of unknown samples versus controls, and expressed in comparison to reference genes. These calculations were performed with the relative gene expression software tool REST-MCS β version 2 (Pfaffl et al., 2002). Differences in mRNA expression between controls and exposed samples were tested for statistical significance by the Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test (REST-MCS β version 2 Software) (Pfaffl et al., 2002). A *p* value of 0.05 was taken to be significant.



**Fig. 2.** Immunohistochemical localization of Abcc4 and Abcc5 in PND 90 rat testis and the effect of the 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  dose of ZEN on Abcc4 cellular localization. Localization of Abcc5 (A), Abcc4 (B) and the effect of ZEN on Abcc4 localization (C) in adult rat testis was performed as described in Section 2 with FITC antibodies counterstained with DAPI to reveal nuclei. ABC transporters are expressed both in the interstitial compartment: Leydig cells (white arrows), peritubular myoid cells (blue arrows), endothelia of blood vessels (red arrow), and in seminiferous tubules: Sertoli cells (yellow arrow), spermatocytes (orange arrows) and round spermatids (gray arrows). Scale bar = 25  $\mu\text{m}$ . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

### 3. Results

#### 3.1. Immunohistochemical localization of Abcc4 and Abcc5 in PND 90 rat testis and the effect of a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ dose of ZEN on Abcc4 cellular localization (Fig. 2)

Localization of ABC transporters was performed in adult rat testis by immunofluorescent microscopy assay. As shown in Fig. 2A, Abcc5 was widely expressed in rat testes and was localized in Sertoli, Leydig, peritubular myoid cells and endothelia of blood vessels. No difference of transporter localization was observed in the testis of adults neonatally exposed to ZEN for Abcc5, Abcb1, Abcc1 and Abcg2 (data not shown).

The highest dose of ZEN (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) caused a delocalization of the Abcc4 protein in the testis of adult rat neonatally treated with ZEN. Without ZEN exposure, Abcc4 was essentially localized in Leydig and peritubular myoid cells and was also found in the site of spermatocytes and spermatids (Fig. 2B). After ZEN treatment, Abcc4 was almost exclusively localized in post meiotic cells: spermatocytes and round spermatids (Fig. 2C).

#### 3.2. Effects of ZEN and EB on the mRNA and protein expression of ABC transporters in PND 90 rat testis (Fig. 3)

The three doses of ZEN strongly inhibited mRNA expression of both *Abcb1a* and *Abcb1b* (2.0, 4.2, 2.5 and 9, 10, 6.7-fold decrease, respectively) while only the highest dose of EB significantly down-modulated the mRNA of *Abcb1a* (1.8 fold decrease) (Fig. 3A). Modulation of protein expression did not follow that of mRNA. The low and medium doses of ZEN induced Abcb1 protein

expression (1.6, 1.5-fold induction) while the highest dose significantly inhibited it (1.7-fold inhibition). Different effects were noted for EB: the medium and high doses strongly inhibited Abcb1 protein expression (3.1 and 3.7-fold decrease, respectively). This effect was correlated to mRNA modulation only for the highest dose.

*Abcc1* mRNA and protein were inhibited 2, 2.1 and 1.6 and 1.8, 1.5 and 1.2-fold by the three doses of ZEN, respectively, whereas only protein expression was inhibited by the medium and high dose of EB (2.6, 1.8-fold decrease, respectively) (Fig. 3B).

ZEN and EB significantly induced mRNA expression of *Abcc4* (at the three doses for ZEN: 1.8, 1.9 1.7-fold increase, and at the two highest ones for EB: 1.4 and 1.5-fold increase) (Fig. 3C). Contrary to mRNA expression, ZEN and EB down-modulated Abcc4 protein expression at all doses (1.8, 2.5, 1.2 and 1.2, 2.3, 2.3-fold decrease, respectively), although the inhibition at the lowest EB dose was not statistically significant.

ZEN slightly induced *Abcc5* mRNA expression at 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  (1.6 and 1.7-fold increase, respectively), while EB strongly induced it at all doses (3.1, 3.1 and 3.2-fold inductions) (Fig. 3D). For ZEN, the modulation of protein expression was contrary to that of mRNA for the low and medium doses (1.6 and 1.3-fold decrease, respectively) but no significant effect was noted at the highest dose. Contrary, to ZEN, EB up-modulated Abcc5 protein expression 1.7-fold but only at the highest dose.

Both ZEN and EB significantly down-modulated mRNA expression of *Abcg2* at all doses (1.4, 2.0 and 1.8-fold inhibition for ZEN and 1.2, 1.6 and 1.3-fold decrease for EB) (Fig. 3E). The two substances also inhibited Abcg2 protein expression at the three doses for ZEN (1.4, 1.8 and 1.3-fold decrease), and the medium and high doses for EB (1.3 and 1.6-fold decrease).



3.3. Effects of ZEN and EB on the mRNA and protein expression of ABC transporters in the SerW3 rat Sertoli cell line (Fig. 4)

ZEN and EB significantly induced mRNA expression of *Abcb1a* at medium and high doses for ZEN (1.9 and 1.5-fold increase) and at the highest dose for EB (1.7-fold increase) (Fig. 4A). For *Abcb1b*, only EB slightly inhibited

mRNA expression by 0.8-fold at the highest dose. Both ZEN and EB down modulated the protein expression of *Abcb1* at all doses with approximately the same magnitude (1.7, 1.7 and 2.0-fold decrease and 1.5, 1.8 and 2.0-fold decrease, respectively).

Neither ZEN nor EB modulated mRNA or protein expressions of *Abcc1* at any dose (Fig. 4B).

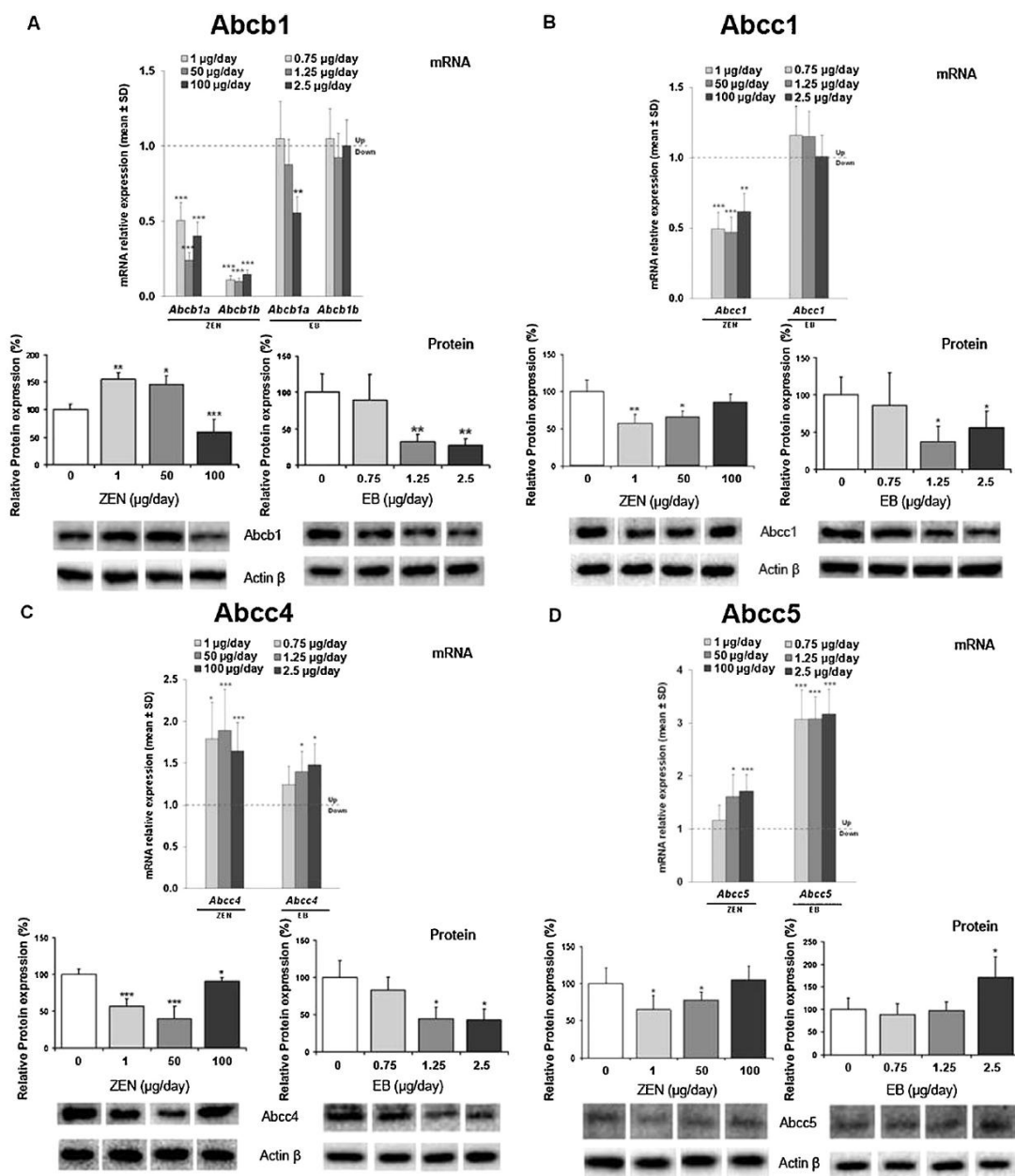


Fig. 3. ZEN and EB effect on mRNA and protein expression of ABC transporters in PND 90 rat testis. The mRNA expression of the target genes, determined by RT-qPCR, was normalized to the level of *Actb* and *Gapdh* and expressed relative to controls. Controls were set at 1 (dotted line). The protein expression of the target genes, determined by western blotting, was normalized to the level of *Actb*. Significantly different from the control group \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ . Data are means  $\pm$  S.D. ( $n = 8$ ). Control □, 1 µg/day □, 50 µg/day ■ and 100 µg/day ■ for ZEN and 0.75 µg/day □, 1.25 µg/day ■ and 2.5 µg/day ■ for EB. A, *Abcb1*; B, *Abcc1*; C, *Abcc4*; D, *Abcc5*; E, *Abcc2*.

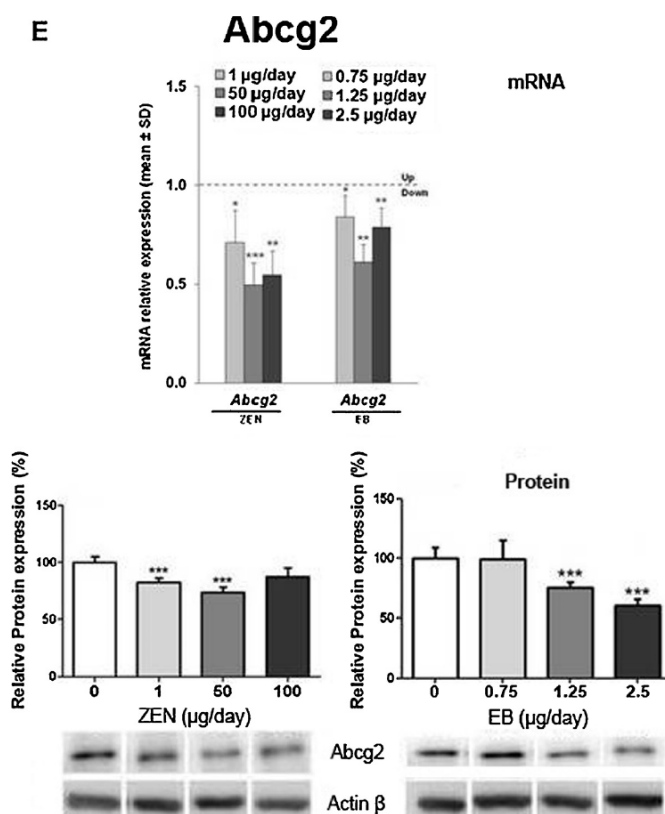


Fig. 3. (Continued).

ZEN induced both mRNA (1.4, 1.3 and 1.6-fold increase) and protein expressions (2.9, 2.1 and 1.8-fold induction) of *Abcc4* at the three doses, while EB only induced mRNA at the highest dose (1.4-fold increase) but induced protein expression at the two other doses (2.0 and 2.5-fold increase, respectively) (Fig. 4C).

All doses of ZEN and the medium and high doses of EB significantly induced the expression of *Abcc5* mRNA (2.0, 2.7 and 6-fold increase, and 1.8 and 2.6-fold increase, respectively) (Fig. 4D). Concordance between ZEN and EB effects and between mRNA and protein expression modulation only occurred for the doses of media (1.2 and 1.4-fold protein inductions). ZEN also modulated the mRNA and protein expression of *Abcc5* in the same way for the highest dose (1.5-fold protein induction) but inhibited its protein expression at the lowest dose (1.6-fold decrease) rather than inducing it. A completely inverse effect was noted for EB, where the lowest and highest doses induced the protein expression of *Abcc5* 1.6-fold and inhibited it 1.4-fold, respectively.

#### 3.4. Effect of the pure anti-estrogen ICI 182.780 on the mRNA modulation of expression of the highest doses of ZEN and EB in the SerW3 rat Sertoli cell line (Fig. 5)

10 nM ZEN and 0.2 nM EB effects on mRNA expression of *Abc1a-b*, *Abcc4* and *Abcc5* reproduced those observed in Fig. 3 with the following magnitudes: *Abcb1a* +1.4, *Abcc4* +1.8 and *Abcc5* +4.0 fold change for ZEN and *Abcb1a* +1.6, *Abcb1b* -1.7, *Abcc4* +1.8 and *Abcc5* +1.5 fold change for EB. Exposure of SerW3 cells to both doses of ICI 182.780 reversed both ZEN and EB mRNA modulations of expression of all the ABC genes tested.

#### 4. Discussion

Numerous studies have evaluated the *in utero* exposure effects of xenoestrogens on the male reproductive tract (Thuillier et al., 2003; Wilcox et al., 1995; Yasuda et al., 1985), while a growing number of publications demonstrate growing interest in the neonatal exposure effects of such molecules (Williams et al., 2001). Indeed, the latter window of exposure is particularly critical since it is now well known that BTB assembly begins and ends at the neonatal stage (Toyama et al., 2001). The BTB is one of the tightest blood–tissue barriers in the mammalian body and protects the germ cells to ensure the establishment of normal spermatogenesis. Environmental toxicants induce testicular injury *via* their initial actions at the BTB to elicit subsequent damage through germ cell loss, reduced sperm count, and male infertility or subfertility (Toyama et al., 2001). ABC Efflux pumps present at the BTB regulate the entry of such harmful molecules and thus actively participate in the protective role of the BTB.

We therefore aimed to assess the effect of the ZEN xenoestrogen on ABC transporter expression in adult rat testis after neonatal exposure. Endocrine disruptors inducing differential effects according to exposure dose, we evaluated the effect of three doses of ZEN: low (1 µg/day), medium (50 µg/day) and high (100 µg/day). The lowest dose was in the range of the No Observed Effect Level of 10 µg/kg b.w. determined in sow, considering that this species is more vulnerable to ZEN toxicity than rodents (Zinedine et al., 2007). As the *in vivo* effect of ZEN on ABC transporter expression was evaluated some time after exposure, and to confirm that ZEN was effectively responsible for the

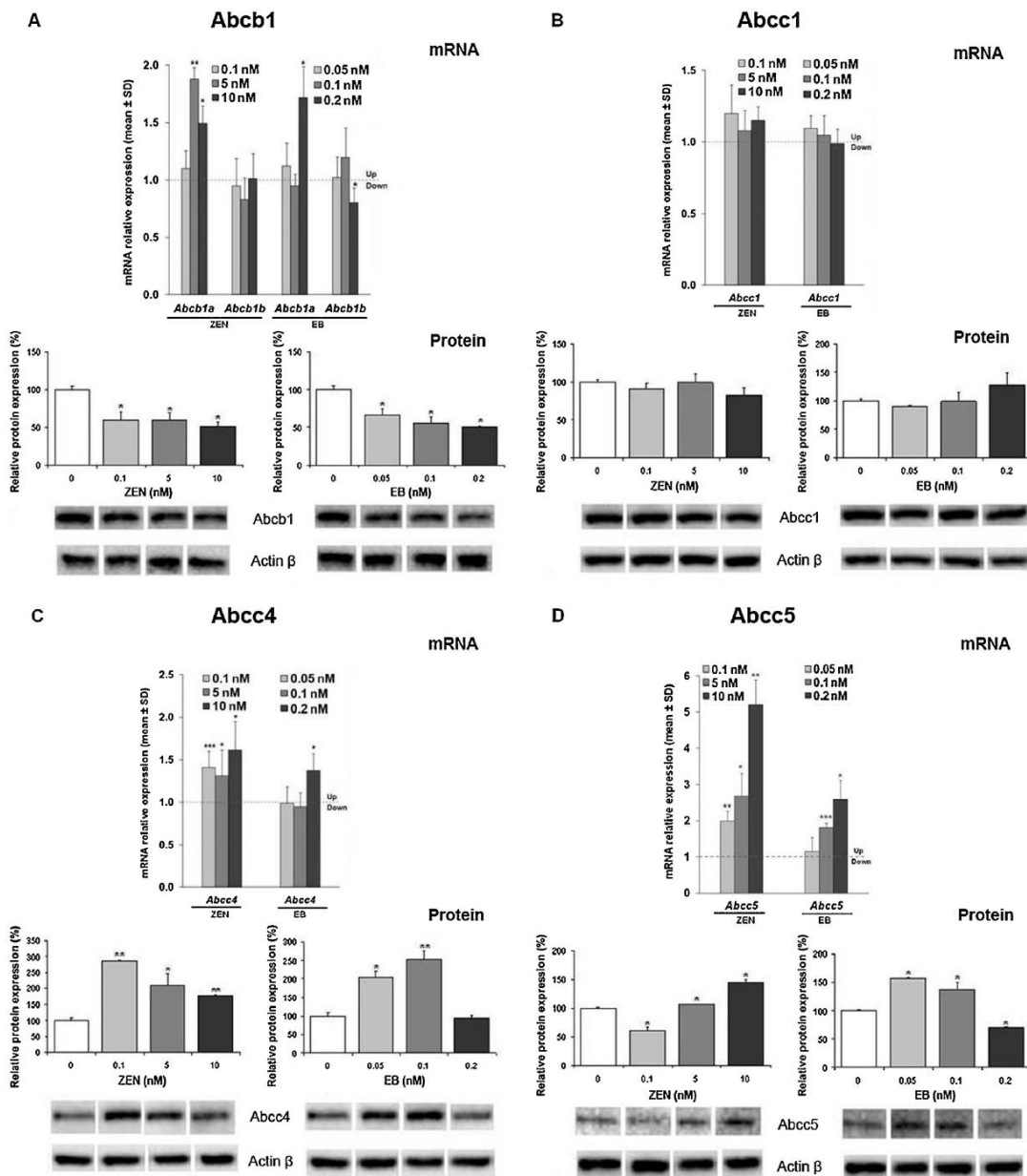
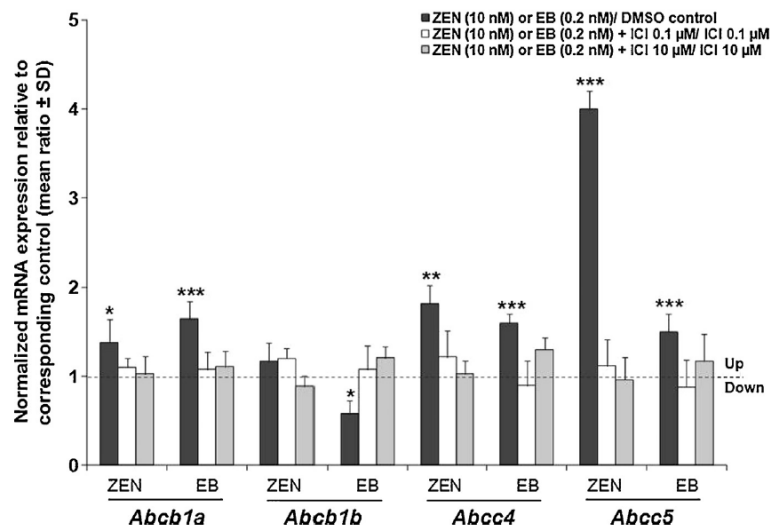


Fig. 4. The effect of ZEN and EB on mRNA and protein expression of ABC transporters in the SerW3 Sertoli rat cell line. The mRNA expression of the target genes, determined by RT-qPCR, was normalized to the level of *Actb* and *Gapdh* and expressed relative to controls. Controls were set at 1 (dotted line). The protein expression of the target genes, determined by western blotting, was normalized to the level of *Actb*. Significantly different from the control group \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ . Measurements were carried out in triplicate wells. Data are means of  $\pm$ S.D. from 3 independent experiments. Control  $\square$ , 0.1 nM  $\square$ , 5 nM  $\blacksquare$  and 10 nM  $\blacksquare$  for ZEN and 0.05 nM  $\square$ , 0.1 nM  $\blacksquare$  and 0.2 nM  $\blacksquare$  for EB. A, Abcb1; B, Abcc1; C, Abcc4; D, Abcc5.

modulations observed in adulthood, we also evaluated its effect *in vitro*. Sertoli cells play a number of roles in testis, ranging from mechanical support of the seminiferous tubules to functional regulation of spermatogenesis. They are the main component of the BTB and play a key role in its protective function. ABC efflux transporter expression in these cells contributes to their protective role by extruding their harmful substrates out of the testis. We chose

to evaluate ZEN effects in the SerW3 rat Sertoli cell line, which has approximately the same ABC transporter expression profile as Sertoli cells *in vivo* (Leslie et al., 2005). The non-transformed SerW3 cells represent a good model for early neonatal exposure experiments. Indeed, they are derived from 17-day-old male Wistar rats, which is the earliest age allowing the isolation and successful culture of Sertoli cells (Pognan et al., 1997).





**Fig. 5.** The effect of ICI 172186 on ZEN and EB mRNA modulation of ABC transporters in the SerW3 Sertoli rat cell line. The mRNA expression of the target genes, determined by RT-qPCR, was normalized to the level of *Actb* and *Gapdh* and expressed relative to the following controls: DMSO, ICI 0.1 μM and ICI 10 μM. Controls were set at 1 (dotted line). Significantly different from control group \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ . Measurements were carried out in triplicate wells. Data are means of  $\pm$ S.D. from 3 independent experiments.

Firstly, we localized these transporters in the testis of young adult rats. To our knowledge, the localization of *Abcc4* and *Abcc5* in rat testis has not been described up to now. We found that *Abcc5* had a wide cellular distribution and was found in Sertoli, Leydig, peritubular myoid cells, and in blood vessels. Without ZEN exposure, *Abcc4* was essentially localized in Leydig and peritubular myoid cells, and was also found in the site of spermatocytes and spermatids. The *Abcc4* presence in Leydig cells confirmed the role of this efflux pump in testosterone production (Morgan et al., 2012). After ZEN treatment, *Abcc4* was almost exclusively localized in post meiotic cells. Given the role of *Abcc4* in the nucleotides transport and the detoxification process, its delocalization may play a role in countering the gametogenesis process alteration and the germ cell apoptosis caused by ZEN exposure (Yuan et al., 2010). Indeed, Tagami et al. (2010) showed in the Human Retinal vascular Endothelial cells that *ABCC4* knockdown was responsible for apoptosis suppression, suggesting a relationship between the apoptosis phenomenon and *Abcc4* regulation of expression. Otherwise, the drastic decrease of *Abcc4* expression in the Leydig cells after ZEN treatment (Fig. 2C) could cause an impairment of gametogenesis and a reduction of testicular testosterone production as described by Morgan et al. (2012) in *Abcc4* null mice.

Secondly, we showed a dose-dependent and long term modulating effect of ZEN on the mRNA and protein expression of ABC transporters in adult rat testis. Acute ZEN exposure *in vitro* also resulted in the modulation of ABC transporter expression, confirming the implication of ZEN in the *in vivo* effects.

Since *Esr1* and *Esr2* are expressed in rat testis and in SerW3 cells (with a similar profile, data not shown) as described *in vivo* (Shughrue et al., 1998), we compared ZEN effects to those of the pure estrogen EB to evaluate the implication of estrogenic activity in transporter modulation. ZEN and EB had a similar modulation profile for *Abcg2* *in vivo* (no expression of *Abcg2* in SerW3 cells), but differentially modulated the expression of *Abcb1*, *Abcc4* and *Abcc5*, both *in vivo* and *in vitro*. For *Abcg2*, mRNA and protein modulations of expression were correlated for both molecules, suggesting a transcriptional mechanism. This result is in accordance with

previous works that have shown the transcriptional regulation of the *Abcg2* gene by estrogens. Indeed, the promoter region of the *ABCG2* gene was shown to contain functional estrogen response elements (Ee et al., 2004). Several studies have highlighted the estrogen-regulation of the *ABCG2* gene. Yasuda et al. (2006) demonstrated the induction of both mRNA and protein expression of the *ABCG2* gene in BeWo cells by E2, estrone and estriol. Zhang et al. (2006) reported the induction of *ABCG2* mRNA by E2 in ESR1 positive MCF-7 cells. In addition, a recent study demonstrated that the selective estrogen modulator toremifene down-regulates the expression of *ABCG2* (mRNA and protein) in the ESR1 positive MCF-7 cell line (Zhang et al., 2010).

ZEN and EB differentially modulated mRNA and protein expressions of *Abcb1*, *Abcc4* and *Abcc5*. This discordance might be related to the implication of epigenetic modifications through microRNAs (miRNAs). miRNAs are short, non coding RNAs that control the post-transcriptional expression of target genes. They interact with the 3'-untranslated region leading to translation inhibition and/or RNA cleavage. Recently, Borel et al. (2012) demonstrated experimentally the implication of several miRNAs in the regulation of *ABCC1*, *ABCC4* and *ABCC5* expression in liver. Another work showed that neonatal administration of EB to male rats modulated miR-29a and miR-29b expression in testis (Meunier et al., 2012). TargetScanHuman software predicted the latter to control *Abcb1a-b* expression. Thus, similarly to EB, ZEN could modulate the expression profile of miRNAs and be responsible for differences of mRNA and protein expression.

Additionally, differences between ABC expression modulations observed for *Abcb1*, *Abcc1*, *Abcc4*, *Abcc5* respectively induced by ZEN and EB could be explained by the range of doses used in this study. Competitive receptor-binding and yeast-based reporter gene assays showed that ZEN had low estrogenic potency when compared to estrogens (Takemura et al., 2007). In the present work, doses chosen for ZEN exposure were based on these studies and were thus higher than EB ones, but estrogens and endocrine disruptors can have U or inverted U shaped dose-response curves and this could explain different biological effects, depending on the exposure dose. This type of effect has been extensively described

for endogenous hormones and endocrine disruptors (for review, see Vandenberg et al., 2012).

Except Abcc1, mRNA modulations were comparable between ZEN and EB, suggesting an estrogenic effect. This was confirmed *in vitro* by fulvestrant (ER-mediated transcription inhibitor) which totally reversed these modulations, showing the implication of ZEN estrogenic properties at transcriptional level.

The effect of ZEN and EB on Abcc1 expression was absent *in vitro*, suggesting that the effect of ZEN on Abcc1 was probably not estrogenic. Indeed, data on the regulation of Abcc1 are scarce and no study has yet demonstrated its regulation by estrogens (Elali and Hermann, 2012). Dean (2009) related that Abcc1 expression is modulated by redox compounds. Indeed, oxidative stress was recently identified as factor regulating ABC transporter expression (at the blood–brain barrier, Patak and Hermann, 2011), and this has particularly been described for stress induced by hypoxia (Du Souich and Fradette, 2011). Jilani and Lang (2013) have demonstrated that exposure of human erythrocytes to ZEN triggered suicidal cell death, with exposure of phosphatidylserine at the erythrocyte surface, and binding to phosphatidylserine receptors on the surface of macrophages. This may induce inflammation and activation of the stress response because, as a rule, the phagocytic cells which engulf and degrade the affected red blood cells locally produce O<sub>2</sub><sup>-</sup>, which activates NF-κB and JNK, thereby leading to increased production of TNFα, IL-6, and other pro-inflammatory mediators known to activate the hormonal stress response (Zapulla, 2008). Eventually stimulation of red blood cells suicidal death leads to anemia, with consequent hypoxia and chronic activation of the stress response, unless the enhanced loss of erythrocytes is compensated by similarly enhanced formation of new erythrocytes (Lang and Qadri, 2012). In this context, we can hypothesize that the biochemical transformations elicited by ZEN may promote stress response and hypoxia and participate to ABC transport modulation in our model. Strikingly, erythrocytes are not only responsible for O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> transport, but also involved in ATP release through ABC transporters in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia (Bergfeld, 1992). Recent studies also put in evidence the role of hypoxia in secondary impairment of testicular function (Bomhard and Gelbke, 2013).

Consequences of such modulations on long term susceptibility to xenobiotic toxicity are difficult to estimate. For example, the induction of Abcb1 protein by ZEN at 1 μg/day could enhance its efflux of harmful xenobiotic substrates in Sertoli cells and hence protect the germline, whereas its inhibition at a dose of 100 μg/day could overexpose the germ cells to toxicants. The dose-dependent effect of ZEN complicates the evaluation of human risk since food intake of ZEN varies according to the type of food ingested and the level of *Fusarium* contamination.

## 5. Conclusion

Our results showed for the first time that neonatal exposure to ZEN was responsible for dose-dependent and long term modulations of mRNA and protein levels of major ABC efflux transporters, and of a cellular delocalization of Abcc4 in the adult rat testis. Comparison with EB showed similar profiles of modulation for some transporters and differential modulations for others both *in vivo* and *in vitro*. The results of the pure anti-estrogen ICI 182,780 test in SerW3 cells suggested that the estrogenic activity of ZEN is at least partially involved in the modulation of Abcb1, Abcc4, and Abcc5. Further investigations are needed to elucidate the exact mechanism by which ZEN acts on ABC transporter regulation, and evaluate the consequences of Abcc4 protein delocalization in the testis. However, modifications of ABC transporter expression and localization at the BTB in a critical window of development and maturation could disturb physiological development processes such as

spermatogenesis, and enhance the access of drugs, environmental molecules and other xenobiotic toxicants to the testis, thereby promoting the development of reproductive disorders, cancers and infertility.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

This study was funded by a grant from the ANR (ZENREPROTOX, Grant 415 178C). We are grateful to Mr Keith Hodson for editing the English.

## References

- Bart, J., Hollema, H., Groen, H.J., de Vries, E.G., Hendrikse, N.H., Sleijfer, D.T., Wegman, T.D., Vaalburg, W., van der Graaf, W.T., 2004. The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood–testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur. J. Cancer* 40, 2064–2070.
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497–516.
- Bergfeld, G.R., 1992. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc. Res.* 26, 40–47.
- Bomhard, E.M., Gelbke, H.P., 2013. Hypoxaemia affects male reproduction: a case-study of how to differentiate between primary and secondary hypoxic testicular toxicity due to chemical exposure. *Arch. Toxicol.* (February) [Epub ahead of print].
- Borel, F., Han, R., Visser, A., Petry, H., van Deventer, S.J., Jansen, P.L., Konstantinova, P., 2012. Adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes up-regulation in untreated hepatocellular carcinoma is mediated by cellular microRNAs. *Hepatology* 55, 821–832.
- Cao, J., Stieger, B., Meier, P.J., Vore, M., 2002. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G757–G766.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., 2012. Role of estrogens in spermatogenesis. *Front. Biosci.* 4, 1–11.
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2012. The blood–testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.* 64, 16–64.
- Dean, M., 2009. ABC transporters, drug resistance and cancer stem cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 14, 3–9.
- Delbes, G., Levacher, C., Habert, R., 2006. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 132, 527–538.
- Du Souich, P., Fradette, C., 2011. The effect and clinical consequences of hypoxia on cytochrome P450, membrane carrier proteins activity and expression. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 1083–1100.
- Ee, P.L., Kamalakaran, S., Tonetti, D., He, X., Ross, D.D., Beck, W.T., 2004. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res.* 64, 1247–1251.
- Elali, A., Hermann, D.M., 2012. Liver X receptor activation enhances blood–brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCG1 on brain capillary cells. *Brain Pathol.* 22, 175–187.
- Evseenko, D.A., Paxton, J.W., Keelan, J.A., 2007. Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab. Dispos.* 35, 595–601.
- Fetsch, P.A., Abati, A., Litman, T., Morisaki, K., Honjo, Y., Mittal, K., Bates, S.E., 2006. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett.* 235, 84–92.
- Filipiak, E., Walczak-Jedrzejowska, R., Oszukowska, E., Guminska, A., Marchlewska, K., Kula, K., Slowikowska-Hilczer, J., 2009. Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis. *Folia Histochem. Cytobiol.* 47, S113–S120.
- Jee, Y., Noh, E.M., Cho, E.S., Son, H.Y., 2010. Involvement of the Fas and Fas ligand in testicular germ cell apoptosis by zearalenone in rat. *J. Vet. Sci.* 11, 115–119.
- Jilani, K., Lang, F., 2013. Ca<sup>2+</sup>-dependent suicidal erythrocyte death following zearalenone exposure. *Arch. Toxicol.*, March 21, Epub ahead of print.
- Kim, I.H., Son, H.Y., Cho, S.W., Ha, C.S., Kang, B.H., 2003. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol. Lett.* 138, 185–192.
- Koraiichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Benahmed, M., Prouillac, C., Lecoeur, S., 2012. Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver. *Toxicol. Lett.* 211, 246–256.
- Lang, F., Qadri, S.M., 2012. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif.* 33, 125–130.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 216–237.
- Lui, W.Y., Mruk, D., Lee, W.M., Cheng, C.Y., 2003. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 68, 1087–1097.
- Melaine, N., 2002. Multidrug Resistance Genes and P-Glycoprotein in the Testis of the Rat, Mouse, Guinea Pig, and Human. *Biol. Reprod.* 67, 1699–1707.

- Meunier, L., Siddeek, B., Vega, A., Lakhdari, N., Inoubli, L., Bellon, R.P., Lemaire, G., Mauduit, C., Benahmed, M., 2012. Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and Mcl-1. *Endocrinology* 153, 1936–1947.
- Morgan, J.A., Cheepala, S.B., Wang, Y., Neale, G., Adachi, M., Nachagari, D., Leggas, M., Zhao, W., Boyd, K., Venkataraman, R., Schuetz, J.D., 2012. Deregulated hepatic metabolism exacerbates impaired testosterone production in MRP4-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 287, 14456–14466.
- Patak, P., Hermann, D.M., 2011. ATP-binding cassette transporters at blood–brain barrier in ischaemic stroke. *Curr. Pharm. Des.* 17, 2787–2792.
- Perez-Martinez, C., Garcia-Iglesias, M.J., Ferreras-Estrada, M.C., Bravo-Moral, A.M., Espinosa-Alvarez, J., Escudero-Diez, A., 1996. Effects of in-utero exposure to zearanol or diethylstilboestrol on morphological development of the fetal testis in mice. *J. Comp. Pathol.* 114, 407–418.
- Perez-Martinez, C., Ferreras-Estrada, M.C., Garcia-Iglesias, M.J., Bravo-Moral, A.M., Espinosa-Alvarez, J., Escudero-Diez, A., 1997. Effects of in utero exposure to nonsteroidal estrogens on mouse testis. *Can. J. Vet. Res.* 61, 94–98.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
- Pognan, F., Masson, M.T., Lagelle, F., Charuel, C., 1997. Establishment of a rat Sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell. *Cell Biol. Toxicol.* 13, 453–463.
- Scharenberg, C., Mannowetz, N., Robey, R.W., Brendel, C., Regges, P., Sahrhage, T., Jahn, T., Wennemuth, G., 2009. ABCG2 is expressed in late spermatogenesis and is associated with the acrosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 302–307.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Scrimo, P.J., Merckenthaler, I., 1998. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 63, 498–504.
- Smith, P.K., Krohn, R.L., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- St-Pierre, M.V., Stallmach, T., Freimoser Grundschober, A., Dufour, J.F., Serrano, M.A., Marin, J.J., Sugiyama, Y., Meier, P.J., 2004. Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R1505–R1516.
- Su, L., Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2009. Drug transporter, P-glycoprotein (MDR1), is an integrated component of the mammalian blood–testis barrier. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2578–2587.
- Tagami, M., Kusuhara, S., Imai, H., Uemura, A., Honda, S., Tsukahara, Y., Negi, A., 2010. MRP4 knockdown enhances migration, suppresses apoptosis, and produces aggregated morphology in human retinal vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 593–598.
- Takemura, H., Shim, J.Y., Sayama, K., Tsubura, A., Zhu, B.T., Shimoi, K., 2007. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zearanol in vivo and in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103, 170–177.
- Thuillier, R., Wang, Y., Culty, M., 2003. Prenatal exposure to estrogenic compounds alters the expression pattern of platelet-derived growth factor receptors alpha and beta in neonatal rat testis: identification of gonocytes as targets of estrogen exposure. *Biol. Reprod.* 68, 867–880.
- Toyama, Y., Ohkawa, M., Oku, R., Maekawa, M., Yuasa, S., 2001. Neonatally administered diethylstilbestrol retards the development of the blood–testis barrier in the rat. *J. Androl.* 22, 413–423.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs Jr., D.R., Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers, J.P., 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455.
- Wijnholds, J., Mol, C.A., van Deemter, L., de Haas, M., Scheffer, G.L., Baas, F., Beijnen, J.H., Scheper, R.J., Hatse, S., De Clercq, E., Balzarini, J., Borst, P., 2000. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7476–7481.
- Wilcox, A.J., Baird, D.D., Weinberg, C.R., Hornsby, P.P., Herbst, A.L., 1995. Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *N. Engl. J. Med.* 332, 1411–1416.
- Williams, K., McKinnell, C., Saunders, P.T., Walker, M., Fisher, J.S., Turner, K.J., Atanassova, N., Sharpe, M., 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. *Hum. Reprod. Update* 7, 236–247.
- Yasuda, Y., Kihara, T., Tanimura, T., Nishimura, H., 1985. Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice. *Teratology* 32, 219–227.
- Yasuda, S., Itagaki, S., Hirano, T., Iseki, K., 2006. Effects of sex hormones on regulation of ABCG2 expression in the placental cell line BeWo. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9, 133–139.
- Yuan, H., Deng, Y., Yuan, L., Wu, J., Yuan, Z., Yi, J., Zhang, M., Guo, C., Wen, L., Li, R., Zhu, L., He, Z., 2010. Gynostemma pentaphyllum protects mouse male germ cells against apoptosis caused by zearalenone via Bax and Bcl-2 regulation. *Toxicol. Mech. Methods* 20, 153–158.
- Zapulla, D., 2008. Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO2 increases? *J. Cardiometab. Syndr.* 3, 30–34.
- Zhang, Y., Zhou, G., Wang, H., Zhang, X., Wei, F., Cai, Y., Yin, D., 2006. Transcriptional upregulation of breast cancer resistance protein by 17beta-estradiol in ERalpha-positive MCF-7 breast cancer cells. *Oncology* 71, 446–455.
- Zhang, Y., Wang, H., Wei, L., Li, G., Yu, J., Gao, Y., Gao, P., Zhang, X., Wei, F., Yin, D., Zhou, G., 2010. Transcriptional modulation of BCRP gene to reverse multidrug resistance by toremifene in breast adenocarcinoma cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 123, 679–689.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C., Manes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an estrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1–18.

- **Article n°2 :**

*Breast-cancer anti estrogen resistance 4 (BCAR4)* encodes a novel maternal-1 effect protein in bovine and is expressed in the oocyte of human and other non rodent mammals. ANGULO, L, PERREAU, C, **LAKHDARI N**, UZBEKOV R, PAPILLIER, P,FRERET, S, CADORET, V, ROYERE, D, PONSART, UZBEKOVA, S DALBIES-TRAN, R. Hum Reprod. **2013**; 28(2):430-41.



## Breast-cancer anti-estrogen resistance 4 (BCAR4) encodes a novel maternal-effect protein in bovine and is expressed in the oocyte of humans and other non-rodent mammals

L. Angulo<sup>1,2,3,4,5</sup>, C. Perreau<sup>1,2,3,4</sup>, N. Lakhdari<sup>1,2,3,4</sup>, R. Uzbekov<sup>3</sup>, P. Papillier<sup>1,2,3,4</sup>, S. Freret<sup>1,2,3,4</sup>, V. Cadoret<sup>1,2,3,4,6</sup>, C. Guyader-Joly<sup>5</sup>, D. Royere<sup>1,2,3,4,6</sup>, C. Ponsart<sup>5</sup>, S. Uzbekova<sup>1,2,3,4</sup>, and R. Dalbies-Tran<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France <sup>2</sup>CNRS, UMR7247, F-37380 Nouzilly, France <sup>3</sup>Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France <sup>4</sup>IFCE, F-37380 Nouzilly, France <sup>5</sup>Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale, F-94704 Maisons-Alfort, France <sup>6</sup>Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHRU de Tours, F-37044 Tours, France

\*Correspondence address. E-mail: dalbies@tours.inra.fr

Submitted on July 23, 2012; resubmitted on October 1, 2012; accepted on October 29, 2012

**STUDY QUESTION:** Does BCAR4 have a role in mammalian embryo development?

**SUMMARY ANSWER:** Expression, localization and functional data support that BCAR4 is a maternal-effect protein in non-rodent mammals.

**WHAT IS KNOWN ALREADY:** BCAR4 was previously identified as an oocyte-specific gene in cattle, and as a marker of certain breast tumors in humans.

**STUDY DESIGN, SIZE, DURATION:** Human oocytes were obtained from patients undergoing IVF, but had failed to mature after ovarian stimulation. Dog oocytes were obtained from ovariectomized bitches. Pig, horse and bovine ovaries were obtained from commercial slaughterhouses for extraction of immature oocyte–cumulus complexes. *In vivo* matured bovine matured oocytes were obtained after ovulation induction and ovulation inducing treatment of Montbeliard heifers.

**MATERIALS, SETTING AND METHODS:** Expression at the RNA level was analyzed by reverse transcription coupled to polymerase chain reaction. Western blot and immunolabeling coupled to confocal or electronic microscopy were used to analyze bovine protein expression and intracellular localization. For the functional approach, short-interfering RNA were microinjected into mature bovine oocytes, followed by IVF; cleavage and embryo development were recorded.

**MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE:** The *BCAR4* gene is conserved in mammalian species from various orders and has been lost in rodents after divergence with lagomorphs. The transcript is expressed in the oocytes of humans and domestic species. We bring the first experimental evidence of the BCAR4 protein in mammals. In cattle, the protein is not detected in immature oocytes but starts to be synthesized during maturation, increases in the zygote and persists until the morula stage. The protein is detected throughout the cytoplasm in mature oocytes, concentrates in and around the pronuclei in the zygote, and appears to shuttle in and out of the nuclei starting in the 2-cell embryo; BCAR4 is also present at the junctions between blastomeres from 2-cell to morula. In our functional approach, targeting the BCAR4 transcript by small-interfering RNA significantly compromised development to the morula or/and blastocyst stages ( $P < 0.05$ , logistic regression).

**LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION:** As indicated above, protein expression and function were investigated in cattle and mostly *in vitro* matured oocytes were used.



**WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS:** This study provides a novel candidate gene whose mutation or deregulation may underlie certain cases of unexplained female infertility.

**STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S):** This work was sponsored by grants from the French Ministry of Research (#03P409), Agence Nationale de la Recherche (#ANR-07-GANI-004-01) and Apisgene. No competing interests declared.

**Key words:** oocyte quality / embryo development / gene expression / animal model

## Introduction

Despite improvements in assisted reproduction technologies, ~15% of couples remain unable to conceive a child without identified causes and are diagnosed with idiopathic infertility (Matzuk and Lamb, 2002). For a subset of them, fertilization does not appear affected, but fertilized eggs are unable to proceed through the early stages of preimplantation development. This observation incriminates oocyte quality, due to the essential role of maternal factors during this period when the embryo relies mostly on maternal transcripts and proteins. In this context, the so-called maternal-effect genes should draw particular attention. They are genes transcribed in the oocyte whose products (RNA or proteins) are not necessary for normal ovarian function and fertilization, but are indispensable for embryo development. It appears likely that mutations in some of these genes underlie certain cases of unexplained infertility in women. Some of these studies are mentioned below. Polymorphisms in the MATER (Maternal Antigen That Embryos Require) gene are being investigated in a cohort of women with reduced number of two pronuclei embryos and a poor embryo quality (Gustofson *et al.*, 2005) and ClinicalTrials.gov identifier NTC00361816). Indeed, following initial identification of MATER as a human autoantigen associated with premature ovarian failure (Tong *et al.*, 2000b), the essential role of *Mater* in embryo development was demonstrated using knockout mice: oocytes from homozygous null females are ovulated and fertilized, but the resulting embryos fail to develop beyond the 2-cell stage (Tong *et al.*, 2000a). *Fmin-2* (*Fmn2*) has also been investigated as a candidate gene for unexplained infertility in woman. The *Fmn2* protein is indispensable for the migration of the metaphase spindle and the formation of the first polar body (Leader *et al.*, 2002); fertilization of murine oocytes deficient in *Fmn2* produced polyploid embryos resulting in pregnancy loss and subfertility in *Fmn2*<sup>-/-</sup> females. An additional study that was designed to characterize the human gene and to search for mutations in women displaying unexplained infertility and multiple failed IVF cycles could not identify a causative mutation among seven patients (Ryley *et al.*, 2005).

These two examples illustrate how transgenic mice have been a useful and elegant approach to identify and characterize maternal-effect genes in mammals (Li *et al.*, 2010). Many of these are conserved in the human genome. However, it should be kept in mind that the mouse should not be the sole model to uncover genes important for embryonic development. Indeed, mouse embryo preimplantation development displays very specific features. Major genome activation occurs as early as the 2-cell stage while it is delayed in most other species, up until the 4/8-cell transition in humans and 8/16-cell transition in bovine (Camous *et al.*, 1986; Braude *et al.*, 1988; Telford *et al.*, 1990). Thus, maternal factors are expected to support development through several cell cycles in

these species. The timing of compaction, when the cells become polarized and adherens junctions form between them, occurs also at different stages relative to embryo development. It occurs in 8-cell mouse embryos, whose blastomeres all have an outward facing apical domain, while 16- and 32-cell human and bovine embryos already display external and internal cells when compaction occurs (Krupinski *et al.*, 2011). Other similarities in oocyte maturation and embryo development between humans and bovine have been reviewed (Menezo and Herubel, 2002; Krisher, 2012). They include the chronology of meiotic maturation, embryo development and implantation, the organization and dynamics of the cytoskeleton and centrosome during oocyte maturation and fertilization, and the embryo metabolic requirements.

In order to discover novel putative maternal-effect genes in mammals, a library of bovine oocyte cDNAs was generated (Penner *et al.*, 2005). In this library, we have isolated several clones representing the *Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 4* (*BCAR4*) gene, which we reported for the first time as an oocyte-preferential gene (Thelie *et al.*, 2007). The human gene had independently been identified in a screening for genes responsible for tamoxifen resistance in breast cancer cells (Meijer *et al.*, 2006); forced expression of *BCAR4* in breast cancer cells induced estrogen-independent cell proliferation and rapid tumor growth. High *BCAR4* mRNA levels were associated with tumor aggressiveness and a shorter metastasis-free survival (Godinho *et al.*, 2010). The objective of this study was to investigate whether *BCAR4* expression in oocytes was conserved among mammals including humans and, using the bovine as a model, to demonstrate that the gene actually encodes a protein; characterize its spatio-temporal pattern throughout *in vitro* preimplantation development; and investigate the consequences of microinjecting interfering RNA on embryo development. Altogether, our expression and functional data strongly support the hypothesis that *BCAR4* is a novel maternal-effect gene in mammals. In light of our data and its proliferative promotion properties in cancer cells, the role of *BCAR4* in preimplantation development is discussed.

## Materials and Methods

Chemicals and cell culture products were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) unless otherwise indicated.

### Bioinformatics sequence analysis

Transmembrane domains were predicted using Simple Modular Architecture Research Tool version 7 (Letunic *et al.*, 2012) and Phobius (Kall *et al.*, 2007). The presence of a signal peptide or nuclear export signal was searched using signalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011) and NET-NES (la Cour *et al.*, 2004), respectively.

Sequence alignment was generated with MUSCLE (Edgar, 2004) and curated manually, then with GBLOCKS (Castresana, 2000). An unrooted tree was obtained as the result of computation with PhyML methods (Dereeper et al., 2008) with 100 bootstrap iterations.

### Oocyte collection and embryo production

Human oocytes were obtained with informed consent from five patients undergoing an IVF protocol; they had failed to fully mature after hormonal stimulation. Dog oocytes were from ovariectomized animals; they were a gift from Dr Karine Reynaud, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, France. *In vivo* matured bovine oocytes were obtained by ovum pick-up from 6 to 15 mm follicles, from Montbeliard heifers after ovulation induction and ovulation inducing treatment.

Pig, horse and cow ovaries were obtained from commercial slaughterhouses. Immature oocyte–cumulus complexes (OCCs) were aspirated from antral follicles (3–8 mm follicles for bovine), selected following morphological criteria and washed several times in TCM199 Hepes medium. Some bovine OCCs were subjected to *in vitro* maturation in TCM199 supplemented with EGF, IGF-I, FGF, hCG, PMSG, insulin, transferrin and selenium, for 22 h at 39°C in humidified air with 5% of CO<sub>2</sub> (Donnay et al., 2004). For inhibiting meiotic resumption, the oocytes were incubated in this medium supplemented with 25 μM roscovitini for 22 h, then transferred into the permissive medium for another 22 h. IVF was performed in Talp medium (Tyrode medium supplemented with bicarbonate, lactate, pyruvate, BSA and gentamycin) and 20 h later, presumed zygotes were denuded and transferred into droplets of modified synthetic oviduct fluid supplemented with 5% fetal calf serum (MP Biomedicals, Illkirsh, France) (Holm et al., 1999). Embryos were cultured at 39°C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub>/90% N<sub>2</sub>. For protein analysis, pools of 10–25 immature and mature oocytes with a polar body as well as zygotes (Day 1 post-IVF), 2-cell and 4-cell embryos (Day 2), morulae (Day 5), expanded blastocysts (Day 7) and hatched blastocysts (Day 9) were analyzed. Parthenotes were produced by activation using ionomycin and 6-dimethylaminopurine.

### Small-interfering RNA microinjection

The small-interfering RNA (siRNA) design algorithm (BLOCK-iT™ RNAi Designer, Invitrogen, Marly-le-Roi, France) was used to design two distinct siRNAs species targeting the coding sequence of bovine BCAR4 mRNA. Genomic databases were interrogated to rule out homology to any other known gene. Two distinct couples of *in vivo* grade HPLC purified stealth RNAi were ordered and diluted to 25 μM with RNase free water. The sense–antisense duplexes sequences were, respectively, AAACCAGGUCCACUGACUGUAGCU-AGCUAACAGUCAGUGGACCUGGUUU (RNAi1) and GAGAAUUGCUCAGGAUCCUUGUAAGCUUACAAGGAUCCUGAGCAAUUCUC (RNAi2). Groups of 50 denuded MII oocytes (DOs) were microinjected with ~2 pl of either a 25 μM solution of a stealth™ RNAi negative control duplex (Invitrogen) or a specific duplex RNAi species, using an inverted microscope equipped with micromanipulators. In parallel, non-microinjected groups of 50 OCCs and 50 DOs were incubated as controls. Oocytes then underwent IVF in the presence of additional mature OCCs. Thereafter, presumed zygotes originating from OCCs and from denuded (microinjected) oocytes were separated, and the latter were submitted to *in vitro* development, as described above. Cleavage, morulae, blastocysts and hatched blastocysts rates were recorded. For investigating BCAR4 mRNA and protein knock-down, respectively, individual embryos and pools of 10 embryos at both the 2-cell and 4-cell stages were collected, from five independent experiments (100 microinjected oocytes per group per replicate).

### Protein analysis

#### Antibody generation and characterization

A keyhole limpet hemocyanin (KLH)-coupled peptide corresponding to aa 89–102 of bovine BCAR4 was used to immunize rabbits (Eurogentec, Angers, France). By western blot, the corresponding serum recognized a protein migrating at 18 kDa in mature oocytes, which was neither detected in immature oocytes nor in cumulus cells, nor with the pre-immune serum (not shown). Next the antibody was purified by peptide affinity. A band at 18 kDa was detected in mature oocytes, but not in cumulus cells. The specificity of the antibody was further confirmed by detection of the band in HEK293T cells transfected with the pSG5-BCAR4 expression plasmid but not the empty vector (not shown).

#### Western blot

To analyze protein secretion, maturation and fertilization media, either fresh or following incubation for 20–24 h with 100 OCCs, were concentrated and desalted using Vivaspin 500 μl columns. For detection in oocytes or embryos, pools of 10–25 structures were analyzed. After heat denaturation in Laemmli buffer, proteins were resolved on 15% SDS–PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Blots were blocked with 5% milk and then probed with anti-BCAR4 antibody (0.34 μg/ml, i.e. 1/1000) or with anti-tubulin or anti-vinculin antibody overnight at 4°C. The membranes were then washed and incubated for 2 h at room temperature with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Molecular Probe, Cergy Pontoise, France). Revelation was performed using Western lightning chemiluminescence reagent plus kit (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Quantification was done with the Image Scanner and ImageMaster 1D elite v4.10 software (GE Healthcare, Velizy, France).

### Immunofluorescence

Oocytes and embryos were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. After permeabilization with PBS–triton 0.2% and blocking in 10% goat serum, they were incubated overnight at 4°C with both anti-BCAR4 antibody (1/1000) and mouse anti-LAMIN A/C antibody (Ozyme) (1/1000) or equivalent concentrations of rabbit and mouse IgG as a negative control. After washing, they were incubated for 2 h at room temperature with Alexa 488 conjugated goat anti-rabbit antibody and Alexa 594 conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probe). Slides were mounted with Mowiol containing Hoechst 33258. Immunofluorescence was observed using an LSM 700 confocal microscope (Zeiss, le Pecq, France). Seven to 14 oocytes/embryos at each stage were observed.

### Electron microscopy

Fixing and labeling of immature oocytes (as negative controls) and zygotes was as described above, except that the secondary antibody was an anti-rabbit antibody conjugated to 20 nm gold particles. After immunolabeling, oocytes and zygotes were washed with PBS and additionally fixed with 1% glutaraldehyde in PBS (2 h), washed with PBS and post-fixed by incubation for 1 h with 2% osmium tetroxide (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA). Samples were dehydrated in a graded series of ethanol solutions (from 50 to 100%) and propylene oxide, and embedded in Epon resin, which was allowed to polymerize for 24 h at 37°C followed by 48 h at 60°C. Ultra-thin sections (70 nm) were cut with a Leica Ultracut UCT ultramicrotome, placed on EM one-slot grids coated with Formvar film and stained with uranyl acetate (5% water solution, 20 min). The sections were then observed at 100 kV with a Jeol 1011 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) connected to a digital camera driven by



Digital Micrograph software (Gatan, Pleasanton, CA, USA) for image acquisition and analysis.

## RNA purification, reverse transcription and polymerase chain reaction

### RNA extraction and reverse transcription

After adding 1 µg of luciferase mRNA (Promega, Charbonnières-les-bains, France) per oocyte/embryo as an external standard, RNA was extracted from pooled oocytes or individual bovine embryos conserved in RNAlater (Ambion, Huntingdon, UK) using PicoPure RNA Isolation Kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed at 37°C using oligo(dT) primers (Promega) and Mouse Moloney Leukaemia Virus reverse transcriptase (Invitrogen).

### Polymerase chain reaction and real-time polymerase chain reaction

Target cDNA were amplified using the iQ Sybrgreen Supermix (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) and gene-specific primers (Table 1) and quantified relative to exogenous luciferase as described in Thelie *et al.* (2007).

## Statistical analysis

The percentages of cleaved embryos, morulae and blastocysts were analyzed with logistic regression models using the GLIMMIX procedure of the SAS<sup>®</sup> software (SAS Institute Inc., 2009) with a logit function. The models included the fixed effects of replicate and condition. The interaction between replicate and condition was tested and then removed from the model when non-significant. Results are presented as estimated means (least square means) + SEM. Estimated means were subsequently compared between conditions using a t-test. Comparison of mRNA or protein abundance between embryos originating from oocytes microinjected with control or specific RNAi was performed using the non-parametric Mann-Whitney test (GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 software, La Jolla, CA, USA) and differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ( $P < 0.05$ ). Data are represented as means + SEM.

## Results

### Sequence analysis and phylogeny

Putative orthologs were previously reported in boreoeutherian mammals of various orders: primates, lagomorphs (rabbit and American pika), artiodactyls (cow), perissodactyls (horse) and scandantiae (common treeshrew) (Thelie *et al.*, 2007; Godinho *et al.*, 2011). In this study, we extended the search but focused on species for which we have some developmental data. By sequence alignment, we found putative orthologs in the syntenic region of two additional domestic species, dog (a carnivore) and pig, but not in the rodent Guinea pig. Sequence alignment is presented in Fig. 1A. Indeed, the sequence has significantly diverged between mammals, with 36–58% similarity between proteins of species from different orders (73% between cow and pig, which are both artiodactyls). The higher degree of similarity, in the middle part of the protein, corresponds to the putative transmembrane domains and the intermediary amino acids stretch.

An unrooted phylogenetic tree was built with mammalian BCAR4 proteins (Fig. 1B). It regrouped BCAR4 proteins from primates, rabbit and horse apart from BCAR4 from dog, bovine and pig. In search for amino acids that may have a particular role in certain

species/orders, we ran a positive selection analysis, but failed to identify amino acids under positive selection.

The presence of putative transmembrane domains (Thelie *et al.*, 2007; Godinho *et al.*, 2011) and a signal peptide (Godinho *et al.*, 2011) in BCAR4 was previously reported. As these features are difficult to distinguish and previous tools were prone to generate false-positive signal peptides, the signalP 4.0 version was recently developed specifically to discriminate between signal peptides and N-terminal transmembrane helices (Petersen *et al.*, 2011). Using SignalP4.0, when transmembrane domains were considered, the program did not predict a signal peptide in any BCAR4 ortholog. Predicted transmembrane domains were found in the canine and porcine sequences (aa30–49 and 55–78, and aa 26–50 and 56–78, respectively), and confirmed for other species; these domains were also predicted by the SMART and Phobius tools. The latter predicted N- and C-terminal cytoplasmic regions with a short, 5–11 amino-acid extracellular part in all orthologous proteins. Finally, potential leucine-rich nuclear export signals were found using the NET-NES tool. Corresponding residues are shown in Fig. 1A.

### Expression in mammalian oocytes

BCAR4 mRNA expression was investigated for the first time in human oocytes. By polymerase chain reaction (PCR), the transcript was readily detected in oocytes from all five patients, but absent from cumulus cells, conversely to the transcript for anti-Müllerian hormone (AMH) (Fig. 2). The ubiquitous transcript for ribosomal protein 19 (RPL19) was detected in both compartments.

We also collected oocytes from mare, bitch and gilt. Using species-specific primers (Table 1), we amplified a fragment of expected size by RT-PCR (not shown). Identity with predicted BCAR4 was further confirmed by sequencing.

Altogether, our data show that oocyte expression of BCAR4 is conserved throughout distinct orders of non-rodent mammals.

### Expression of BCAR4 protein during bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development

So far, the human BCAR4 gene has been annotated as a non-protein-coding gene in several public genomic databases, and there is no report of protein expression in the literature. An antibody targeting a peptide within the C-terminal region of the bovine protein was generated and tested (see the Materials and Methods section). Expression of BCAR4 protein was analyzed by western blot during oocyte maturation and embryo development. BCAR4 was not detected in immature oocytes. Protein synthesis started between 10 and 15 h incubation, corresponding to transition between metaphase I and anaphase I when chromosomes are separating to the poles; it became more abundant after the oocytes had completed nuclear maturation (Fig. 3A). BCAR4 synthesis was inhibited when in the presence of roscovitine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases, but resumed after the oocytes were transferred to a permissive medium, showing that meiosis resumption and maturation were required for expression (Fig. 3B). BCAR4 was also detected after *in vivo* maturation (Fig. 3A). Protein level increased sharply in zygotes, then remained stable throughout early development up to the 8-cell stage. It decreased in morulae, and was degraded in blastocysts (Fig. 3C). Interestingly, a

**Table 1** Primers sequences.

Gene symbol	Species	Primer	Sequence (5'→3')	Experiment
Luciferase	Firefly	Luciferase-SI Luciferase-ASI	TCATTCTCGCCAAAAGCACTCTG AGCCCATATCCTTGTGCGTATCCC	Real-time PCR
AURKA	Cow	AURKA-SI AURKA-ASI	TCGGGAGGACTTGGTTTCTT TGTGCTTGTGAAGGAACACG	Real-time PCR
BCAR4	Cow	BCAR4-SI BCAR4-ASI	GAAGGGTGTGCTGATTCTGTTAAG CATTGTTGTTACCAGGGCGAAGG	Real-time PCR
	Pig	pBCAR4-SI pBCAR4-ASI	ACCCCTGCAGTAAAATCA TTAACATCCCAAAGATTCCAG	PCR
	Dog	dBCAR4-SI dBCAR4-ASI	GGCGACTCAAGTCATAGG GCCATGGCTGCTTCTACTTC	PCR
	Horse	hBCAR4-SI hBCAR4-ASI	GCCGGTACAAGGATGTAATCA AAAGACTCCGTACCGTCTCG	PCR
	Human	huBCAR4-SI huBCAR4-ASI	ATACAATGGCGTAATCATAGC AGACATTCAGAGCAAGACA	PCR
	AMH	Human	AMH-SI AMH-ASI	CCTACCTGAGGAAGT CCTCGTCACAGTGACCTC
RPL19	Human	RPL19-SI RPL19-ASI	TGAGACCAATGAAATCGCCAATGC ATGGACCCTCACAGGCTTGC	PCR

similar BCAR4 level was detected in zygotes, in parthenotes, as well as in mature oocytes incubated for an additional 24 h period in the fertilization media without spermatozoa (Fig. 3D).

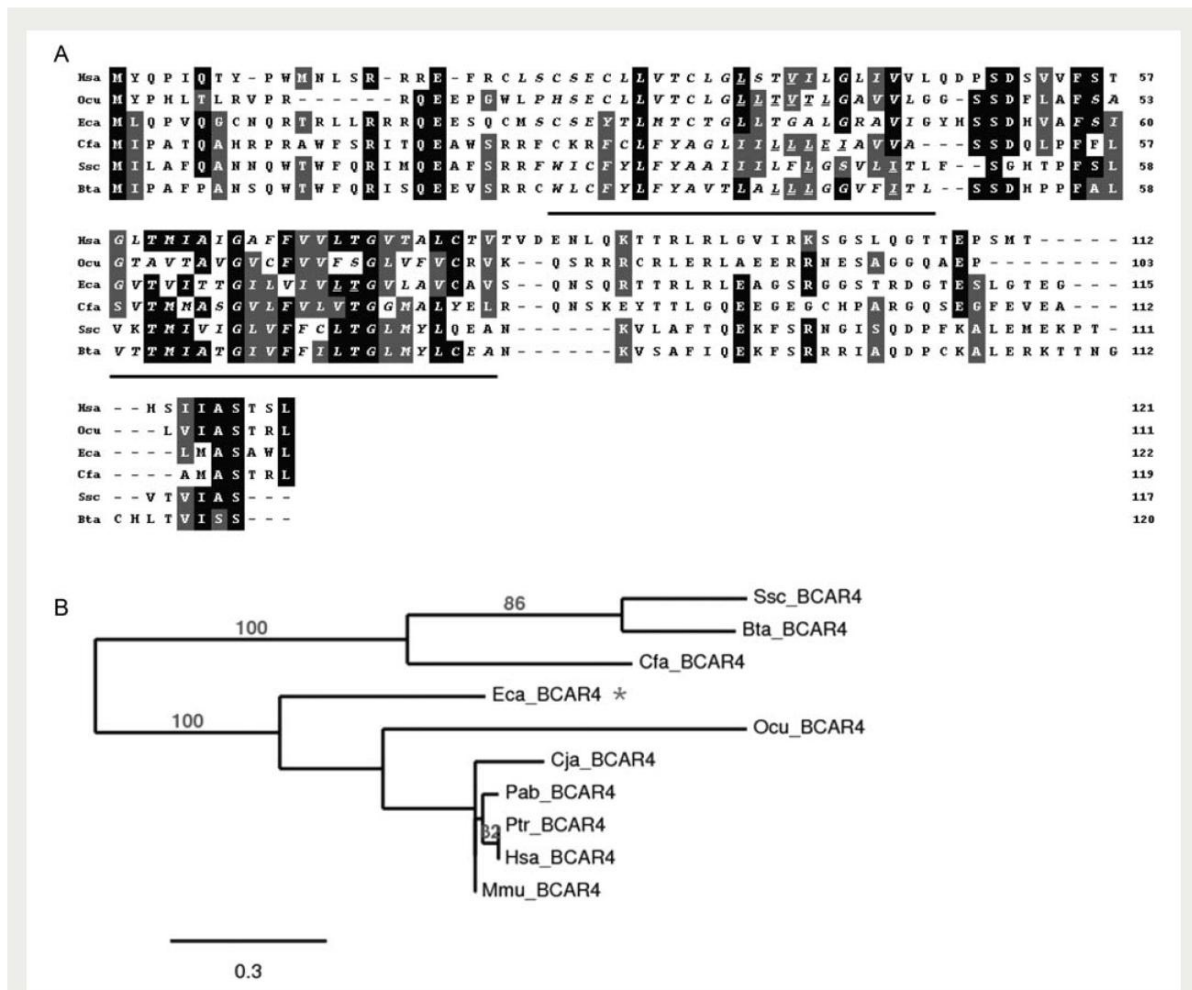
To investigate whether BCAR4 could be secreted by oocytes and embryos, the presence of the protein in the maturation or fertilization media was analyzed. We failed to detect the corresponding band by western blot, suggesting that the protein is not secreted (not shown).

### Intracellular localization

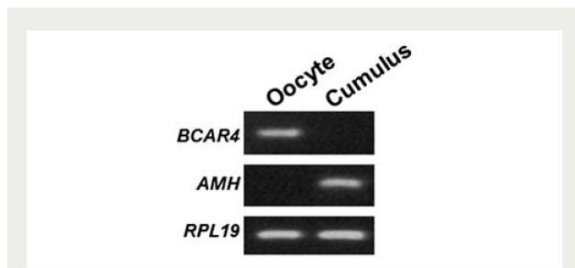
In order to determine intracellular localization of the BCAR4 protein in bovine oocytes and embryos, we performed immunofluorescent staining followed by confocal microscopy analysis (Fig. 4). As expected from the western blot, no staining was detected in germinal vesicle (GV) stage oocytes. In metaphase II oocytes, labeling was readily detected throughout the ooplasm. The protein started to display a preferential spatial localization in pronuclear zygotes, as it was observed mostly within the pronuclei and in the surrounding cytoplasmic region (Fig. 4C). This was confirmed by pre-embedding immunogold labeling coupled to electron microscopy, followed by quantification of gold particles over successive sections (Fig. 5). In 2- and 4-cell embryos, BCAR4 was present at the junctions between blastomeres; it was also observed in the cytoplasmic area surrounding the nuclei, and within or excluded from the nuclei. Interestingly, in 2-cell embryos, both blastomeres displayed the same pattern (Fig. 4D and E), while the two patterns could be observed in distinct blastomeres of a 4-cell embryo (Fig. 4F). In morulae, roughly the same distribution was observed albeit the labeling was less intense (Fig. 4G). In expanded blastocysts, BCAR4 was not detected, as previously observed by western blotting (Fig. 4H). As a negative control, no staining was revealed using rabbit IgG as the primary antibody (not shown). Overall, in bovine embryos between the zygote and morula stages, BCAR4 protein displayed preferential localization in the cytoplasmic region surrounding the (pro)nuclei, in the (pro)nuclei of a subset of embryo or blastomeres and at the junction between blastomeres.

### Functional analysis by siRNA microinjection

BCAR4 expression specifically in maturing oocytes and early-stage embryos strongly suggested a role as a maternal-effect factor. To investigate its functional importance during embryonic development, RNAi-mediated gene silencing was performed by microinjection into the cytoplasm of denuded mature bovine oocytes. Two RNAi targeting two distinct regions of the coding sequence were used. Following fertilization, the rates of cleavage and development to morula, expanded blastocysts at Day 7 and/or 8 and hatched blastocysts at Day 9 post-insemination, were evaluated. In a first set of experiments, in order to validate the microinjection procedure, cleavage (relative to the number of oocytes) and morulae and blastocysts rates (relative to the number of cleaved embryos) were compared between non-microinjected OCC or DO and negative control RNAi-injected DO (Fig. 6). As expected, due to the presence of the cumulus, cleavage (reflecting fertilization) rate was higher for OCC, whereas no significant difference was observed between the other two groups, showing that microinjection and negative control RNAi were not deleterious. In a second set of experiments, the effect of BCAR4 targeting RNAi versus negative control RNAi was investigated (Fig. 7). No difference in cleavage rate was observed between control and specific RNAi-microinjected groups (Fig. 7A), but development to morulae and expanded blastocysts was specifically altered in the presence of either BCAR4-targeting RNAi (Fig. 7B–E); the differences were significant ( $P < 0.05$ ) except in one situation, i.e. for Day 7 blastocysts (Fig. 7C) originating from RNAi-microinjected oocytes (with still a tendency,  $P = 0.08$ ). Developmental rates were decreased by 20–30% for morulae, 30–50% for blastocysts and 55–65% for hatched blastocysts. The efficiency of the RNAi was controlled by assessing BCAR4 transcript and protein abundance by real-time PCR and western blotting, respectively (Fig. 8). The effect of RNAi was not observed in 2-cell (Fig. 8A and C) embryos, but appeared to be delayed to the 4-cell stage (Fig. 8B and D). At this stage, although the decrease in mRNA abundance was not significant, possibly due to the



**Figure 1** Evolution of BCAR4 in non-rodent mammals. **(A)** Alignment of putative protein sequences in humans (Hsa), rabbit (Ocu), horse (Eca), dog (Cfa), pig (Ssc) and cow (Bta). Amino acids conserved or similar in a majority of proteins are in black or gray boxes, respectively. Amino acids predicted in transmembrane domains are in italic, and indicated with a black line in cow. Amino acids in putative leucine-rich nuclear export signals are underlined. **(B)** Phylogenetic tree with bootstrap values >80%. Stars correspond to branches that are non-congruent with species tree.



**Figure 2** BCAR4 transcript is expressed in human oocytes. Detection of BCAR4 and AMH expression by RT-PCR in human oocytes and cumulus cells, respectively. RPL19 was detected in both cell types.

high variability in control embryos, protein expression was significantly decreased by 63 and 75%, respectively, by the two RNAi species.

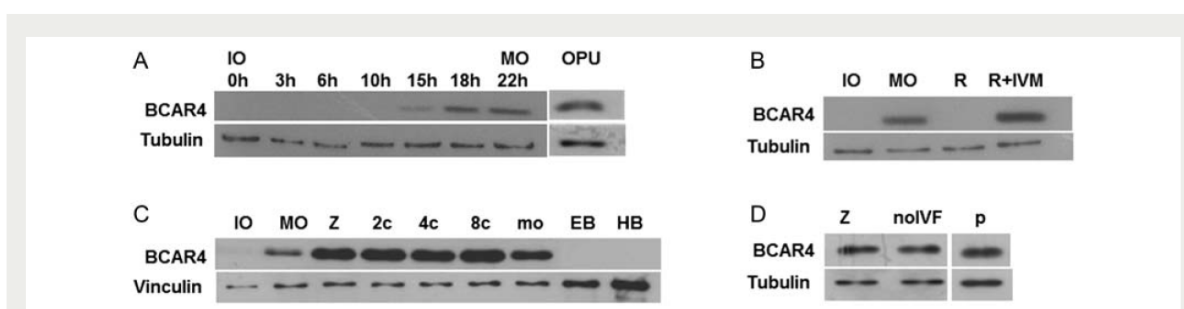
## Discussion

In this paper, we have demonstrated that BCAR4 encodes a novel maternally expressed protein with maternal-effect properties, and is conserved in various non-rodent mammals. Our data are discussed in the context of its putative function during preimplantation embryo development.

## Evolution

The human BCAR4 gene was discovered as a marker of a subset of breast cancer tumors (Meijer *et al.*, 2006). In parallel, we had





**Figure 3** Expression of BCAR4 protein throughout bovine oocyte maturation and embryo preimplantation development. Western blot analysis of BCAR4 and Tubulin or Vinculin as a control. **(A)** Kinetics of protein synthesis in oocytes during *in vitro* maturation, in immature oocytes (IO), after 3, 6, 10, 15, 18 and 22 h (metaphase-II mature oocytes, MO) incubation in maturation medium, and in *in vivo* matured oocytes (OPU). **(B)** Effect of roscovitin. Expression in IO, after 22 h in maturation medium in the absence (MO) or presence (R) of roscovitin, and the latter followed by another 22 h in maturation medium (R + IVM). **(C)** Profile throughout development. Detection in IO, MO, zygotes (Z), 2-cell (2c), 4-cell (4c) and 8-cell (8c) embryos, morulae (mo), expanded (EB) and hatched (HB) blastocysts; **(D)** effect of fertilization. Detection in Z, mature oocytes incubated in fertilization medium without sperm (noIVF), and parthenotes (p).

discovered the bovine ortholog as an oocyte preferentially expressed gene (Thelie *et al.*, 2007). Although putative protein sequences were reported, experimental studies were limited to expression of the transcript and to this day, the human gene remains annotated as non-protein coding. However, due to the coding sequence being fairly short, included within a single exon, and without well-known consensus motifs, automated annotation tools are likely to have missed it. Here for the first time, we have actually demonstrated expression of the protein in bovine, suggesting that proteins exist in other species too.

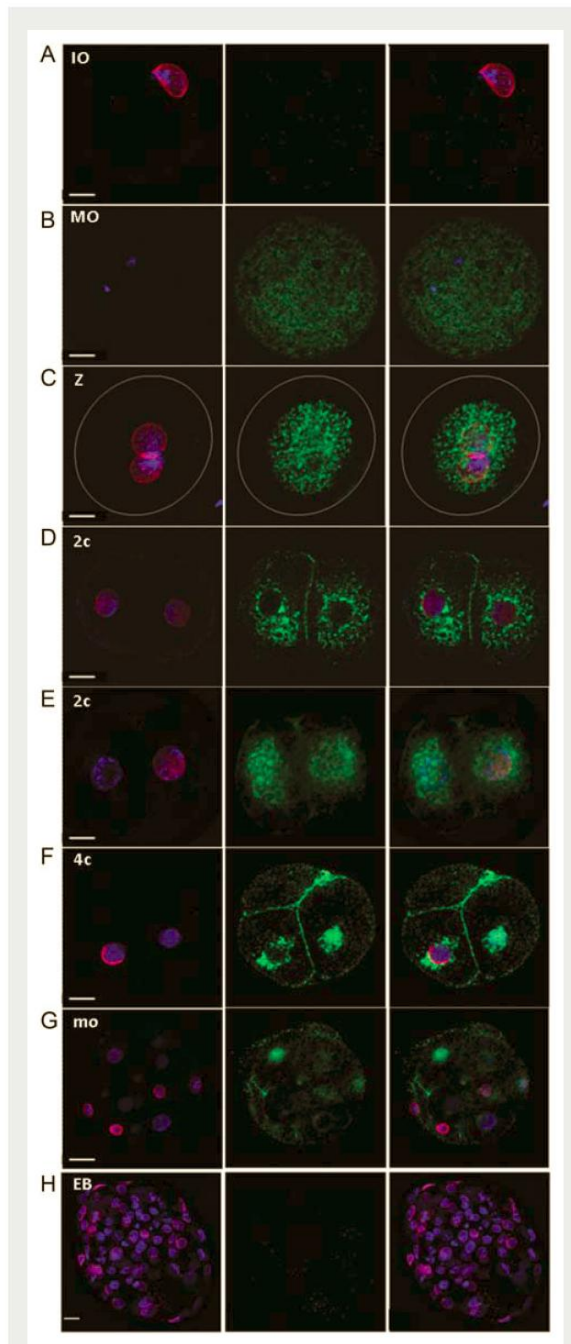
Beyond humans and bovine, based on sequence alignment, several homologs have been reported in various orders of eutherian mammals: among primates, lagomorphs (rabbit and American pika), perissodactyls (horse) and scandantiae (common tree shrew) (Godinho *et al.*, 2011). Here we have discovered orthologs in the genomes of *sus scrofa*, a second artiodactyl and *canis familiaris*, a carnivore. The phylogenetic tree is incongruent to the species tree and reveals the major divergence of the horse protein relative to the cow, pig and dog orthologs, even though all four species belong to the Laurasiatheria superorder. The absence of the gene in mouse and rat demonstrates that the gene has been lost after the speciation between lagomorphs and rodents. Among these species, major genome activation occurs as early as the 2-cell stage in mouse and presumably rat, but one or several cell cycles later in the pig, horse, human, dog, cow and rabbit [rat: (Zernicka-Goetz, 1994), dog: (Bysted *et al.*, 2001), horse: (Brinsko *et al.*, 1995), rabbit: (Brunet-Simon *et al.*, 2001), human: (Braude *et al.*, 1988), pig, cow: (Camous *et al.*, 1986), for a review, see Telford *et al.* (1990)]. Thus, the presence of the BCAR4 gene correlates with delayed embryonic genome activation in mammals. Considering the pro-proliferative properties of the human gene (Godinho *et al.*, 2010), it can be speculated that BCAR4 may be involved in cell division up until the embryo can transcribe its own factors.

Bioinformatics analysis of protein sequences did not identify precise functional domains nor related protein families. All orthologous protein sequences displayed two putative transmembrane domains, with predicted cytoplasmic N- and C-termini. The presence of a

signal peptide is unlikely, suggesting that the protein is not truncated, in agreement with our failure to detect a protein of lower molecular weight in oocytes, embryos or culture medium by western blot. On the other hand, amino acids expected to participate into a nuclear export signal were identified in a leucine/isoleucine-rich homologous region. This is consistent with the protein subcellular localization in blastomeres.

### Expression and intracellular localization of BCAR4: a comparison with other proteins of maternal or embryonic origin

The BCAR4 protein displayed interesting features in its expression and localizations patterns. While proteins encoded by oocyte-specific maternal-effect gene in mammals are usually already present in immature oocytes, such as JY1, NPM2, ZARI, MATER or STELLA in mouse or bovine (Tong *et al.*, 2000b; Burns *et al.*, 2003; Payer *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Bettgowda *et al.*, 2007; Lingenfelter *et al.*, 2011). BCAR4 started to be synthesized during late maturation and became more abundant in zygote, similar to the origin recognition complex 6 (ORC6) protein that is required for the first cleavage of mouse embryos (Murai *et al.*, 2010). This is consistent with a role for BCAR4 specifically during the first embryonic divisions. Interestingly, BCAR4 translation appeared to switch from a developmental control during maturation to a chronological control afterwards. Indeed, BCAR4 translation was inhibited in the presence of the meiotic inhibitor roscovitin, and this was reversible, as previously reported for several proteins (Vigneron *et al.*, 2003). Later, BCAR4 level was increased in fertilized zygotes, but also in parthenotes, and quite surprisingly in *in vitro* aged mature oocytes, showing that sperm penetration or egg activation is not required for stimulating BCAR4 translation. In this respect, BCAR4 is again reminiscent of, although not identical to, mouse ORC6. ORC6 was found to be translated during maturation and increased in 1-cell fertilized embryos (Murai *et al.*, 2010). The protein was also detected (if not increased) after parthenogenetic activation and after *in vitro* oocyte aging for 6 h. ORC6 detection in aged oocytes required protein synthesis, either de



**Figure 4** Spatial distribution of BCAR4 in bovine oocytes and preimplantation embryos by immunofluorescence and confocal microscopy. Chromatin in blue and lamins A/C in red (left panel), BCAR4 in green (middle panel) and merged images (right panel). Representative images of (A) immature oocytes (IO), (B) *in vitro* matured oocytes (MO), (C) zygotes (Z) (with the cytoplasmic membrane outlined), (D and E) distinct 2-cell (2c) embryos, (F) 4-cell (4c) embryos, (G) morulae (mo) and (H) expanded blastocyst (EB). Scale bar : 20  $\mu$ m

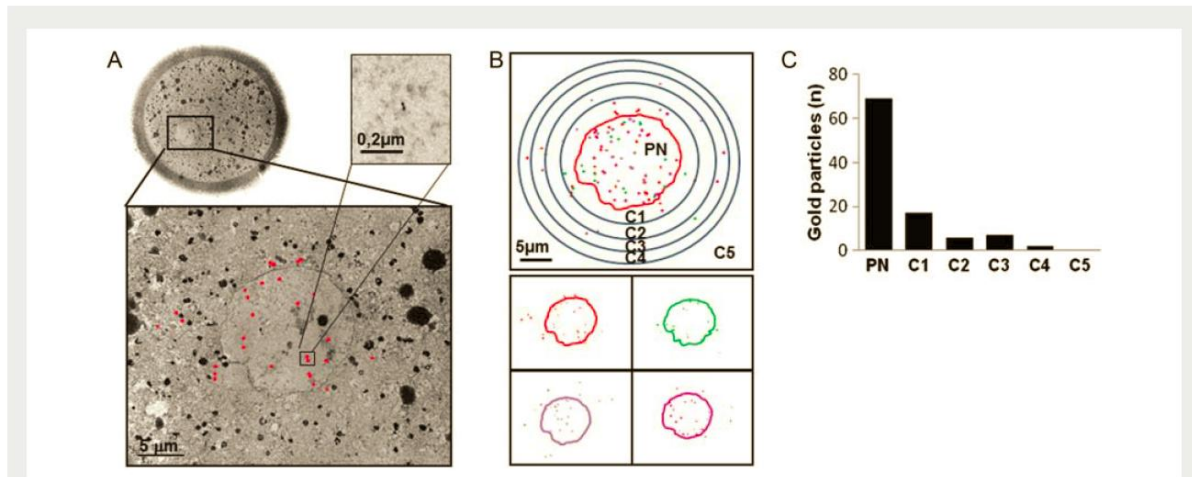
*novo* synthesis of ORC6 itself or synthesis of proteins involved in ORC6 stabilization. Other oocyte-abundant proteins were reported to be synthesized after fertilization or after oocyte aging, but the reciprocal analysis was not run. For example, the mouse oocyte-specific oogenesis and Sam68 proteins were shown to increase between the ovulated oocyte and the 1-cell stage (Minami *et al.*, 2003; Paronetto *et al.*, 2008). Conversely, in pig, a proteomic approach detected four proteins showing a significant increase between MII and *in vitro* aged oocytes, i.e. AKR1B1, SLC25A6, PRDX2 and PCNA (Jiang *et al.*, 2011).

Regarding intracellular localization throughout maturation and development, BCAR4 displays a unique pattern, as we could not find another protein with the same spatio-temporal distribution. Nevertheless, it shares some features with several proteins important for preimplantation development. In zygotes, the protein is found in both pronuclei and their vicinity. The latter may reflect protein processing within the Golgi complex, for future addressing to the plasma membrane, although at this stage no membrane localization is observed yet. Indeed, in cleavage stage embryos, BCAR4 is present at the junction between blastomeres, reminiscent of mouse E-cadherin, the adherens junction protein which mediates compaction (Vestweber *et al.*, 1987; Ohsugi *et al.*, 1996; De Vries *et al.*, 2004). In bovine, E-cadherin localization has not been reported, but expression from the embryonic genome is important for blastocyst formation (Nganvongpanit *et al.*, 2006). Unlike mouse E-cadherin however, BCAR4 expression has started to decrease in morulae and is not reactivated afterwards. Thus, a hypothesis is that BCAR4 may be involved in blastomere adhesion before major activation of the embryonic genome and possibly up to compaction. Another possibility is that BCAR4 could be retained at the cell surface by interacting with an integral membrane protein, as is  $\beta$ -catenin by E-cadherin.  $\beta$ -Catenin is a structural component of adhesion receptors and functions as a transcriptional co-activator of specific target genes in the Wnt pathway, regulating cell fate and proliferation (Davidson, 2010). In bovine, as major activation of the embryonic genome is delayed, BCAR4 presence in the nucleus as early as the 2-cell stage is unlikely to reflect a role in transcription. Rather, it might be involved in DNA replication. Finally, BCAR4 shares similarities with the tight junction protein zona occludens 2 (ZO2). In hamster, ZO2 was detected throughout the cytoplasm of unfertilized eggs, in the (pro)nuclei of embryos, and it was present at the membrane between adjacent blastomeres from the 2-cell stage onwards (Wang *et al.*, 2011). ZO2 displayed a different pattern in mouse, with preferential accumulation near the spindle in MII oocytes, and then a BCAR4-similar localization in (pro)nuclei and surrounding cytoplasmic region of zygotes and 2-cell embryos, nuclear localization in 4- and 8-cell embryos, before switching to blastomere junction only in post-compaction 16-cell embryos and later stages (Sheth *et al.*, 2008). Overall, several proteins in rodents share localization features with BCAR4. But knowledge on how these proteins are located in embryos from non-rodent species is currently lacking and might be helpful in understanding BCAR4 function.

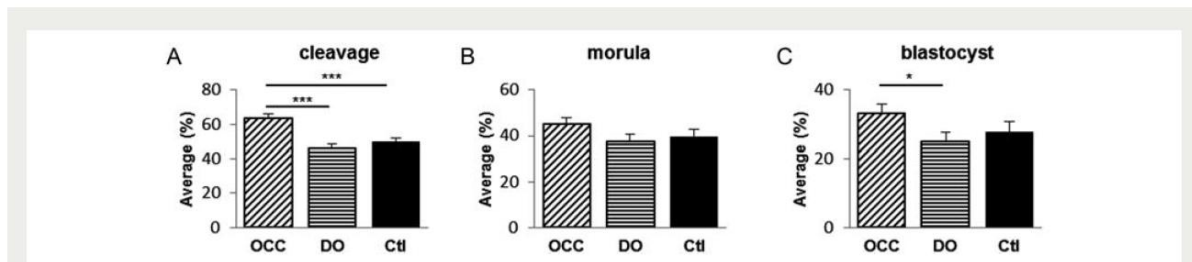
### Hypotheses on mediators of BCAR4 action in oocytes and embryos

In BCAR4-expressing cells derived from the human breast carcinoma cell line ZR-75-1, v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene





**Figure 5** Intracellular localization of BCAR4 in bovine zygotes by immunogold staining coupled to electron microscopy. **(A)** Localization of gold particles in one section. Top left: section of the full oocyte; bottom: close-up onto a region showing the pronucleus and surrounding cytoplasm. Red dots highlight gold particles. Top right: close-up showing two gold particles. **(B)** Section. PN, pronucleus; c1–c5, cytoplasmic zones; c1–c4 have an equal area. **(C)** Counting of gold particles in the pronucleus and regions c1–c5 over four sections of one zygote.



**Figure 6** Validation of the siRNA microinjection procedure. Rate of development to **(A)** 2-cell, **(B)** morula, **(C)** blastocyst rate on Day 8, after fertilization of non-microinjected OCCs and DO, or DO microinjected with a negative control RNAi (Ctl). Data from 11 replicates of 50 oocytes per group. Asterisks denote statistical significance (\* for  $P < 0.05$ , \*\*\* for  $P < 0.001$ ).

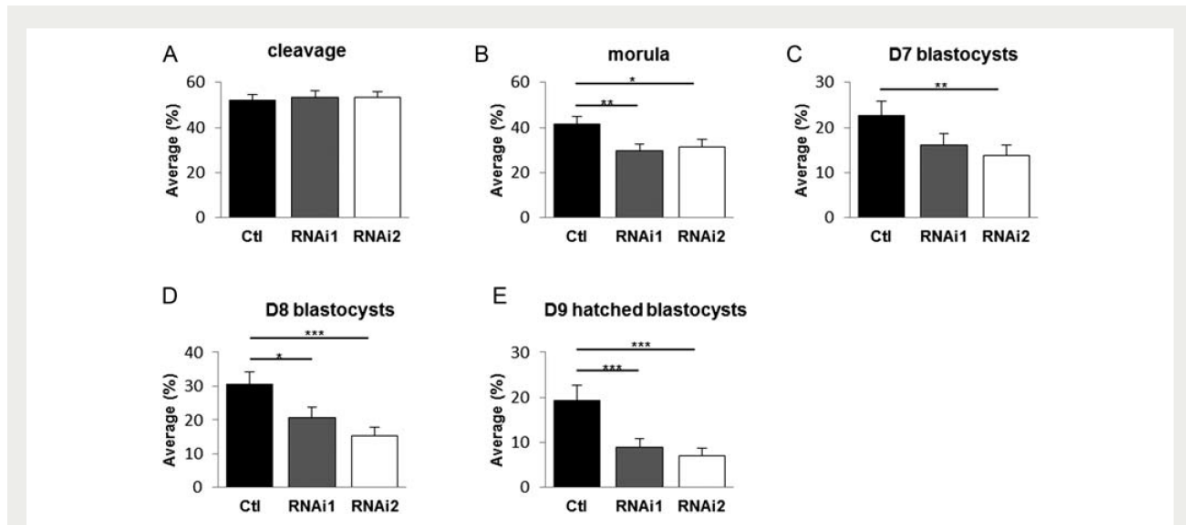
homolog 2 (ERBB2), ERBB3 and downstream components of the ERBB pathway were activated by phosphorylation (Godinho et al., 2010; van Agthoven et al., 2012). We searched whether this pathway could be a target of BCAR4 in oocytes and embryos. The transcripts are not or hardly detected in mouse oocytes to 2-cell embryos, based on Unigene expression profiles, RT–PCR (Brown et al., 2004) or microarrays in the Gene Expression Omnibus database (records# GDS578 (Hamatani et al., 2004); GDS2300 (Su et al., 2007); GDS592 (Su et al., 2004); GDS2387 (Potireddy et al., 2006). Yet, microinjecting antisense oligonucleotides to ErbB2 or recombinant protein into mouse oocytes was recently reported to inhibit or promote maturation, respectively, suggesting that the gene is not only expressed but involved in maturation (Zheng et al., 2012). In bovine, the transcript appears scarce in oocytes based on our own microarray experiment (unpublished results), while ERBB3 was detected until the 2-cell stage by RT–PCR (Yoshida et al., 1998). Finally, ERBB2 was detected in human oocytes (GDS3256 record Kocabas et al., 2006). Besides these dispersed and somewhat

conflicting data, it has to be kept in mind that, until the MET (maternal to embryo transition), the proteins might be present even if the transcripts are not. Better knowledge of ERBB2 and ERBB3 protein expression at these stages is necessary to know whether they could mediate BCAR4 function.

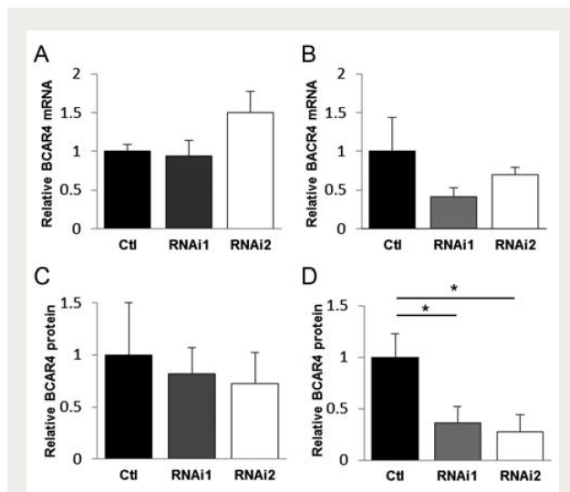
Alternatively, the same signalling pathway could be activated by BCAR4 through the epidermal growth factor receptor (EGFR). EGFR contribution in ZR-75-1 cells could not be investigated due to low expression and cross-reactivity of the antibody (Godinho et al., 2010; van Agthoven et al., 2012). In mouse oocytes and pre-MET embryos, the transcript was detected by RT–qPCR (Brown et al., 2004) and microarray and its relative level in oocytes was high compared with most tissues (records# GDS578 (Hamatani et al., 2004); GDS813 (Zeng et al., 2004); GDS2300 (Su et al., 2007); GDS592 (Su et al., 2004). It also appears to be expressed in humans (record# GDS3256; Kocabas et al., 2006).

Finally, ErbB4 transcript was detected in mouse 1- and 2-cell embryos but undetected from the 8-cell stage onwards (Brown





**Figure 7** Effect of BCAR4-targeting RNAi onto bovine embryo development. Rates of (A) cleavage, (B) morula, (C) blastocysts on day 7, (D) blastocysts on day 8, (E) hatched blastocysts on day 9, after fertilization of oocytes microinjected with the negative control RNAi (Ctl), or a specific RNAi (RNAi1, RNAi2). Data from 8 replicates of 50 oocytes per group. Asterisks denote statistical significance (\* for  $P < 0.05$ , \*\* for  $P < 0.01$ , \*\*\* for  $P < 0.001$ ).



**Figure 8** Effect of RNAi microinjection onto bovine BCAR4 mRNA and protein expression. (A and B) Analysis of mRNA abundance relative to AURKA by real-time PCR, and (C and D) protein abundance relative to Tubulin by western blot in (A and C) 2-cell embryos and (B and D) 4-cell embryos. mRNA and proteins were examined in embryos obtained after fertilization of oocytes microinjected with the negative control RNAi (Ctl), or a specific RNAi (RNAi1, RNAi2). Data from four to five replicates. The asterisk denotes statistical significance ( $P < 0.05$ ).

*et al.*, 2004). It was also detected by microarray in human oocytes (GDS3256; Kocabas *et al.*, 2006). It appears as another putative mediator of BCAR4 effect in early development.

## Conclusion

In this study, we have brought the first experimental evidence of the BCAR4 protein in mammals and characterized its expression in oocyte maturation and early embryo development. In agreement with its spatio-temporal pattern of expression, it shows a maternal-effect in bovine. Future studies should be oriented toward elucidating molecular mechanisms underlying this action. In parallel, we plan to investigate whether altered expression of the gene could underlie certain cases of human infertility.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Aurore Thelie for preliminary experiments, Karine Reynaud and Gylène Goudet for providing dog and horse oocytes, Camille Meslin for running the positive selection analysis, Linda Beauclair for help with western blot and Patrice Humblot and Brigitte Arbeille for helpful discussions.

## Authors' roles

L.A. did western blots, immunofluorescence analysis, IVF and RNA interference experiments together with C.Pe., and wrote the manuscript. P.P. collected bovine ovaries, did RNA purification and RT-PCR on all species. S.U. participated into western blot, immunofluorescence and electron microscopic analyses with R.U. N.L. validated the antibody and analyzed the protein profile during embryo development by western blot. V.C. collected human oocytes. D.R. supervised the human IVF lab and obtained patients consent. S.F. did the statistical analysis. C.G.-J. collected bovine OPU oocytes. C.Po. brought insight throughout the study. R.D.-T. did the bioinformatics and phylogeny

analysis, coordinated and supervised the work and wrote the manuscript.

## Funding

This work is part of the Ovogenae/Ovogenae2 projects and was sponsored by grants from the French Ministry of Research (#03P409), Agence Nationale de la Recherche (#ANR-07-GANI-004-01) and Apisgene. L.A. has a fellowship from Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale.

## Conflict of interest

The authors indicate that there are no conflicts of interest and that they have no professional and financial affiliations that may be perceived as having biased the presentation.

## References

- Bettagowda A, Yao J, Sen A, Li Q, Lee KB, Kobayashi Y, Patel OV, Coussens PM, Ireland JJ, Smith GW. JY-1, an oocyte-specific gene, regulates granulosa cell function and early embryonic development in cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:17602–17607.
- Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988;**332**:459–461.
- Brinsko SP, Ball BA, Iqnotz GG, Thomas PG, Currie WB, Ellington JE. Initiation of transcription and nucleogenesis in equine embryos. *Mol Reprod Dev* 1995;**42**:298–302.
- Brown N, Deb K, Paria BC, Das SK, Reese J. Embryo–uterine interactions via the neuregulin family of growth factors during implantation in the mouse. *Biol Reprod* 2004;**71**:2003–2011.
- Brunet-Simon A, Henrion G, Renard JP, Duranthon V. Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the rabbit embryo. *Mol Reprod Dev* 2001;**58**:127–136.
- Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE, Eppig JJ, Matzuk MM. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* 2003;**300**:633–636.
- Bysted BV, Dieleman SJ, Hyttel P, Greve T. Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 2001;**57**:181–186.
- Camous S, Kopecky V, Flechon JE. Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 1986;**58**:195–200.
- Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 2000;**17**:540–552.
- Davidson G. The cell cycle and Wnt. *Cell Cycle* 2010;**9**:1667–1668.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**:W465–W469.
- De Vries WN, Evisikov AV, Haac BE, Fancher KS, Holbrook AE, Kemler R, Solter D, Knowles BB. Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development* 2004;**131**:4435–4445.
- Donnay I, Faerge I, Grondahl C, Verhaeghe B, Sayoud H, Ponderato N, Galli C, Lazzari G. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. *Theriogenology* 2004;**62**:1093–1107.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;**32**:1792–1797.
- Godinho MF, Sieuwerts AM, Look MP, Meijer D, Foekens JA, Dorssers LC, van Agthoven T. Relevance of BCAR4 in tamoxifen resistance and tumour aggressiveness of human breast cancer. *Br J Cancer* 2010;**103**:1284–1291.
- Godinho M, Meijer D, Setyono-Han B, Dorssers LC, van Agthoven T. Characterization of BCAR4, a novel oncogene causing endocrine resistance in human breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2011;**226**:1741–1749.
- Gustofson RL, Tong Z, Larsen FW, Nelson LM. Women who meet the clinical characteristics of a maternal effect gene defect have a higher incidence of unexplained infertility. *Fertil Steril* 2005;**4**:S140–S141.
- Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 2004;**6**:117–131.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 1999;**52**:683–700.
- Jiang GJ, Wang K, Miao DQ, Guo L, Hou Y, Schatten H, Sun QY. Protein profile changes during porcine oocyte aging and effects of caffeine on protein expression patterns. *PLoS One* 2011;**6**:e28996.
- Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Res* 2007;**35**:W429–W432.
- Kocbas AM, Crosby J, Ross PJ, Otu HH, Beyhan Z, Can H, Tam WL, Rosa GJ, Halgren RG, Lim B et al. The transcriptome of human oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:14027–14032.
- Krisher RL. Utility of animal models for human embryo culture development: domestic species. *Methods Mol Biol* 2012;**912**:27–37.
- Krupinski P, Chickarmane V, Peterson C. Simulating the mammalian blastocyst—molecular and mechanical interactions pattern the embryo. *PLoS Comput Biol* 2011;**7**:e1001128.
- la Cour T, Kierner L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 2004;**17**:527–536.
- Leader B, Lim H, Carabatsos MJ, Harrington A, Ecsedy J, Pellman D, Maas R, Leder P. Fomin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes. *Nat Cell Biol* 2002;**4**:921–928.
- Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* 2012;**40**:D302–D305.
- Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development* 2010;**137**:859–870.
- Lingenfelter BM, Tripurani SK, Tejomurtula J, Smith GW, Yao J. Molecular cloning and expression of bovine nucleoplasmin 2 (NPM2): a maternal effect gene regulated by miR-181a. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;**9**:40.
- Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol* 2002;**4**(Suppl):s41–s49.
- Meijer D, van Agthoven T, Bosma PT, Nooter K, Dorssers LC. Functional screen for genes responsible for tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2006;**4**:379–386.
- Menezo YJ, Herubel F. Mouse and bovine models for human IVF. *Reprod Biomed Online* 2002;**4**:170–175.
- Minami N, Aizawa A, Ihara R, Miyamoto M, Ohashi A, Imai H. Oogenesis is a novel mouse protein expressed in oocytes and early cleavage-stage embryos. *Biol Reprod* 2003;**69**:1736–1742.
- Murai S, Stein P, Buffone MG, Yamashita S, Schultz RM. Recruitment of Orc6l, a dormant maternal mRNA in mouse oocytes, is essential for DNA replication in 1-cell embryos. *Dev Biol* 2010;**341**:205–212.
- Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, Gilles M, Jennen D, Holker M, Tholen E, Schellander K, Tesfaye D. Targeted suppression of

- E-cadherin gene expression in bovine preimplantation embryo by RNA interference technology using double-stranded RNA. *Mol Reprod Dev* 2006;**73**:153–163.
- Ohsugi M, Hwang SY, Butz S, Knowles BB, Solter D, Kemler R. Expression and cell membrane localization of catenins during mouse preimplantation development. *Dev Dyn* 1996;**206**:391–402.
- Paronetto MP, Bianchi E, Geremia R, Sette C. Dynamic expression of the RNA-binding protein Sam68 during mouse pre-implantation development. *Gene Expr Patterns* 2008;**8**:311–322.
- Payer B, Saitou M, Barton SC, Thresher R, Dixon JP, Zahn D, Colledge WH, Carlton MB, Nakano T, Surani MA. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr Biol* 2003;**13**:2110–2117.
- Pennezier S, Uzbekova S, Guyader-Joly C, Humblot P, Mermillod P, Dalbies-Tran R. Genes preferentially expressed in bovine oocytes revealed by subtractive and suppressive hybridization. *Biol Reprod* 2005;**73**:713–720.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 2011;**8**:785–786.
- Potireddy S, Vassena R, Patel BG, Latham KE. Analysis of polysomal mRNA populations of mouse oocytes and zygotes: dynamic changes in maternal mRNA utilization and function. *Dev Biol* 2006;**298**:155–166.
- Ryley DA, Wu HH, Leader B, Zimon A, Reindollar RH, Gray MR. Characterization and mutation analysis of the human formin-2 (FMN2) gene in women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 2005;**83**:1363–1371.
- Sheth B, Nowak RL, Anderson R, Kwong WY, Papenbrock T, Fleming TP. Tight junction protein ZO-2 expression and relative function of ZO-1 and ZO-2 during mouse blastocyst formation. *Exp Cell Res* 2008;**314**:3356–3368.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:6062–6067.
- Su YQ, Sugjura K, Woo Y, Wigglesworth K, Kamdar S, Affourtit J, Eppig JJ. Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 2007;**302**:104–117.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990;**26**:90–100.
- Thelie A, Papillier P, Pennezier S, Perreau C, Traverso JM, Uzbekova S, Mermillod P, Joly C, Humblot P, Dalbies-Tran R. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. *BMC Dev Biol* 2007;**7**:125.
- Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J, Nelson LM. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet* 2000a;**26**:267–268.
- Tong ZB, Nelson LM, Dean J. Mater encodes a maternal protein in mice with a leucine-rich repeat domain homologous to porcine ribonuclease inhibitor. *Mamm Genome* 2000b;**11**:281–287.
- van Aghoven T, Godinho MF, Wulfkühle JD, Petricoin EF III, Dorssers LC. Protein pathway activation mapping reveals molecular networks associated with antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 2012;**131**:1998–2007.
- Vestweber D, Gossler A, Boller K, Kemler R. Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol* 1987;**124**:451–456.
- Vigneron C, Nuttinck F, Perreau C, Reinaud P, Charpigny G, Mermillod P. Effect of roscovitine, a cdk1 inhibitor, and of the presence of oocyte on bovine cumulus cell expansion and cyclooxygenase-2 expression. *Mol Reprod Dev* 2003;**65**:114–121.
- Wang H, Zhao JX, Hu N, Ren J, Du M, Zhu MJ. Side-stream smoking reduces intestinal inflammation and increases expression of tight junction proteins. *World J Gastroenterol* 2011;**18**:2180–2187.
- Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet* 2003;**33**:187–191.
- Yoshida Y, Miyamura M, Hamano S, Yoshida M. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. *J Vet Med Sci* 1998;**60**:549–554.
- Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM. Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 2004;**272**:483–496.
- Zernicka-Goetz M. Activation of embryonic genes during preimplantation rat development. *Mol Reprod Dev* 1994;**38**:30–35.
- Zheng LP, Huang J, Zhang DL, Xu LQ, Li F, Wu L, Liu ZY, Zheng YH. c-erbB2 and c-myc induce mouse oocyte maturation involving activation of maturation promoting factor. *DNA Cell Biol* 2012;**31**:164–170.

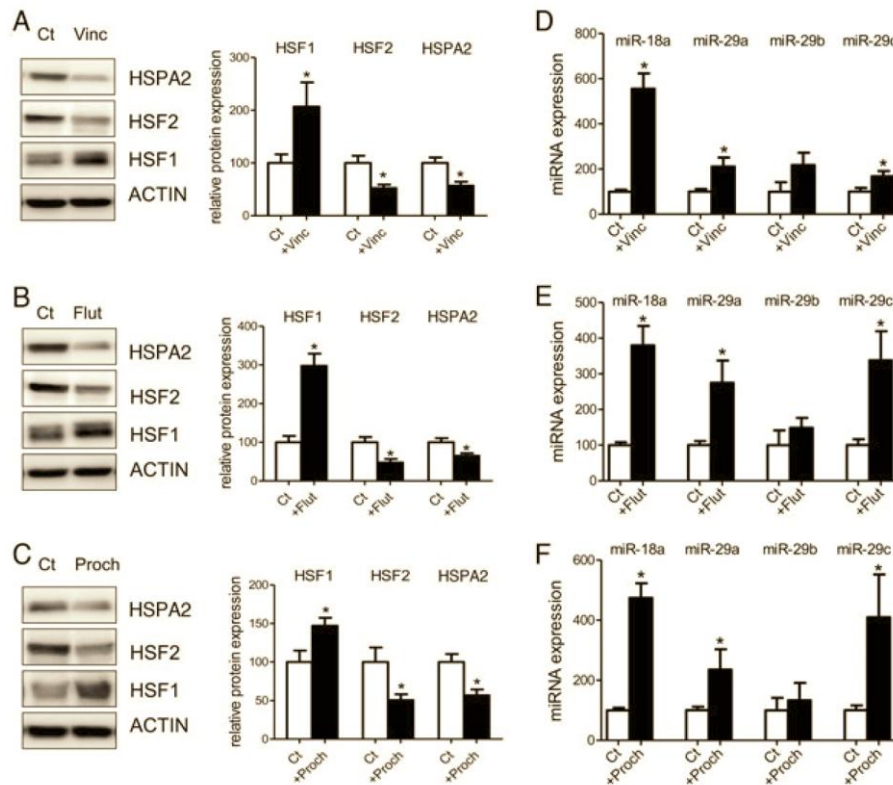
- **Article n°3 (review) :**

MicroRNAs as potential biomarkers in diseases and toxicology. Bénazir SIDDEEK<sup>1, 2</sup>, Iliya INOUBLI<sup>1, 2</sup>, Nadjem LAKHDARI<sup>1,2</sup>, Claire MAUDUIT<sup>1, 2, 3, 4</sup> and Mohamed BENAHMED<sup>1, 2, 5</sup>.  
Publication accepté (review).



• **Données supplémentaires HSF1 HSF2 et HSPA70:**

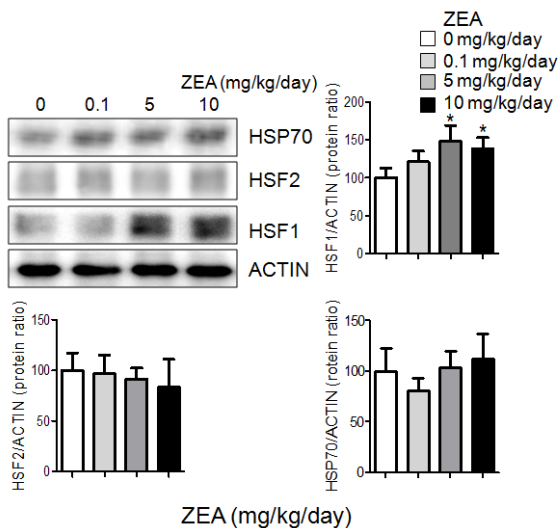
**Figure 1**



**Figure 5**

Neonatal exposure to anti-androgen EDCs induces long-term alterations in HSF/HSP and miRNA levels. HSF1, HSF2, and HSPA2 levels in adult (PND90) testes from unexposed (Ct) rats or from animals exposed (GD6 to PND21) to vinclozolin (A, 20 mg/kg/d, Vinc), flutamide (B, 2.5 mg/kg/d, Flut), or prochloraz (C, 30 mg/kg/d, Proch) were determined by Western blot analyses. Protein levels are expressed as a percentage ratio (target protein/actin) detected in the untreated group. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from seven animals (\*,  $P < 0.05$ ). Mature miR-18a, -29a, -29b, and -29c levels in testes of adult rats (PND90) unexposed (Ct) or exposed to Vinc (D), Flut (E), or Proch (F) were determined by real-time RT-PCR. Histograms represent relative miRNA levels normalized to small nucleolar RNA levels. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM determined from 7–8 rats (\*,  $P < 0.05$ ).

**Figure 2**

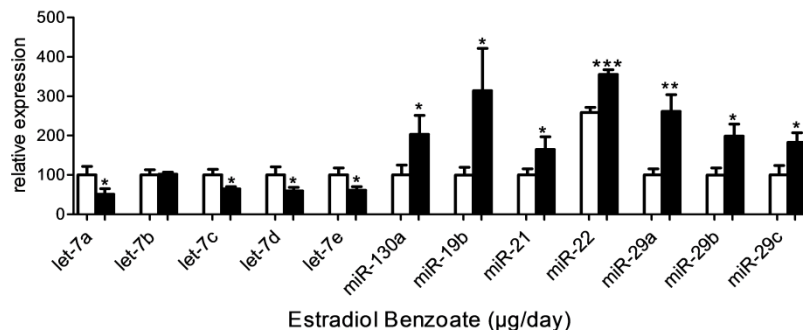




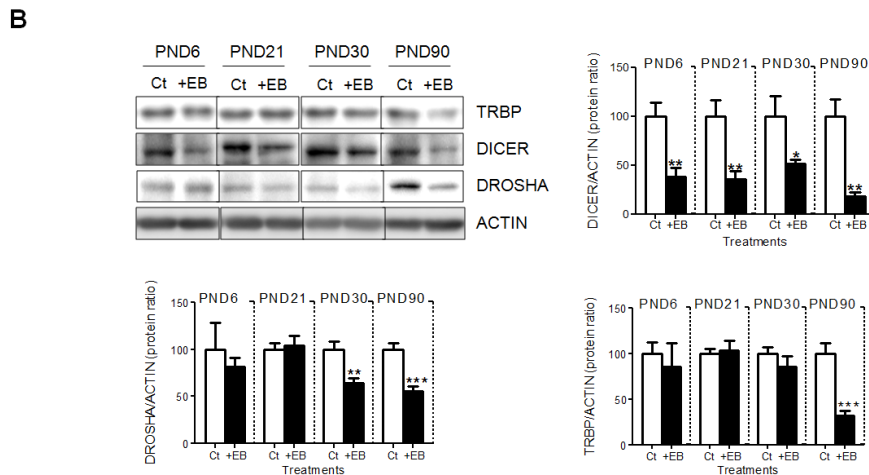
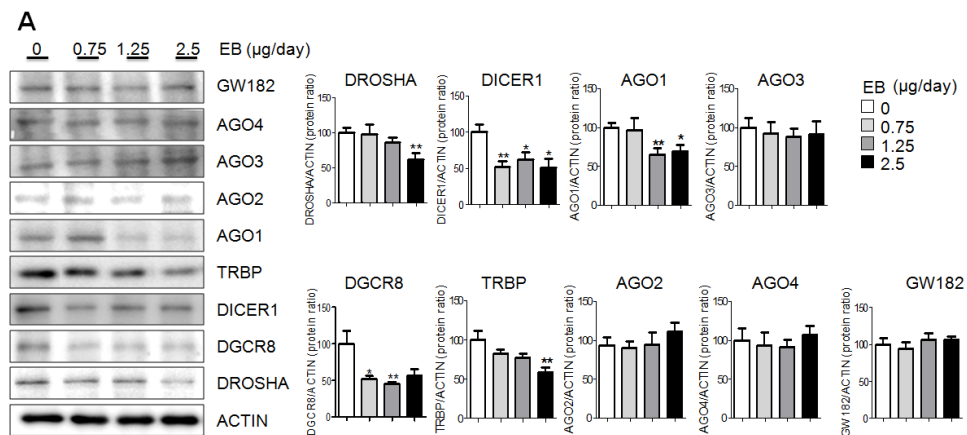
• **Article n°2 :**

Perinatal programming of in adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family and microRNA 130a Dicer regulation. **Nadjem LAKHDARI**, Benazir SIDDEEK, Lilia INOUBLI, Claire MAUDUIT, Mohamed BENAHMED. Publication en cours de préparation.

**Figure 1.**

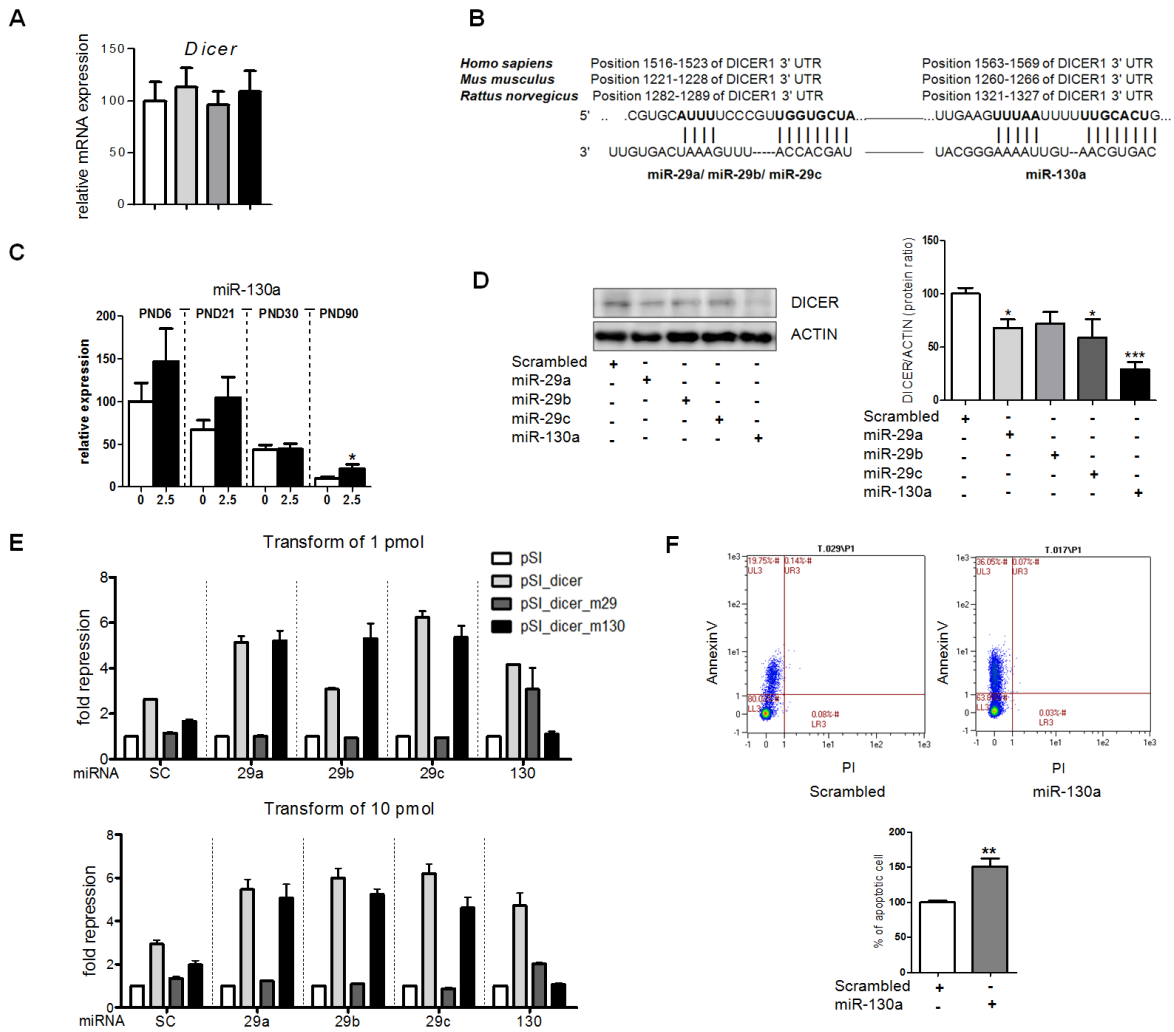


**Figure 2.**

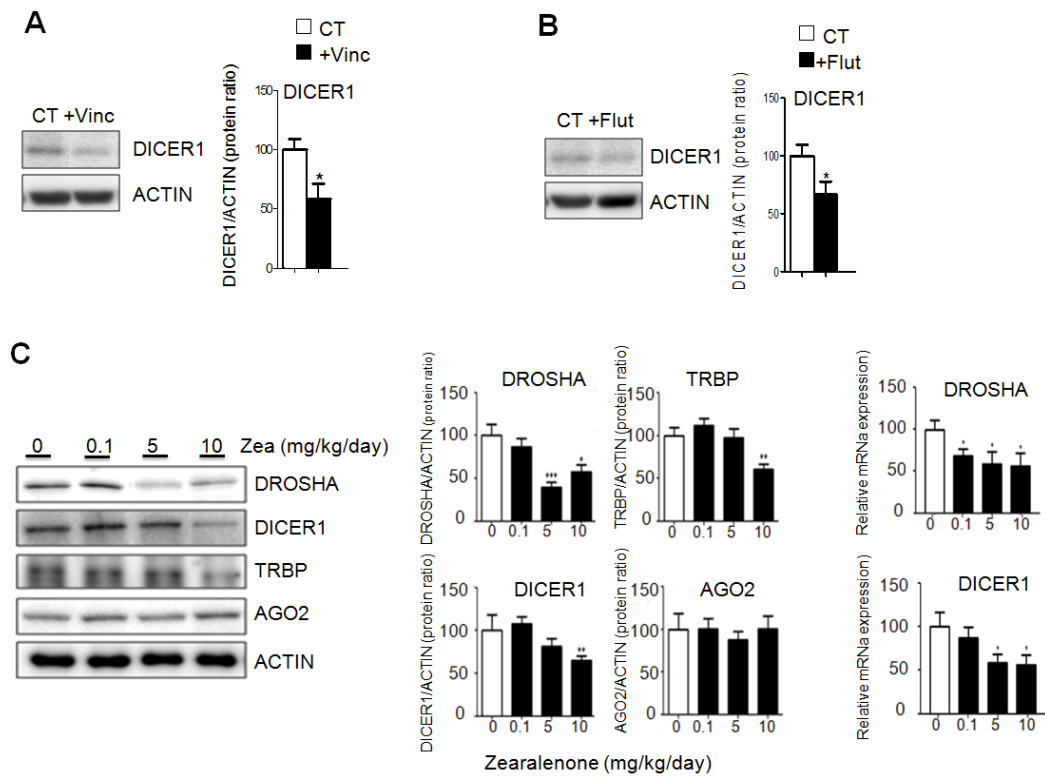




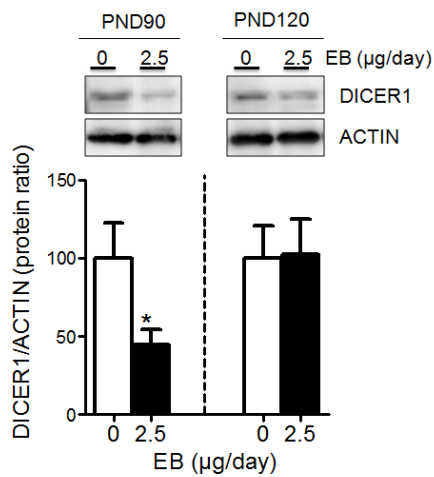
**Figure 3.**



**Figure 4.**



**Figure 5.**

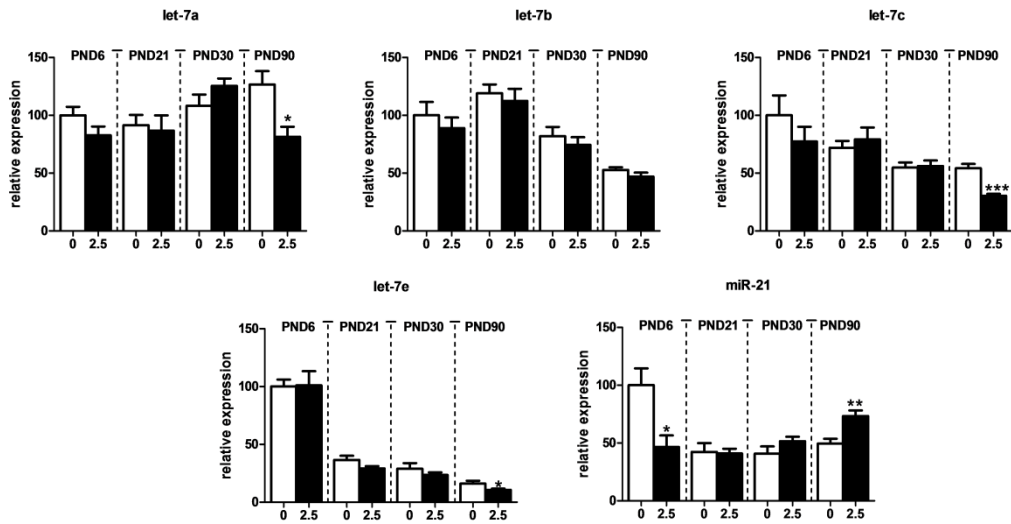


- **Données supplémentaires**

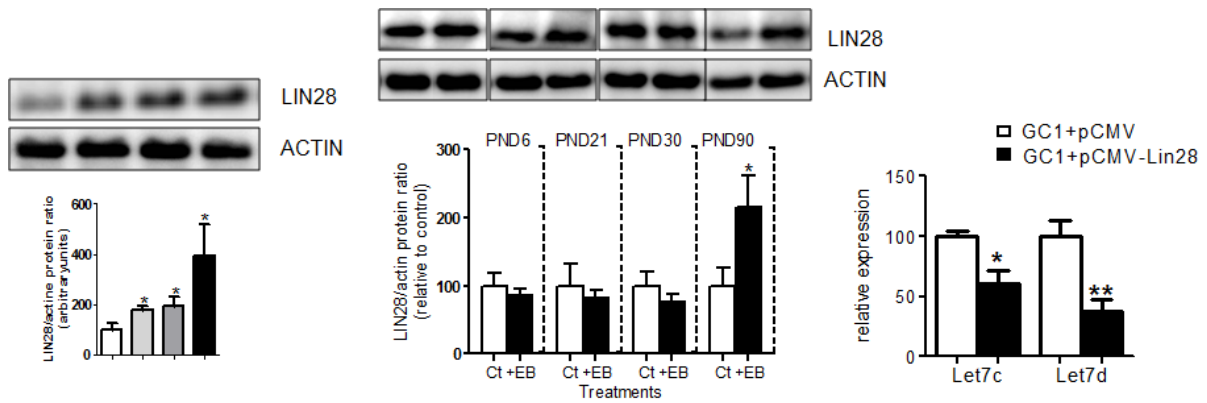
Altérations de l'expression des miARNs Let-7 et HSP27s au niveau du testicule de rat après exposition néonatal au EB.

**Figure 1.**

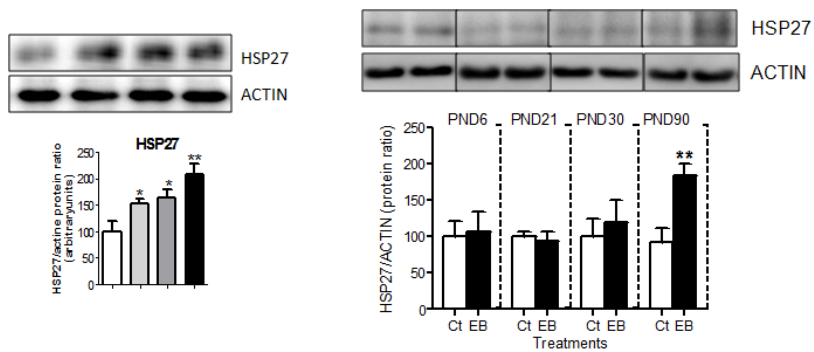
**A**



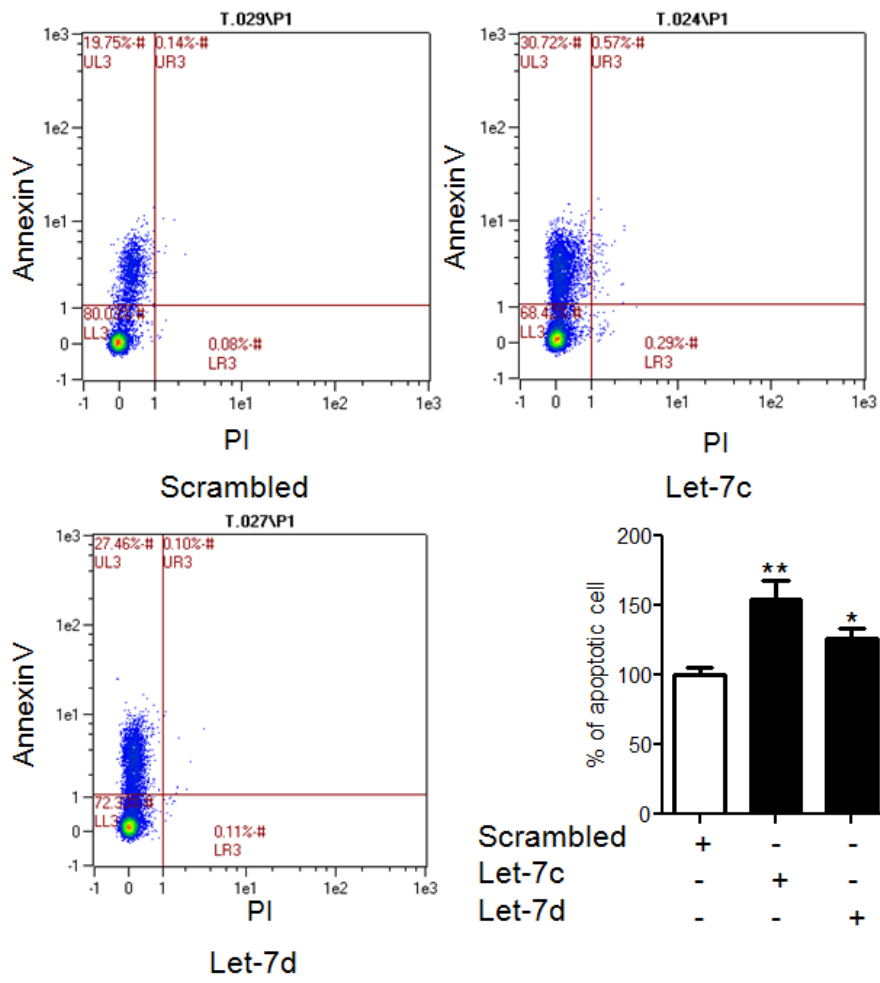
**B**



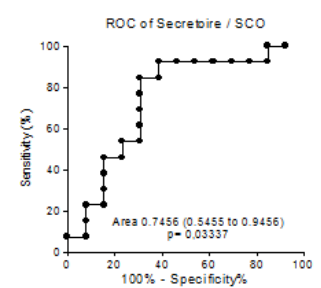
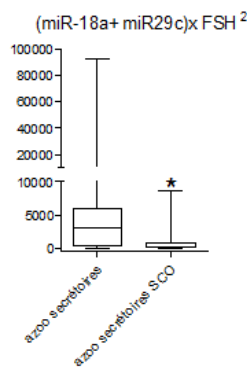
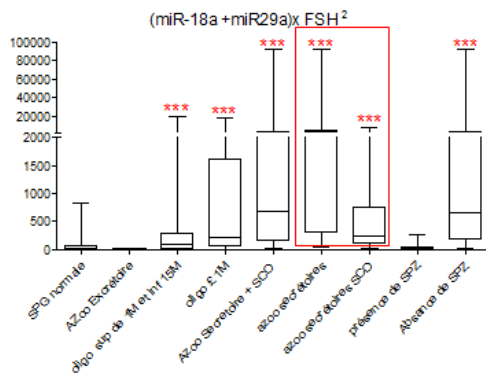
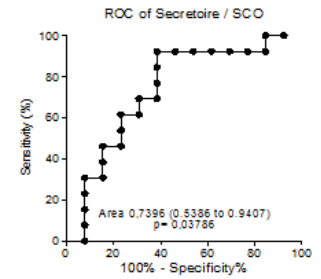
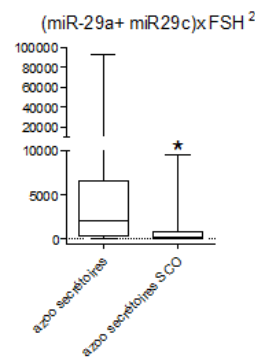
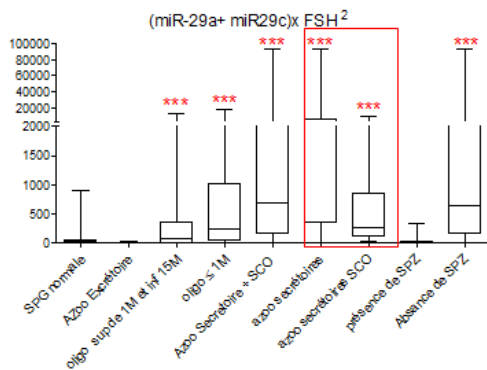
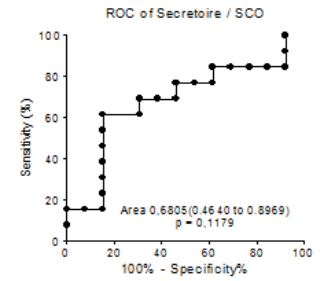
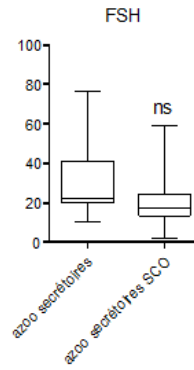
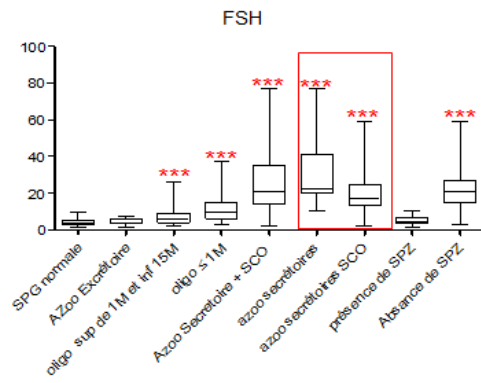
**C**

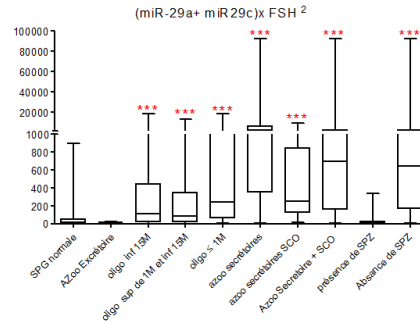
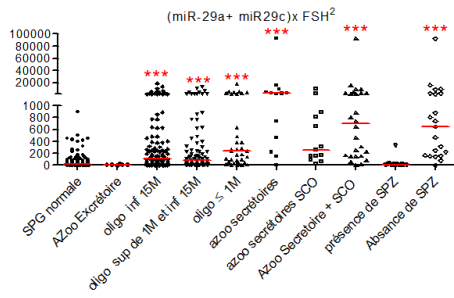


D

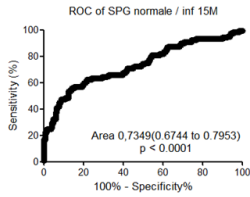


- **Données supplémentaires du dosage de miARNs chez les patients (courbe ROC).**

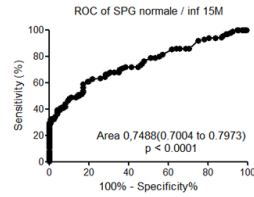




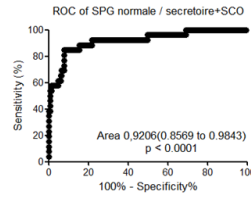
ROC de 29a 29c FSH



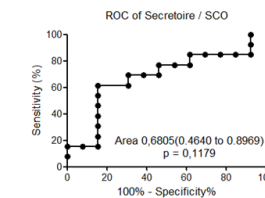
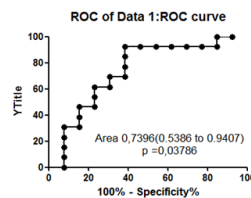
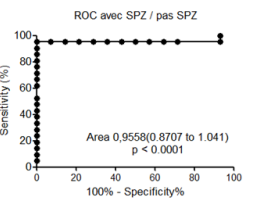
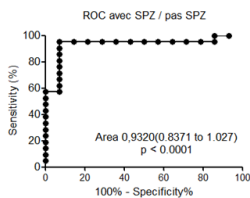
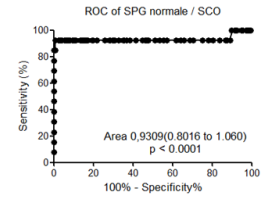
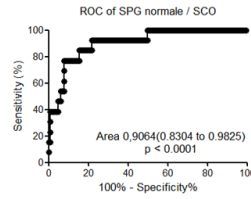
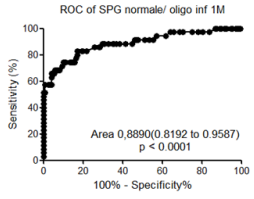
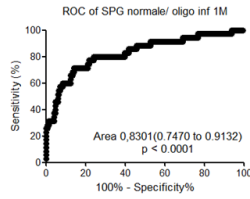
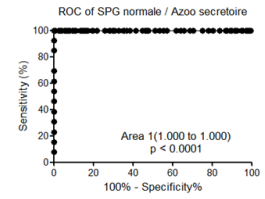
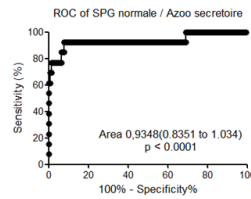
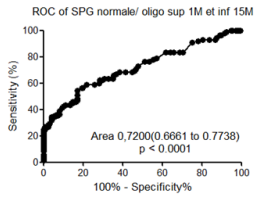
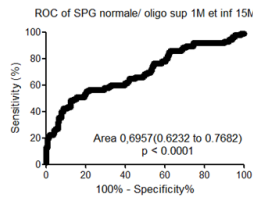
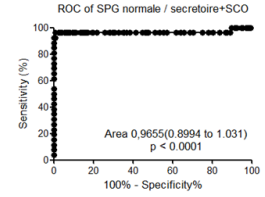
ROC de FSH

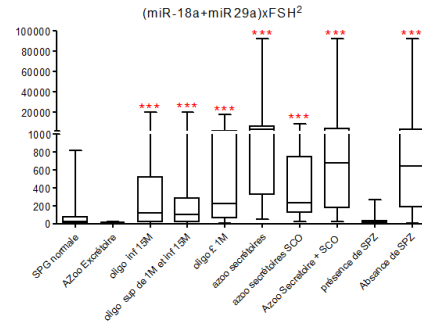
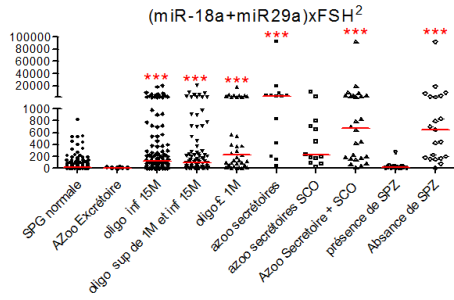


ROC de 29a 29c FSH

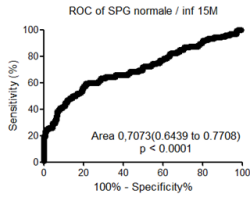


ROC de FSH

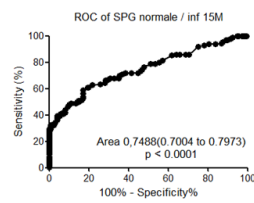




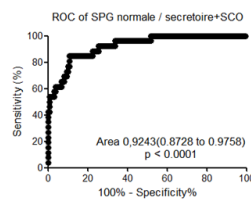
ROC de 18a 29a FSH



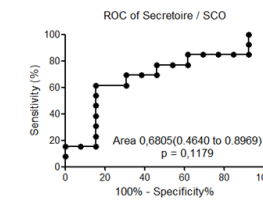
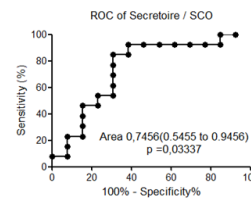
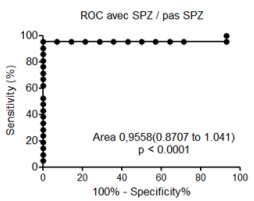
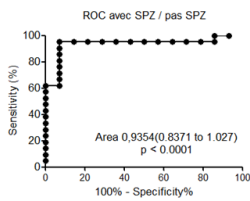
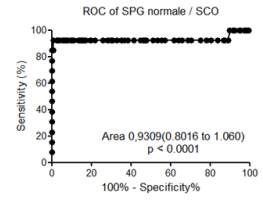
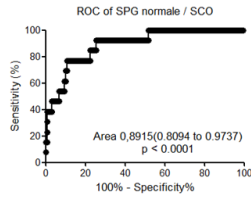
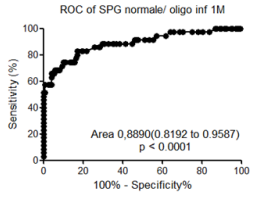
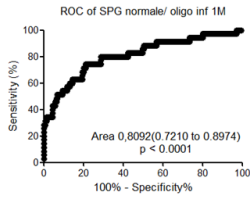
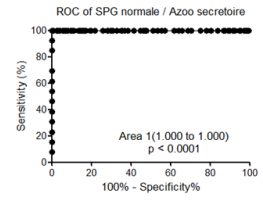
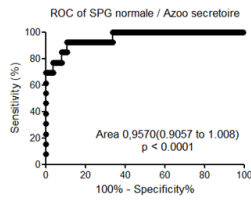
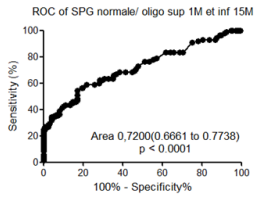
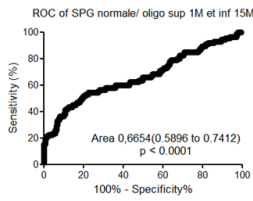
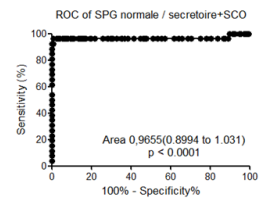
ROC de FSH



ROC de 18a 29a FSH



ROC de FSH





- **Article n°4 :**

Role of EZH2 and mir-101 in the programming of testicular germ cell death and male infertility induced by neonatal exposure to endocrine disruptors. Benazir SIDDEEK, **Nadjem LAKHDARI**, Lilia INOUBLI, Claire MAUDUIT, Mohamed BENAHMED. Publication en cours de préparation.

