



HAL
open science

Impact de deux phytocannabinoïdes, le Delta-9-Tétrahydrocannabinol et le CBD, utilisés à des fins récréatives et thérapeutiques, sur la physiologie du testicule

Juliette Dochez-Arnault

► To cite this version:

Juliette Dochez-Arnault. Impact de deux phytocannabinoïdes, le Delta-9-Tétrahydrocannabinol et le CBD, utilisés à des fins récréatives et thérapeutiques, sur la physiologie du testicule. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B054 . tel-04293702

HAL Id: tel-04293702

<https://theses.hal.science/tel-04293702v1>

Submitted on 19 Nov 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Toxicologie

Par

Juliette DOCHEZ-ARNAULT

Impact de deux phytocannabinoïdes, le Delta-9-Tetrahydrocannabinol et le CBD, utilisés à des fins récréatives et thérapeutiques, sur la physiologie du testicule

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 18 Novembre 2022

Unité de recherche : Inserm UMR_S 1085 Institut de recherche en santé, environnement et travail

Equipe : « Physiologie et physiopathologie du tractus urogénital »

Rapportrices avant soutenance :

Blandine COURBIERE Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Aix Marseille Université

Virginie ROUILLER-FABRE Professeur des Universités, Université Paris Cité

Composition du Jury :

Président : **Laurent VERNHET** Professeur des Universités – Pharmacien, Université de Rennes 1

Examineurs : **Norbert GHYSELINCK** Directeur de recherche, IGBMC Université de Strasbourg

Rapportrices : **Blandine COURBIERE** Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Aix Marseille Université
Virginie ROUILLER-FABRE Professeur des Universités, Université Paris Cité

Dir. de thèse : **Nathalie DEJUCQ-RAINSFORD** Directrice de recherche, Université Rennes 1

Co-dir. de thèse : **Aurore Gely-Pernot** Maître de conférence, Université Rennes 1

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Toxicologie

Par

Juliette DOCHEZ-ARNAULT

Impact de deux phytocannabinoïdes, le Δ^9 -THC et le CBD, utilisés à des fins récréatives et thérapeutiques, sur la physiologie du testicule

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 18 Novembre 2022

Unité de recherche : Inserm UMR_S 1085 Institut de recherche en santé, environnement et travail

Equipe : « Physiologie et physiopathologie du tractus urogénital »

Cette thèse a été préparée dans le cadre du Réseau doctoral en santé publique, animé par l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique

Rapportrices avant soutenance :

Blandine COURBIERE Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Aix Marseille Université

Virginie ROUILLER-FABRE Professeur des Universités, Université Paris Cité

Composition du Jury :

Président : **Laurent VERNHET** Professeur des Universités – Pharmacien, Université de Rennes 1

Examineur : **Norbert GHYSELINCK** Directeur de recherche, IGBMC Université de Strasbourg

Rapportrices : **Blandine COURBIERE** Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Aix Marseille Université

Virginie ROUILLER-FABRE Professeur des Universités, Université Paris Cité

Dir. de thèse : **Nathalie DEJUCQ-RAINSFORD** Directrice de recherche, Université Rennes 1

Co-dir. de thèse : **Aurore Gely-Pernot** Maître de conférence, Université Rennes 1

A Cécile Thomas et Cécile Dochez

Remerciements

En premier lieu, j'adresse mes sincères remerciements au Professeur Rouiller-Fabre et au Docteur Blandine Courbière pour avoir accepté d'être rapportrices de ce manuscrit de thèse.

Je remercie également le Professeur Laurent Vernhet et le Docteur Norbert Ghyselinck d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Un grand merci à tous les membres de ce jury pour le temps précieux qu'ils prendront pour évaluer les travaux de mon projet de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement mes deux directrices de thèse, Aurore Gely-Pernot et Nathalie Dejuçq-Rainsford de m'avoir fait confiance pour conduire ces travaux de thèse et de m'avoir encadrée et accompagnée du début à la fin de ces trois dernières années. Nathalie, merci pour les précieux apports scientifiques que tu as apportés à ces travaux, pour toutes les questions, les précisions, les propositions que tu as soulevées en réunion et qui font toute la qualité d'un projet de recherche bien mené. Aurore, merci pour ta pédagogie, le bagage et la méthode scientifique que tu m'as transmis. Merci pour ton soutien, ton accompagnement et ta disponibilité quotidienne malgré ton emploi du temps (plus que) chargé. Je vous réitère mes remerciements à toutes les deux. Il est dit que la réussite d'une thèse sur le plan personnel tient beaucoup à l'encadrement reçu par les doctorant.e.s. J'ai pu passer, grâce à vous, trois années de doctorat (presque) sereines. (Presque).

Je remercie particulièrement Nathalie Bonvallot, Jean-Jacques Lareyre et Gabriel Livera, membres de mon comité de thèse, pour leurs conseils scientifiques avisés et leur bienveillance lors de nos échanges.

J'adresse mes remerciements aux responsables du Réseau Doctoral en Santé Publique de l'EHESP de m'avoir permis de rejoindre le réseau. J'ai pu bénéficier de formations scientifiques de qualité, participer à des projets variés, et j'ai eu l'opportunité de faire de nombreuses rencontres. Je remercie également l'EHESP, financeur de mon contrat doctoral.

Enfin, je remercie les femmes donneuses, et les donneurs ainsi que leurs familles, sans qui nos recherches ne pourraient pas être menées.

Un grand merci aux membres de l'équipe 8 et aux personnes de l'IRSET que j'ai côtoyées, pour ces trois ans passés à vos côtés.

Merci à Séverine Mazaud-Guittot pour le rôle que tu as joué dans mon projet, pour avoir répondu à mes nombreuses questions existentielles sur le fonctionnement d'un testicule fœtal, pour nos échanges sur mes résultats et pour tes connaissances scientifiques sans fin sur les gonades. Christèle Desdoits-Lethimonier, merci pour ton aide précieuse sur les expérimentations du projet « testicule adulte » que tu as conduit. Merci aussi pour ton humour et ta générosité, je garderai un très bon souvenir de nos discussions pendant nos manip respectives ou les découpages d'explants testiculaires en salle de culture. Merci à Laurianne Lesné pour les coups de main, les dépannages des week-ends – changement de milieu de culture, et ta gentillesse. Je tiens également à remercier Maryne Toupin pour son implication dans les expérimentations de mon projet de thèse tout au long de ces trois années et particulièrement lors de ces derniers mois.

Je remercie chaleureusement Aurélie Lardenois et Frédéric Chalmel pour leurs analyses de nos données de transcriptomiques, malgré leur nombre considérable de projets respectifs. Merci à Bertrand Evrard pour la préparation de nos précieux échantillons de BRB-seq.

J'adresse une mention particulièrement spéciale à la Pandem'IRSET, groupe de doctorants de l'IRSET. Un grand merci, personnel cette fois, à Maryne (aka doudou, aka Marine pour ceux qui veulent perdre un bras) d'avoir accepté cette invasion de parisiennes dans ta Bretagne adorée. Tu t'es beaucoup occupé de nous pendant ces trois ans, des gâteaux d'anniversaire personnalisés pour chacun, aux cadeaux de décembre, en passant par les explications rigoureusement scientifiques de nos signes astrologiques. Promis je reviendrai vous voir toi et Mimi. Merci à Edith, une des personnes les plus drôles que je connaisse, pour tes théories obscures sur les phénomènes de la vie qui nous entourent, et tes tiroirs toujours pleins de gourmandise pour fêter les journées « avec » et rattraper les journées « sans ». Merci à Indusha, pour ton empathie et ta douceur. Entendre ton rire dans le couloir du 2^{ème} étage a illuminé mes journées. Merci à Annabelle, pour ton humour, tes conseils bd et tes recommandations pour ~~une balade~~ un marathon en vélo. On la fera cette séance découverte

en aviron !! Merci aussi à Judikaël, qui partage avec moi ce sprint de la fin de thèse, et à Gwendoline pour son optimisme et pour nous montrer qu'une thèse peut se dérouler au mieux. Obrigada Janaina, avec qui j'ai eu la chance de travailler, pour sa bonne humeur quotidienne et ses pao de queijo.

Merci aussi à celles et ceux qui ont fini leur doctorat/stage/contrat mais qui sont loin d'être oublié.e.s. Pauline, meilleure personne avec qui j'ai pu partager un bureau, merci pour nos fous rires en fin de journée et nos arrangements complexes du vendredi après-midi pour s'entraider aux changements de milieu de culture du week-end. Salomé, tu as insufflé une énergie incomparable à la Pandem'IRSET. J'ai hâte de voir où tes talents d'organisatrice et de rassemblement seront mis à contribution dans le futur. Merci pour les bonbons du soir mais pas merci pour les jeux de mots approximatifs. Merci aussi à Louis, l'homme cool par excellence, à Leïla, qui continue de nous faire rire et de prendre soin de nous de sa province costarmoricaine, Nadège, Léa, Morgane, Rémi, Aurore, et Stéphane. Merci à vous tous pour les pauses à discuter de tout et de rien, pour les serrages de coudes, et la célébration de chaque petite victoire.

Je remercie également chaleureusement tous mes ami.e.s, pour toute la vie autour de la thèse de ces trois dernières années.

Merci à mes coloc' du 16 cours Kenned' d'avoir illuminé mes soirées et mes week-ends. Merci aux « supers nanas » Pauline et Justine, présentes dès mon premier jour à Rennes, et Tregaret à Louis (on le fera ce Yaouank promis !!). On se reverra à Lannion, Paris, au Mozambique ou à Guer je n'en doute pas, ça forge une amitié les soirées burgers et les karaokés sur la Dolce Vita. Annaëlle et Hugo, dont je n'ai pas assez profité ces derniers mois, on rattrapera le temps perdu quand vous viendrez me voir au Costa Rica, ne.vous.en.faites.pas. Je remercie tout particulièrement Gurvan, pour les cocktails et les petits plats qui m'ont réchauffé le cœur. J'en profite aussi pour remercier tous les autres Rennais, Alex, Pierre, Charlie, Emilie, Léna et Baptiste, pour tous les bons moments passés avec vous.

Merci aux ami.e.s de longue date de la fac, Julie, Ruben, Maëlys et Anjoline, ainsi qu'à ceux des Lilas. Léa, merci d'être une présence réconfortante, profondément empathique et particulièrement motivante dans mon quotidien. Je pense évidemment au groupe, LE

groupe, maintenant depuis presque 10 ans : Marie, Ronan, Pierre, Réhane et Gabrielle. Merci pour les parenthèses enchantées de nos week-ends, anniversaires, et voyages. Merci pour votre soutien et votre amitié indéfectible malgré la distance.

Je remercie mes parents, Pierre et Josette, ainsi que ma sœur Camille et mon frère Simon, qui n'ont pas grand-chose à voir avec la biologie mais qui ont été et sont toujours d'un soutien inconditionnel. J'ai hâte de vous retrouver.

Enfin, merci à Hugo, pour bien plus que je pourrai le lister. Merci pour tous les gens autour de toi qui se sont retrouvés être des soutiens précieux lors de ma thèse. Merci au N302 pour les soirées, les vacances, les jeux de cartes et les barbecues de qualité. Merci aussi à la famille Pezziardi, Pierre, Bénédicte, Tom et Mila, pour votre présence et votre bienveillance.

Hugo, merci, du fond du cœur. Merci pour ton soutien, ton amour, tes attentions au quotidien, de constamment croire en moi et de toujours savoir trouver les mots justes. On aura traversé trois ans de prépa, la distance (Montréal-Nantes c'est pas rien !!), une thèse, et pourtant tu es l'un des éléments de ma vie les plus solides. Merci.

Je n'aurai pas pu être mieux entourée que pendant ces 3 années de thèse. Merci à vous tous.

Table des matières

Introduction	1
CHAPITRE I. LA FONCTION REPRODUCTIVE	3
A) Anatomie et fonction du testicule adulte	3
1. Structure du testicule adulte.....	3
1. Les tubes séminifères et la spermatogenèse	7
a) Les cellules germinales.....	7
(1) Les cellules souches spermatogoniales	9
(2) Entrée dans la spermatogenèse : la phase mitotique.....	14
(3) Les deux divisions de méiose.....	15
(4) Spermiogenèse et spermiation.....	15
b) Les cellules de Sertoli.....	19
c) Les cellules myoïdes périvitubulaires	23
2. Le tissu interstitiel et la fonction endocrine.....	25
a) Les cellules de Leydig.....	27
(1) L'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire	27
(2) La stéroïdogénèse et les rôles de la testostérone	28
(3) Les autres facteurs sécrétés	31
b) Les autres types cellulaires.....	32
B) Ontogenèse du testicule	35
1. De la gonade indifférenciée	35
2. Au testicule embryonnaire.....	37
a) Anatomie et fonction	37
(1) Les cellules de Sertoli	37
(2) Les cellules germinales.....	39
(3) Les cellules myoïdes périvitubulaires	45
(4) Les cellules de Leydig et l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire	47
(5) Les autres types cellulaires.....	50
b) Devenir des structures reproductives jusqu'à la naissance puis la puberté	52
(1) Le testicule et l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire.....	52
(2) La descente testiculaire.....	59
(3) Différenciation du tractus génital	60

C)	Effet de l'environnement sur la santé reproductive	65
1.	Exposome : exemple des perturbateurs endocriniens	65
2.	Augmentation des troubles de la santé reproductive mâle.....	68
a)	Le cancer du testicule	68
b)	Malformations congénitales : cryptorchidie et hypospadias	73
c)	La diminution de la qualité spermatique	75
3.	Le syndrome de dysgénésie testiculaire	75
a)	Hypothèse d'une origine fœtale commune des altérations reproductives	75
b)	Hypothèse d'une causalité environnementale dans l'apparition de ces troubles	77
CHAPITRE II. DES PHYTOCANNABINOÏDES AUX ENDOCANNABINOÏDES		81
A)	Description	81
1.	Taxonomie.....	81
2.	Composition	83
B)	Le système des endocannabinoïdes	87
1.	Description du système et signalisation	87
a)	Les ligands endogènes : les endocannabinoïdes	89
b)	Les récepteurs des cannabinoïdes.....	92
(1)	Les récepteurs spécifiques aux cannabinoïdes.....	92
(2)	Les récepteurs alternatifs	99
c)	Modulation du système des endocannabinoïdes.....	102
(1)	Par les phytocannabinoïdes.....	102
(2)	Par des composés synthétiques.....	103
2.	Rôles du système des ECB dans la fonction reproductive chez l'homme adulte	105
a)	Axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire	105
b)	Au niveau testiculaire	109
3.	Rôles du système des ECB au cours du développement	115
4.	Rôles du système des ECB au cours du développement testiculaire	117
C)	Consommation récréationnelle et thérapeutique du cannabis.....	119
1.	Pharmacocinétique et pharmacodynamique du cannabis	119
a)	Pharmacocinétique du CBD et du $\Delta 9$ -THC	121
(1)	Absorption et distribution du CBD et du $\Delta 9$ -THC.....	121
(2)	Métabolisme et élimination du CBD et du $\Delta 9$ -THC.....	131
b)	Pharmacodynamique du CBD et du $\Delta 9$ -THC	133
2.	Consommation récréationnelle du cannabis	137

a)	Chez l'homme adulte	137
(1)	L'incidence de la consommation de cannabis dans le monde.....	137
(2)	Les effets d'une consommation de cannabis chez l'adulte	140
b)	Le cas de la consommation chez la femme enceinte.....	140
(1)	Incidence de la consommation de cannabis chez la femme enceinte	140
(2)	Le passage materno-embryonnaire des phytocannabinoïdes.....	142
(3)	Effets d'une consommation gestationnelle de cannabis	147
3.	Utilisation thérapeutique.....	153
CHAPITRE III. LES PHYTOCANNABINOÏDES ET LES PERTURBATIONS DE LA		
FONCTION REPRODUCTIVE MALE		161
A)	Chez le fœtus.....	161
B)	Chez l'adulte	165
1.	Les perturbations endocrines de l'axe hypothalamo-hypophyso- testiculaire.....	167
a)	L'altération de la sécrétion de GnRH et des gonadotropines	167
(1)	Dans les modèles animaux	167
(2)	Chez l'homme	169
a)	L'altération de la sécrétion de testostérone	173
(1)	Chez les modèles animaux.....	173
(1)	Chez l'homme	177
2.	La diminution de la qualité spermatique	180
a)	L'altération du compte/de la concentration spermatique.....	183
(1)	Physiologie testiculaire.....	183
(2)	Chez les modèles animaux.....	188
(3)	Chez l'homme	188
b)	Altération de la morphologie des spermatozoïdes.....	190
(1)	Chez les modèles animaux.....	190
(2)	Chez l'homme	190
c)	Altération de la motilité des spermatozoïdes	191
(1)	Chez les modèles animaux.....	191
(2)	Chez l'homme	192
3.	Les effets multigénérationnels.....	194
4.	Augmentation de l'incidence du cancer testiculaire	195
5.	L'altération de la fonction sexuelle	197
Problématiques et objectifs.....		199

Résultats et discussion 203

CHAPITRE I. EFFETS DE L'EXPOSITION DU TESTICULE HUMAIN ADULTE AU Δ 9-THC ET/OU AU CBD.....205

A) Résumé.....	205
B) Matériel et méthodes	207
C) Article rédigé	209
D) Discussion et perspectives	229
1. Discussion des résultats	229
2. Les perspectives	233
a) Perspectives méthodologiques	233
(1) Origine des prélèvements.....	233
(2) Culture organotypique	234
(3) Les traitements	235
(4) Evaluation de la physiologie testiculaire	237
b) Pour aller plus loin : relation entre cannabis et TGCT	238

CHAPITRE II. CARACTERISATION DU SYSTEME DES ENDOCANNABINOIDES ET EFFETS DE L'EXPOSITION DU TESTICULE HUMAIN FŒTAL AU Δ 9-THC ET/OU AU CBD

241

A) Résumé en français.....	241
B) Matériel et méthodes	243
C) Article rédigé	245
D) Discussion et perspectives	287
1. La détection du système des ECB dans le testicule humain fœtal	287
a) Les ligands endogènes : l'AEA et le 2-AG	288
b) Les enzymes de synthèse et de dégradation des ECB	289
c) Les récepteurs des cannabinoïdes.....	291
d) Les voies de signalisation du système des ECB potentiellement impliquées dans la physiologie testiculaire humaine fœtale	294
2. Effets d'une exposition au Δ 9-THC et/ou au CBD sur le testicule humain fœtal	296
a) Effets d'une exposition d'explants testiculaires fœtaux humains au Δ 9-THC et/ou au CBD	296

(1) Les cellules de Leydig	296
(2) Les cellules de Sertoli et les gonocytes	305
(3) Le testicule entier.....	308
b) Les données pharmacocinétiques du $\Delta 9$ -THC et du CBD dans le testicule fœtal.....	312
c) Mode d'action des phytocannabinoïdes dans le testicule humain fœtal	315
d) Effets de l'âge des échantillons testiculaires.....	318
e) Conséquences potentielles des perturbations de la physiologie testiculaire observées 318	
3. Perspectives méthodologiques	321
a) Les prélèvements testiculaires fœtaux	321
b) La culture organotypique	322
c) Les traitements	324
d) Evaluation de la viabilité cellulaire	326
CHAPITRE III. EFFETS D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE <i>IN VIVO</i> AU $\Delta 9$-THC ET AU CBD SUR LA PHYSIOLOGIE TESTICULAIRE EMBRYONNAIRE CHEZ LA SOURIS ...	327
A) Matériel et méthodes	329
1. Les molécules	329
2. L'exposition des animaux et déclaration éthique.....	329
3. Dosage des endo- et des phytocannabinoïdes par chromatographie en phase liquide haut performance	330
4. Analyses histologiques et immunohistochimiques	331
5. Extraction de l'ARN et qPCR.....	332
6. Analyses statistiques.....	333
B) Résultats	333
C) Discussion.....	349
1. Les paramètres de portées.....	350
2. Les endocannabinoïdes.....	351
3. Le passage materno-embryonnaire du CBD et du THC	354
4. L'interaction entre phytocannabinoïdes et ECB.....	360
5. Les gonocytes	360
D) Perspectives.....	364
<i>Conclusion générale</i>.....	367
<i>Annexes</i>	371

<i>Liste des réalisations au cours de la thèse</i>	373
<i>Références bibliographiques</i>	381

Table des illustrations

Introduction

Figure 1 : Anatomie du testicule et de l'épididyme humain adulte

Figure 2 : Illustration des différents types cellulaires testiculaires trouvés dans une coupe transversale d'un tube séminifère humain

Figure 3 : La spermatogenèse dans le testicule humain et murin

Figure 4 : Capacité de production spermatique chez la souris et l'humain

Figure 5 : La niche des cellules souches spermatogoniales

Figure 6 : La spermatogenèse chez la souris et chez l'homme

Figure 7 : Illustration du cycle de l'épithélium séminifère chez la souris et chez l'homme

Figure 8 : L'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire

Figure 9 : Schéma de la stéroïdogénèse dans le testicule

Figure 10 : Chronologie de la différenciation de la gonade fœtale murine et humaine

Figure 11 : Chronologie de la différenciation des cellules germinales au cours du développement chez la souris et chez l'homme

Figure 12 : Les différents modèles expliquant l'origine des cellules de Leydig

Figure 13 : Les 3 phases d'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire chez l'homme

Figure 14 : La descente testiculaire chez l'homme

Figure 15 : La différenciation du tractus uro-génital

Figure 16 : Le concept d'exposome

Figure 17 : Le cancer testiculaire chez l'homme

Figure 18 : Tendances de l'incidence du cancer testiculaire dans le monde entre 1960 et 2010

Figure 19 : L'hypothèse du Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS, syndrome de dysgénésie testiculaire) proposée par le groupe de Niels Skakkebaek

Figure 20 : Cannabis sativa L

Figure 21 : Voies de synthèse de plusieurs phytocannabinoïdes de Cannabis sativa L

Figure 22 : Le système des endocannabinoïdes

Figure 23 : Schéma des deux récepteurs spécifiques aux cannabinoïdes : Cannabinoid receptor 1 et 2 et des principales voies de signalisation activées

Figure 24 : Illustration du concept « d'agonisme biaisé »

Figure 25 : Illustration du concept de modulation allostérique de récepteurs couplés aux protéines G

Figure 26 : Rôles connus du système des endocannabinoïdes sur la fonction de reproduction

Figure 27 : Expression du système des endocannabinoïdes dans le testicule humain

Figure 28 : Régulation de l'activité des spermatozoïdes par le système des endocannabinoïdes

Table 1 : Concentrations maximales (C_{max}) plasmatiques du Δ⁹-THC et du CBD chez l'homme selon la fréquence de consommation, la dose et le mode d'administration.

Figure 29 : Statut légal de la consommation récréationnelle de cannabis dans le monde

Table 2 : Effets néfastes d'une exposition gestationnelle au cannabis ou à des phytocannabinoïdes sur les fœtus chez des animaux modèles.

Figure 31 : Statut légal de la consommation thérapeutique de la plante entière de cannabis dans le monde

Table 3 : Effets néfastes d'une exposition gestationnelle à plusieurs phytocannabinoïdes sur la fonction reproductive chez des animaux modèles.

Table 4 : Effets néfastes d'une exposition au cannabis ou à des phytocannabinoïdes sur les sécrétions hormonales hypothalamiques et hypophysaires chez des modèles animaux et chez l'homme.

Table 5 : Effets néfastes d'une exposition au cannabis ou à des phytocannabinoïdes sur la sécrétion de testostérone chez des modèles animaux et chez l'homme.

Table 6 : Effets néfastes d'une exposition au cannabis ou à des phytocannabinoïdes sur la physiologie testiculaire et les paramètres spermatiques chez des modèles animaux et chez l'homme.

Figure 32 : Procédures expérimentales relatives au modèle d'explants testiculaires humains adultes ex vivo.

Résultats & discussions

Chapitre I : Effets de l'exposition du testicule humain adulte au THC et/ou au CBD

Figure 1. CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the morphology of human adult testis explants.

Figure 2. CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the secretion of testosterone by human testis in organotypic culture

Figure 3. CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the number of apoptotic cells in human adult testis explants after 48h of culture.

Figure 4. CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the number of proliferating cells in human adult testis explants.

Figure 5: CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the expression of genes specific to germ cells and Sertoli cells in human adult testis explants

Suppl. Figure 1. A longer-term exposure to CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the number of apoptotic cells in human adult testis explants

Supplementary Table 1. Primers used in RT-qPCR in human adult testis explants.

Chapitre II : Caractérisation du système des endocannabinoïdes et effets de l'exposition du testicule humain fœtal au THC et/ou au CBD

Figure 33 : Procédures expérimentales relatives au modèle d'explants testiculaires humains fœtaux ex vivo

Figure 1: Expression of synthesizing and degrading enzymes in embryonic human testis.

Figure 2: Endocannabinoids synthesis by human fetal testis.

Figure 3: Expression on cannabinoid receptors in embryonic human testis.

Figure 4: Effect of CBD and/or THC on proliferation, apoptosis and germ cell biology.

Figure 5: Effect of CBD and/or THC on Leydig cell biology.

Figure 6: Effect of CBD and/or THC on Sertoli cell biology.

Figure 7: Effect on CBD and THC alone or in mixture on the transcriptome of human fetal testis.

Table 7 : Résumé des effets d'une exposition de 72 heures d'explants testiculaires fœtaux humains au Δ^9 -THC et/ou au CBD.

Chapitre III. Effets d'une exposition gestationnelle in vivo au δ^9 -thc et au cbd sur la physiologie testiculaire embryonnaire chez la souris

Figure 34 : Procédures expérimentales relatives au modèle souris in vivo.

Figure 1: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E13.5 or E15.5 does not affect litter parameters.

Figure 2: Endocannabinoids levels are modified between E13.5 and E15.5 in mother and embryo.

Figure 3: The THC, its metabolites and the CBD are able to cross the placental barrier and reach the embryo after CBD/THC maternal exposure from E6.5 to E13.5 or E15.5.

Figure 4: CBD/THC maternal exposure from E6.5 to E13.5 does not affect endocannabinoids levels in mother or embryo.

Figure 5: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E.15.5 does not affect the morphology of embryonic testis at E15.5.

Figure 6: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E13.5 does not affect gonocytes number or proliferation.

Figure 7: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E15.5 increases gonocytes proliferation at E15.5.

Figure 8: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E13.5 or E15.5 affects the expression of gene involved germ cell differentiation and in cell proliferation.

Table des annexes

Annexe 1 : Poster présenté au European Testis Workshop 2021

Annexe 2 : Diapositives présentées lors du séminaire interdisciplinaire organisé avec les doctorants membre du Réseau doctoral en santé publique

Annexe 3 : Tableau récapitulant les formations suivies au cours du doctorat de l'école doctorale Biologie-Santé de l'Université de Rennes 1

Annexe 4 : Tableau récapitulant les formations suivies au cours du doctorat de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique

Table des abréviations

A

2-AG : 2-arachidonoylglycerol
2-OG : 2-oleolglycerol
7-COOH-CBD : 7-carboxy-cannabidiol
7-OH-CBD : 7-hydroxy-cannabidiol
8 α -OH- Δ 9-THC : 8 α -hydroxy- Δ 9-THC
8 β -OH- Δ 9-THC : 8 β -hydroxy- Δ 9-THC
11-COOH- Δ 9-THC : 11-carboxy- Δ 9-THC
11-nor- Δ 9-THC-COOH : nor- Δ 9-THC-carboxylic acid
11-OH- Δ 9-THC : 11-hydroxy- Δ 9-THC
 Δ 9-THC : (-)- Δ 9-trans-tetrahydrocannabinol
 Δ 8-THC : (-)- Δ 8-trans-tetrahydrocannabinol
 A_{al} : spermatogonies de type $A_{aligned}$
 A_d : spermatogonies de type A_{dark}
 A_p : spermatogonies de type A_{pale}
 A_{pr} : spermatogonies de type A_{paired}
 A_s : spermatogonies de type A_{single}
AA : Acide arachidonique
ABHD2 : α/β -hydrolase domain containing 2
ABHD4 : α/β -hydrolase domain-containing 4
ABHD6 : α/β -hydrolase domain-containing 6
ABHD12 : α/β -hydrolase domain-containing 12
ABRAXAS1 : Abraxas 1, BRCA1 A complex subunit
AC : Adenylate cyclase
ACEA : Arachidonyl-2'-chloroethylamide
ACPA : arachidonylcyclopropylamide
ACTB : Actin beta

ADN : Acide désoxyribonucléique
AEA : Anandamide
ALC : Adult Leydig cell (cellule de Leydig adulte)
ALOX5 : 5-lipoxygénase
ALOX12 : 12-lipoxygénase
ALOX15 : 15-lipoxygénase
AMH : Anti-Müllerian hormone (hormone anti-Müllerienne)
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
APC : Anaphase promoting complex
AR : Androgen receptor (récepteur aux androgènes)
ATP : Adénosine tri-phosphate
ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

B

BHT : Barrière hémato-testiculaire
BIRC5 : Baculoviral IAP repeat containing 5
BRB-seq : Bulk RNA barcoding and sequencing
BrDU : Bromodeoxyuridine

C

CB1 : Cannabinoid receptor 1
CB2 : Cannabinoid receptor 2

CBC : Cannabichromene
CBD : Cannabidiol
CBE : Cannabielsoin
CBG : Cannabigerol
CBL : Cannabicyclol
CBN : Cannabinol
CBND : Cannabinodiol
CBT : Cannabitriol
CCND3 : Cyclin D3
CDKN1D : Cyclin dependent kinase inhibitor 1B
CIS : Carcinome *in situ*
Cmax : Concentration maximale
CMP : Cellule myoïde péritybulaire
COVID19 : Coronavirus disease 19
COX-2 : Cyclooxygenase-2
CRIP1a : Cannabinoid receptor interacting protein 1a
CSF-1 : Colony-stimulating factor-1
CSS : Cellule souche spermatogoniale
CXCL8 : C-X-C motif chemokine ligand 8
CYP1A1 : Cytochrome P450, family 1, subfamily 1, member 1
CYP1A2 : Cytochrome P450, family 1, subfamily A, member 2
CYP2C9 : Cytochrome P450, family 2, subfamily C, member 9
CYP2C19 : Cytochrome P450, family 2, subfamily C, member 19
CYP2D6 : Cytochrome P450, family 2, subfamily D, member 6
CYP2E1 : Cytochrome P450, family 2, subfamily E, member 1
CYP3A4 : Cytochrome P450, family 3, subfamily A, member 4

CYP3A5 : Cytochrome P450, family 3, subfamily A, member 5
CYP3A7 : Cytochrome P450, family 3, subfamily A, member 7
CYP4F2 : Cytochrome P450, family 4, subfamily F, member 2
CYP4X1 : Cytochrome P450, family 4, subfamily X, member 1
CYP17A1 : Cytochrome P450, family 17, subfamily A, member 1
CYP26B1 : Cytochrome P450, family 26, subfamily B, member 1
CYP450 : Cytochrome P450

D

DAG : diacylglycérol
DAGL α : diacylglycerol lipase α
DAGL β : diacylglycerol lipase β
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DCLRE1C : DNA cross-link repair 1C
DDIT3 : DNA damage inducible transcript 3
DDX4 : DEAD-box helicase 4
DHEA : Docosahexanoylethanolamide
DHT : 5 α -dihydrotestosterone
DMRT1 : Doublesex and mab-3 related transcription factor 1
DMSO : Dimethylsulfoxyde
DOHAD : Developmental origins of health and disease (origines développementales de la santé et des maladies)
DSD : Disorder of sex development (désordres du développement sexuel)

E

E : Jour embryonnaire

ECB : Endocannabinoïde

EMT : Endocannabinoid membrane transporter

EPEA : Eicosapentatenoylethanolamide

ERK 1/2 : Extracellular signal regulated kinase-1 et 2

ETOH : Ethanol

F

FAAH : Fatty acid amide hydrolase

FAAH2 : Fatty acid amide hydrolase 2

FANCD2 : Fanconi anemia group D2 protein

FBOX5 : F-Box protein 5

FEGA : Fetal gonad assay

FGF2 : Fibroblast growth factor 2

FGF9 : Fibroblast growth factor 9

FLC : Fetal Leydig cell (cellule de Leydig foétale)

FSH : Follicle-stimulating hormone

FTL : Ferritin light chain

G

GASP1 : G protein-coupled receptor associated sorting protein 1

GCNIS : Germ cell neoplasia in situ

GDE1 : glycerophosphodiester phosphodiesterase 1

GDNF : Glial cell-derived neurotrophic factor

GINS3 : GINS complex subunit 3

GnRH : Gonadotropin-releasing hormone

GPR18 : G protein-coupled receptor 18

GPR55 : G protein-coupled receptor 55

GPR119 : G protein-coupled receptor 119

GRK : G protein receptor kinases

GST : Glutathione S-transferase

H

hCG : Human chorionic gonadotropin

HHT : Axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire

HMCGR : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase

HPLC : High performance liquid chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance)

I

IGCNU : Intratubular germ cell neoplasia, unclassified

IGF1 : Insulin-like growth factor 1

IL : Interleukines

INSL3 : Insulin-like factor 3

IVG : Interruption volontaire de grossesse

J

JPN : Jour post-natal

L

LDLR : Low density lipoprotein receptor

LEA : Linolcoylethanamide

LH : Luteinizing hormone

LIF : Leukemia inhibitory factor

LIN28 : Lin-28 Homolog A

Lyso-PLC : 2-lyso-phospholipase C

Lyso-PLD : 2-lyso-phospholipase D

M

MAGEA4 : MAGE family member A4

MAGL : Monoacylglycerol lipase

MALDI : Matrix assisted laser desorption ionisation, désorption-ionisation laser assistée par matrice

MAPK : Mitogen-activated proteins kinases

MIS : Müllerian inhibiting substance

NA²⁺ : ion sodium

N

NAE : N-acylethanolamine

NAPE : N-acylphosphatidylethanolamine phospholipid

NAPE-PLD : N-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D-type

NAT10 : N-acyltransferase 10

NANOG : Homeobox NANOG

NANOS2 : Nanos homolog 2

NANOS3 : Nanos homolog 3

NODAL : Nodal growth differentiation factor

O

OEA : Olcoylethanolamide

OFDT : Observatoire français des drogues et des tendances addictives

OMS : Organisation mondiale de la santé

P

PBPK : Physiologically based pharmacokinetic

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

PDG2 : Prostaglandin D2

PE : Perturbateur endocrinien

PEA : Palmitoylethanolamide

PGC : Primordial germ cells (cellules germinales primordiales)

PIP2₂ : 2-arachinoyl-phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

PLA1 : Phospholipase A1

PLA2 : Phospholipase A2

PLAP : Placental-like alkaline phosphatase

PLC : Phospholipase C

PLCβ : Phospholipase C β

P-Mod-S : Peritubular factors that modulate Sertoli cell function

POUF51 : POU class 5 homeobox 1

PPAR : Proliferator-activated receptor

PRDM1 : PR/SET domain 1

PTPN22 : Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22

Q

qPCR : Quantitative polymerase chain reaction

R

RA : Retinoic acid (acide rétinoïque)

Rb : Retinoblastome

RB1 : RB transcriptional corepressor 1

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

REC8 : Meiotic recombination protein REC8 homolog

ROS : Reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène

RNA-seq : RNA sequencing

RPLP0 : Ribosomal protein lateral stalk subunit P0

RXFP2 : Relaxin-family peptide receptor 2

S

SARS-COV-2 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SCF : Stem cell factor

SD : Semaine de développement

SEA : Stearoylethanolamide

SGIP1 : SH3GL interacting endocytic adaptor 1

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SOX9 : Sry-related HMG box9

SOX17 : Sry-related HMG box17

SPC24 : Kinetochores protein Spc24

SRY : Sex determining region of the Y chromosome

STAR : Steroidogenic acute regulatory protein

STRA8 : Stimulated by retinoic acid gene 8 protein homolog

SYCP3 : Synaptonomal complex protein 3

T

TDS : Testicular dysgenesis syndrome (syndrome de dysgénésie testiculaire)

TEXAS : Testicular explants assay

TFAP2C : Transcription factor AP-2 gamma

TGCT : Testicular germ cell tumor (tumeur testiculaire des cellules germinales)

TGFβ : Transforming growth factor β

THC : Δ9-THC, (-)-Δ9-trans-tetrahydrocannabinol

TOH : 11-OH-Δ9-THC, 11-hydroxy-Δ9-THC

TCOOH : 11-COOH-Δ9-THC, 11-carboxy-Δ9-THC

TP53 : Tumeur protein p53

TRP : Transient receptor potential

TRPA : Transient receptor potential ankyrin

TRPM : Transient receptor potential melastin

TRPV : Transient receptor potential vanilloid

TSPY : Testis-specific protein Y-encoded

U

UGT : Uridine 5'-
diphosphoglucuronosyltransferase

USA : United States of America, Etats-Unis
d'Amérique

V

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Z

ZO1 : Tight junction protein ZO-1

Avant-propos

En France et dans le monde, les débats s'intensifient sur la légalisation du cannabis pour un usage récréationnel mais également thérapeutique. L'usage du cannabis étant suspecté d'induire des perturbations de plusieurs fonctions physiologiques, dont la fonction reproductive, l'augmentation de sa consommation dans le monde en fait désormais un enjeu de santé publique majeur. Si les données expérimentales et épidémiologiques s'accumulent ces 60 dernières années, montrant les perturbations au niveau central et gonadique que peut entraîner une exposition au cannabis chez l'homme adulte, force est de constater que les mécanismes d'action des composants du cannabis sur la fonction reproductive sont encore peu connus. Le cannabis étant la drogue la plus consommée chez la femme enceinte, évaluer les effets potentiels de son exposition sur le testicule humain foetal est également capital.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'évaluer si l'exposition à deux composants principaux du cannabis, le (-)- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) et le cannabidiol (CBD) également utilisés en thérapie, pouvait affecter les fonctions testiculaires pendant la vie foetale ou à l'âge adulte. En utilisant des modèles d'étude *ex* et *in vivo*, ce travail de recherche permet de participer à la description des effets du cannabis sur la santé reproductive des hommes à différents moments de la vie.

Ce manuscrit débute par une revue de la littérature divisée selon 3 chapitres. Après une description des hypothèses et objectifs principaux de la thèse, la suite du manuscrit sera consacrée aux résultats, à la discussion et aux perspectives respectives des 3 travaux expérimentaux mis en œuvre au cours de cette thèse.

Au cours du chapitre I, sont présentés les effets sur la physiologie testiculaire d'une exposition du testicule adulte humain à du Δ^9 -THC et du CBD dans un modèle de culture organotypique. Le chapitre II est consacré aux résultats observés lors de notre étude sur le testicule humain foetal. Dans un premier temps, l'expression des composants du système des ECB est décrite. Les impacts sur la physiologie testiculaire d'une exposition du testicule foetal humain au Δ^9 -THC et au CBD, dans un modèle de culture organotypique, sont ensuite caractérisés et discutés. Pour compléter nos résultats obtenus sur le testicule humain foetal,

nous avons utilisé un modèle de souris pour attester des effets d'une exposition gestationnelle *in vivo* à du Δ^9 -THC et du CBD sur le développement testiculaire. Ces données seront présentées lors du chapitre III.

Enfin, une conclusion globale reviendra sur les résultats principaux de la thèse. Les données présentées dans ce manuscrit contribuent à la connaissance scientifique des impacts de molécules présentes dans l'environnement sur la santé reproductive masculine.

Introduction

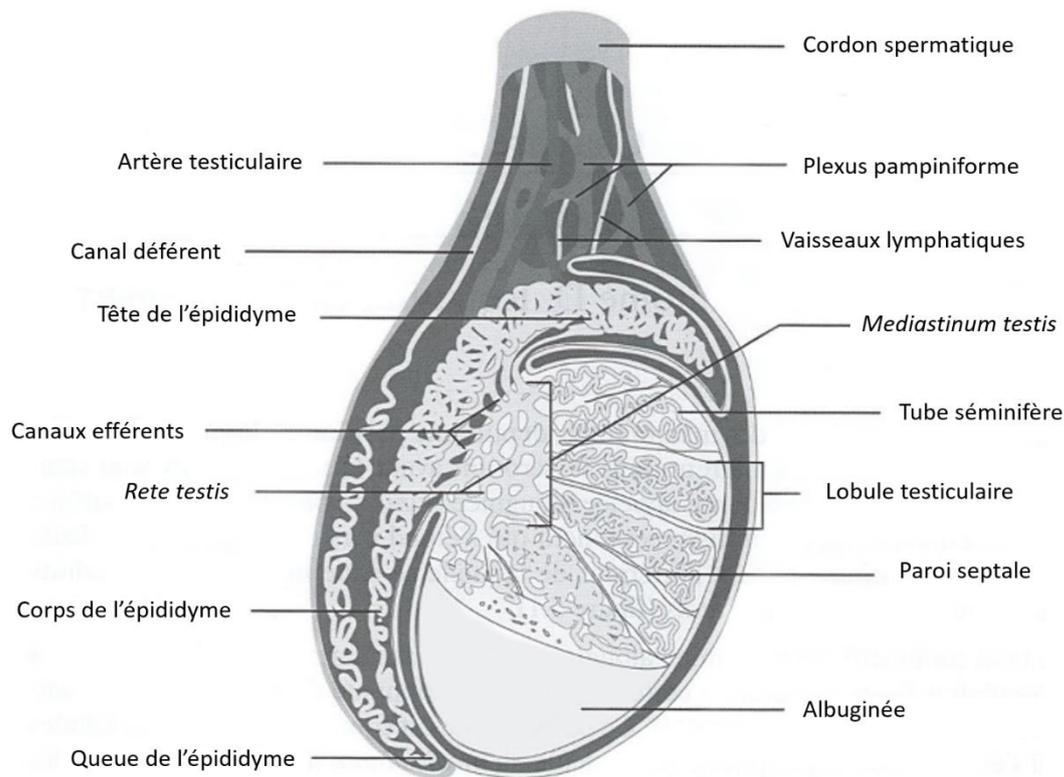


Figure 1 : Anatomie du testicule et de l'épididyme humain adulte (tiré de Saint-Dizier and Chastant-Maillard, 2014).

Enveloppé par l'albuginée, le testicule est constitué de lobules testiculaires, délimités par des parois septales. Chaque lobule comprend de nombreux tubes séminifères, qui débouchent dans le *rete testis*. Les canaux efférents relient ensuite le *rete testis* à l'épididyme, qui se prolonge par le canal déférent. Le *rete testis*, ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques, plongent dans le testicule au niveau du *mediastinum testis*, qui présente un épaissement de l'albuginée. Le plexus pampiniforme est l'ensemble de veines sortantes du testicule. Il entoure l'artère testiculaire au niveau du cordon spermatique.

CHAPITRE I. LA FONCTION REPRODUCTIVE

La fonction reproductive du testicule repose d'une part sur sa capacité à produire des spermatozoïdes capables de féconder l'ovocyte (après maturation dans l'épididyme et les voies génitales femelles), et d'autre part à sécréter des hormones et d'autres facteurs assurant son homéostasie (Saint-Dizier and Chastant-Maillard, 2014).

La fonctionnalité du testicule adulte repose en partie sur le bon déroulement de son développement et de sa différenciation au cours de la vie fœtale. Des perturbations *in utero* lors de la mise en place des fonctions testiculaires, peuvent se traduire par des troubles de la fonction de reproduction chez l'individu plus tard au cours de sa vie (Rey and Grinspon, 2011).

Dans ce premier chapitre, j'aborderai l'anatomie puis l'ontogénèse testiculaire des 2 espèces étudiées au cours du projet de thèse : l'homme et la souris. Je m'attarderai ensuite sur les expositions environnementales et leurs conséquences sur la santé reproductive mâle.

A) Anatomie et fonction du testicule adulte

Tout comme la prostate, l'épididyme et les vésicules séminales, les gonades mâles, ou testicules, appartiennent à l'appareil reproducteur masculin (Clement and Giuliano, 2015).

1. Structure du testicule adulte

Situés dans le scrotum à l'extérieur du pelvis, chaque testicule est recouvert de trois enveloppes, la plus intérieure étant l'albuginée (Titi-Lartey and Khan, 2022; Tiwana and Leslie, 2022) (**Figure 1**). La surface interne de cette dernière, composée de tissu conjonctif et de fibres musculaires, plonge dans le testicule pour former des parois septales, qui délimitent des lobules. Au sein des lobules, sont trouvés les tubes séminifères. Les tubes

séminifères sont séparés par un tissu conjonctif appelé le tissu interstitiel. Ils radient vers une structure appelée le *rete testis*, lui-même relié à l'épididyme via les canaux efférents.

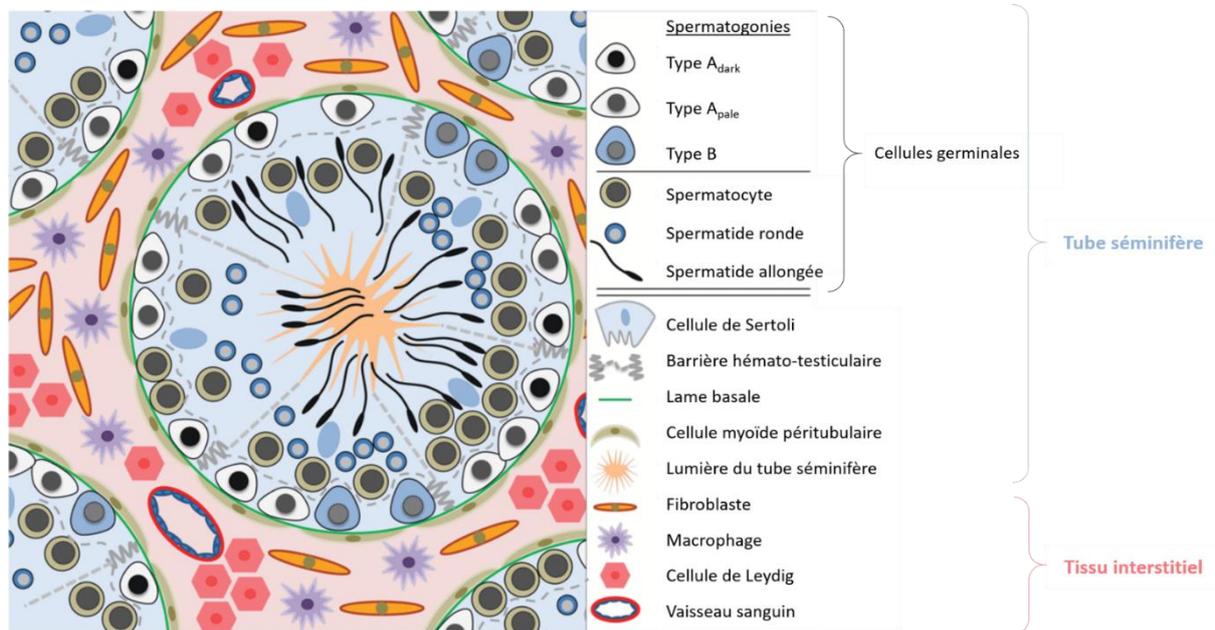


Figure 2: Illustration des différents types cellulaires testiculaires trouvés dans une coupe transversale d'un tube séminifère humain (tiré de Mäkelä and Toppari, 2017).

On distingue deux compartiments dans le testicule : les tubes séminifères et le tissu interstitiel, séparés par une lame basale. Les tubes séminifères comportent les cellules de Sertoli, les cellules myoïdes péri-tubulaires et les cellules germinales à différents stades de différenciation. Les cellules germinales les plus différenciées sont libérées dans la lumière du tube séminifère, située en son centre. La barrière hémato-testiculaire cloisonne le tube séminifère de façon physique et moléculaire en différents micro-environnements spécifiques. Les fibroblastes, les cellules immunitaires dont les macrophages, les cellules des vaisseaux sanguins (et lymphatiques) ainsi que les cellules de Leydig sont situés dans le tissu interstitiel.

L'épididyme, composé d'une tête, d'un corps et d'une queue, se prolonge par le canal déférent qui lui quitte le scrotum pour rejoindre les autres organes de l'appareil reproducteur (Sullivan et al., 2019). L'épididyme permet la maturation des spermatozoïdes produits dans le testicule notamment l'acquisition de leur motilité et leur capacité à féconder ultérieurement l'ovocyte. Il permet également leur stockage et leur survie avant l'éjaculation.

Bien que l'architecture globale du testicule soit très similaire au sein des mammifères, les particularités du testicule humain et murin seront décrites tout au long des paragraphes suivants.

Au sein du testicule, on peut schématiquement distinguer de façon morphologique et fonctionnelle, deux compartiments, correspondants aux deux fonctions testiculaires majeures (**Figure 2**). La première, dite endocrine, est la production d'hormones, principalement d'androgènes. Elle est assurée par les cellules de Leydig, situées dans le tissu interstitiel. La deuxième fonction, dite exocrine, est la production par un processus appelé spermatogenèse de spermatozoïdes capables de féconder un ovocyte (après maturation dans l'épididyme et les voies génitales femelles). Elle prend place dans les tubes séminifères. Bien que distincts sur le plan histologique, les deux compartiments sont étroitement interdépendants. Un dialogue moléculaire via des sécrétions paracrines ainsi qu'une architecture morphologique précise sont nécessaires pour garantir l'homéostasie du tissu testiculaire et assurer la fonction de reproduction.

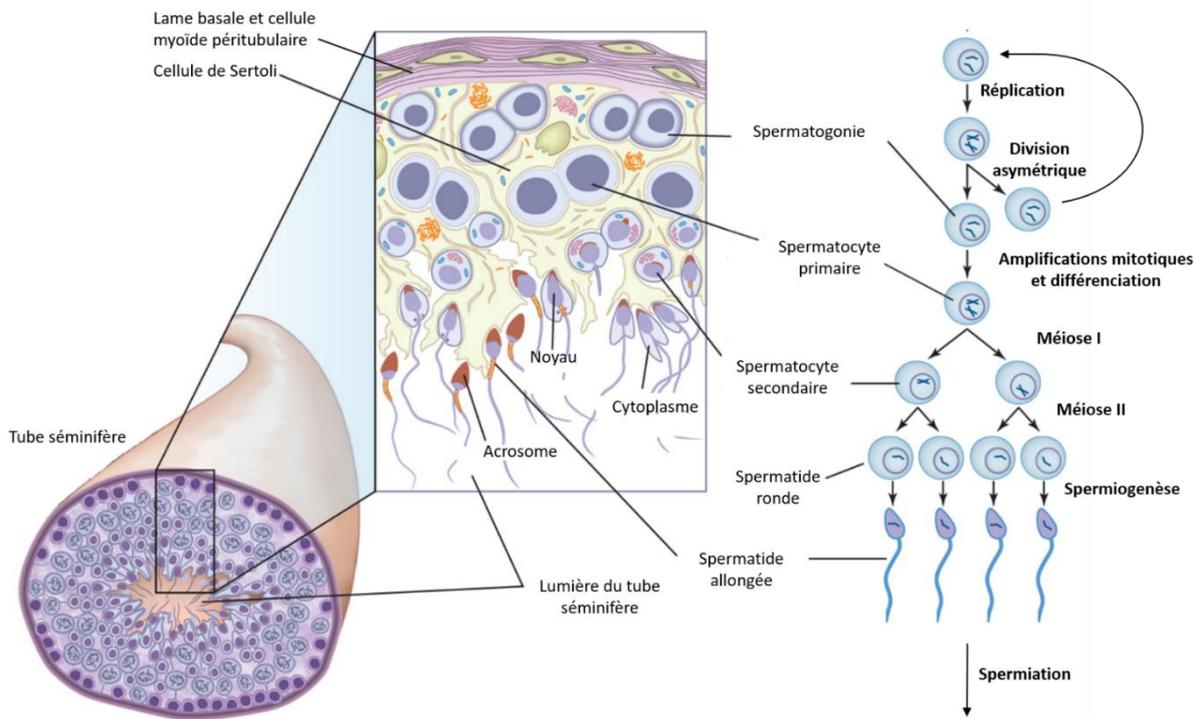


Figure 3 : La spermatogénèse dans le testicule humain et murin (modifié à partir de Encyclopaedia Britannica, 2013).

La spermatogénèse est un processus polarisé, débutant avec les spermatogonies localisées le long de la lame basale et se dirigeant vers la lumière du tube. Les cellules de Sertoli enserrant les cellules germinales à toutes les étapes de la spermatogénèse jusqu'à la libération des spermatozoïdes allongés dans la lumière du tube.

1. Les tubes séminifères et la spermatogenèse

Les tubes séminifères contiennent trois types cellulaires : les cellules germinales, les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes pérیتubulaires (CMP). C'est dans ce compartiment, dit aussi « intra-tubulaire », que se déroule la spermatogenèse des cellules germinales.

a) Les cellules germinales

La spermatogenèse est l'ensemble des processus aboutissant à la formation de spermatozoïdes à partir de cellules germinales indifférenciées, appelées spermatogonies indifférenciées. C'est un processus hautement polarisé, débutant avec les spermatogonies situées au niveau de la membrane basale du tube séminifère et étant dirigé vers sa lumière (**Figure 3**).

Ce processus physiologique se divise en trois grandes étapes (Auger, 2018) (**Figure 3**) :

- la phase mitotique, qui correspond à une phase d'amplification des spermatogonies par des divisions mitotiques successives et à leur différenciation jusqu'au stade spermatocyte primaire,
- la phase méiotique, qui résulte en la formation de spermatides rondes haploïdes,
- la spermiogénèse, qui correspond à la phase de maturation des spermatides rondes en spermatides allongées, ensuite libérées dans la lumière par un processus appelé spermiation.

Enfin les spermatides allongées rejoignent les canaux efférents puis l'épididyme où elles subissent plusieurs modifications et sont stockées : on les appelle des spermatozoïdes.

Si les processus généraux de la spermatogenèse sont communs chez les mammifères, des différences existent entre le testicule murin et humain, en particulier lors de la phase mitotique (Singh et al., 2011; Fayomi and Orwig, 2018).

(1) Les cellules souches spermatogoniales

Chez l'homme et la souris, la production de spermatozoïdes débute à la puberté et perdure tout au long de la vie de l'individu mâle. Cette capacité de fertilité pérenne est permise par l'existence des cellules souches spermatogoniales (CSS), une population de spermatogonies spécifiques très indifférenciées, qui constituent un stock de cellules souches germinales mâles. La caractéristique majeure d'une cellule souche est sa capacité à se diviser de manière asymétrique. Ainsi, la division d'une SSC donne d'une part une cellule fille, permettant de maintenir le stock de cellules souches, et d'autre part une cellule plus engagée dans la différenciation, appelée cellule « progénitrice » qui poursuivra la spermatogenèse.

Chez la souris, on retrouve 3 populations de spermatogonies dites « indifférenciées » : les spermatogonies A_{single} (A_s), les spermatogonies A_{paired} (ou A_{pr}) et les spermatogonies A_{aligned} (ou A_{al}) (Yoshida, 2008; Phillips et al., 2010; Mäkelä and Hobbs, 2019). Il a été mis en évidence qu'une sous population de spermatogonies A_s correspondent aux cellules souches spermatogoniales (Nakagawa et al., 2007; Suzuki et al., 2009; Phillips et al., 2010; de Rooij and Griswold, 2012). Il a également été montré que les spermatogonies de type A_{pr} et A_{al} pouvaient également remplir ce rôle dans des conditions précises (Nakagawa et al., 2010). Chez l'homme, les spermatogonies A_{dark} (A_d) et A_{pale} (A_p) constituent les spermatogonies indifférenciées (Clermont, 1966; Shalet, 2009; Sharma and Agarwal, 2013; Mäkelä and Toppari, 2017; Fayomi and Orwig, 2018). Ces deux types cellulaires possèdent les caractéristiques des SSC. Il est admis que les spermatogonies de type A_p forment une population de cellules souches prolifératives tandis que les spermatogonies A_d constituent une réserve latente de cellules souches (Clermont, 1969; Schulze, 1979; Ehmcke and Schlatt, 2006). Cellules peu ou pas mitotiques en conditions testiculaires normales, les spermatogonies de type A_d s'activeraient en réponse à une déplétion trop importante des spermatogonies (Hermann et al., 2010; Mäkelä and Toppari, 2017; Fayomi and Orwig, 2018). Au contraire, les cellules A_p permettraient l'auto-renouvellement actif, donc le renouvellement continu de leur stock.

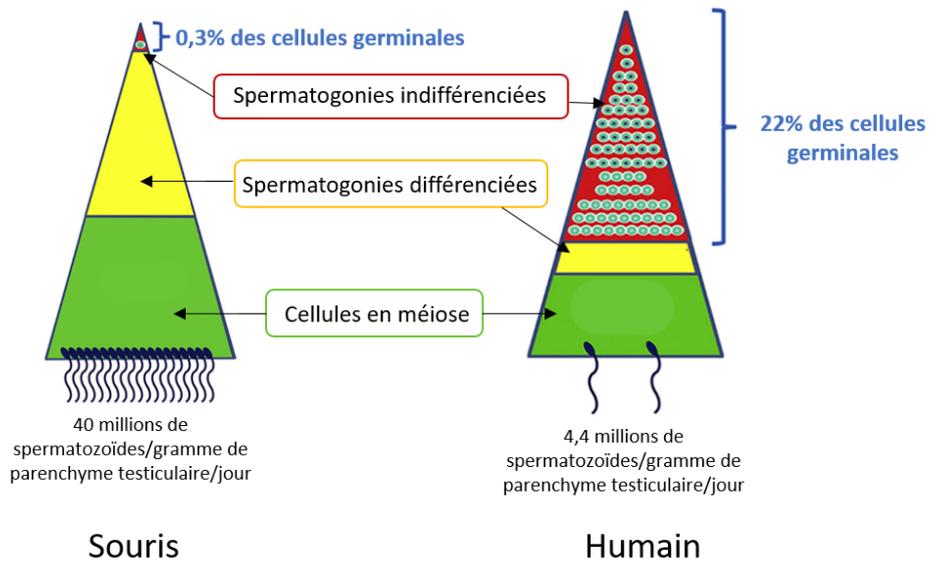


Figure 4 : Capacité de production spermatique chez la souris et l'humain (modifié à partir de Fayomi and Orwig, 2018).

Le testicule murin compte moins de spermatogonies indifférenciées que l'humain mais la spermatogenèse faisant intervenir un plus grand nombre de divisions mitotiques, produit plus de spermatozoïdes chez la souris.

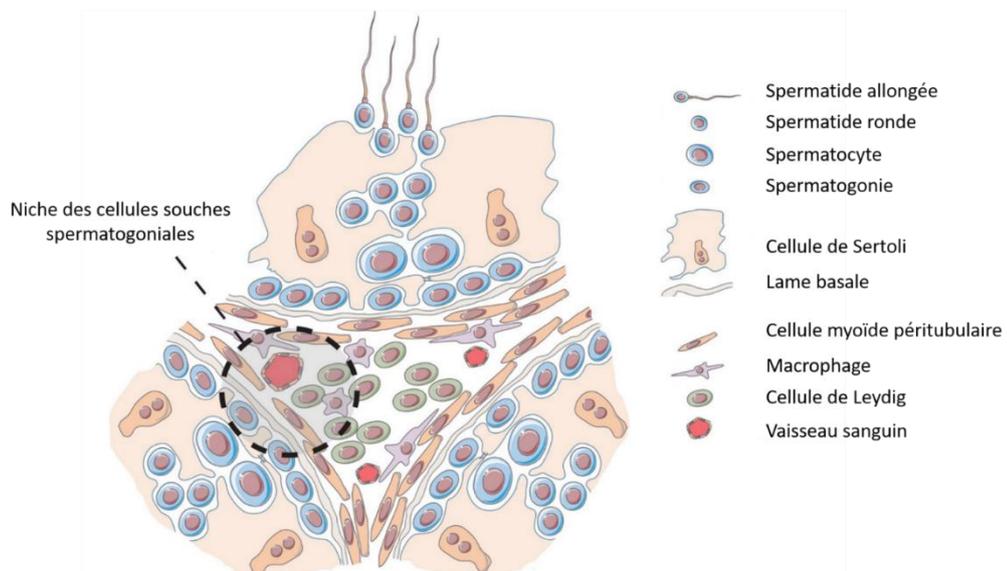


Figure 5 : La niche des cellules souches spermatogoniales (SSC) (modifié à partir de Oliver and Stukenborg, 2020).

La niche des SSC est indispensable à leur maintien dans un état indifférencié et régule leur entrée en différenciation. Elle est créée à partir de signaux de plusieurs types cellulaires environnants.

Le testicule de souris adulte comporte relativement peu de spermatogonies indifférenciées, les spermatogonies A_s , A_{pr} et A_{al} représentant 0,3% des cellules germinales totales (Oakberg, 1971), alors que les spermatogonies A_d et A_p représentent 22% des cellules germinales totales dans le testicule humain adulte (Paniagua et al., 1987). Cependant, grâce aux plus nombreuses amplifications mitotiques par cycle de spermatogenèse, le testicule murin produira une quantité plus importante de spermatozoïdes (Fayomi and Orwig, 2018) **(Figure 4)**.

Dans les deux espèces, le caractère indifférencié et la capacité d'auto-renouvellement sont des propriétés essentielles pour le maintien des CSS. Elles nécessitent un micro-environnement spécialisé appelé « niche », leur fournissant des signaux chimiques et structuraux (Morrison and Spradling, 2008) **(Figure 5)**. Cette niche permet le maintien d'une population cellulaire souche indifférenciée et gère la balance entre auto-renouvellement et différenciation. Elle est en partie créée par l'influence des cellules adjacentes aux CSS comme les cellules de Sertoli, des CMP, des cellules de Leydig et des vaisseaux sanguins à proximité (de Rooij, 2015; Potter and DeFalco, 2017).

Notamment, les cellules de Sertoli sont responsables de la sécrétion de facteurs clés pour maintenir des CSS capables d'auto-renouvellement et indifférenciées. Parmi eux, on peut citer les facteurs *Glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF) (Meng et al., 2000), également sécrété par les CMP, et le *Fibroblast growth factor 2* (FGF2) (Ishii et al., 2012). Les sécrétions d'autres cellules somatiques testiculaires sont essentielles au maintien des CSS (Zhou et al., 2019), comme le *Colony-simulating factor-1* (CSF-1), sécrété par les cellules de Leydig et les cellules CMP (Oatley et al., 2009) ou encore le *Leukemia inhibitory factor* (LIF) sécrété par les CMP (Piquet-Pellorce et al., 2000).

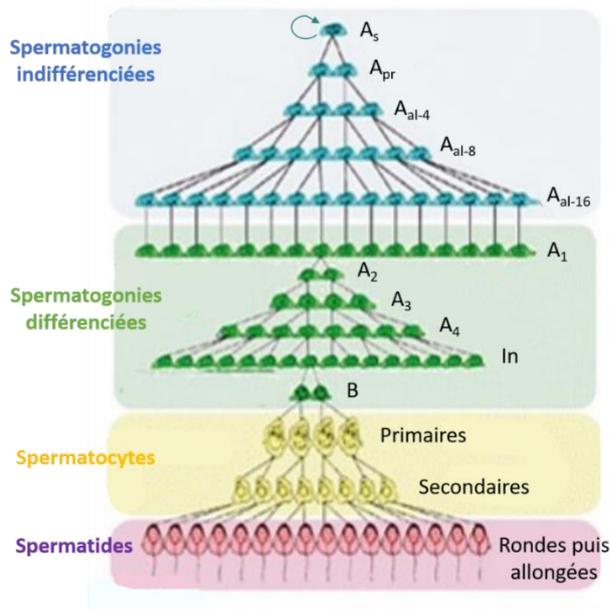
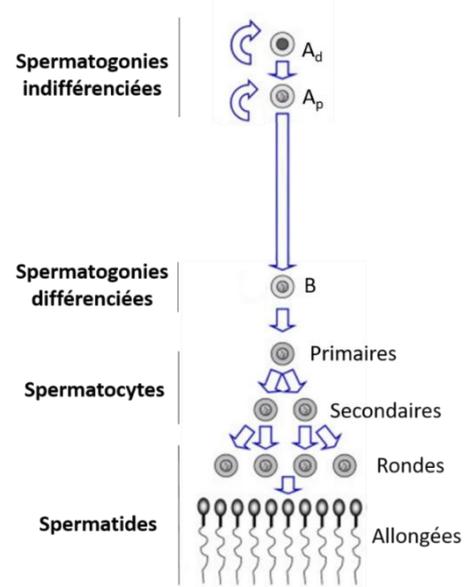
(A)**(B)**

Figure 6 : La spermatogenèse chez la souris (A) (modifié à partir de Yoshida, 2010) et chez l'homme (B) (modifié à partir de Ivell, 2007).

Chez la souris et l'homme, la spermatogenèse débute par l'engagement d'une spermatogonie indifférenciée (majoritairement les spermatogonies A_s pour A_{single} chez la souris, et les spermatogonies A_d pour A_{dark} chez l'homme) dans la spermatogenèse. Ces cellules se divisent de manière asymétrique pour assurer d'une part d'auto-renouvellement (indiqué par les flèches arrondies) et d'autre part générer des spermatogonies progénitrices, plus engagées dans la spermatogenèse (A_{pr} pour A_{paired} chez la souris, A_p pour A_{pale} chez l'homme). Chez la souris, il existe un plus grand nombre de précurseurs intermédiaires qui se divisent et se différencient jusqu'à la spermatogonie de type B (A_{al} pour $A_{aligned}$ à 4, 8 ou 16 cellules, $A_1 \rightarrow A_4$, In pour intermédiaire) contrairement à l'homme. Dans les 2 espèces, les spermatogonies de types B se différencient en spermatocytes primaires qui s'engagent dans les divisions de méiose, aboutissant à l'apparition des spermatocytes secondaires, puis des spermatides rondes.

(2) Entrée dans la spermatogenèse : la phase mitotique

Chez la souris, la division des spermatogonies A_s génère des spermatogonies A_{pr} (Hess and Renato de Franca, 2008; Phillips et al., 2010; Griswold, 2016) (**Figure 6A**). Les deux spermatogonies A_{pr} subiront ensuite des mitoses successives, formant des chaînes de 4, 8, 16 et plus rarement de 32 spermatogonies de type A_{al} . Lors de ces divisions, la cytokinèse n'est pas complète et les cellules restent liées entre elles par des ponts cytoplasmiques (Greenbaum et al., 2011). Ces derniers permettent la synchronisation de la maturation des cellules issues d'une même spermatogonie de type A_s , via une architecture cellulaire spécifique et un échange de facteurs paracrines. Les spermatogonies de type A_{al} se différencient ensuite en spermatogonies de type A1, irrémédiablement engagées dans la spermatogenèse. L'amplification mitotique se poursuit par les divisions successives des spermatogonies de type A1, donnant les spermatogonies de type A2, A3, A4, les spermatogonies de type intermédiaire et enfin les spermatogonies de type B. Les spermatogonies de type A1 à B sont dites spermatogonies « différenciées ».

Chez l'homme, il n'existe pas autant de cellules progénitrices intermédiaires. Ainsi, la division d'une spermatogonie A_p (et plus rarement A_d) entraîne l'apparition de spermatogonies de type B (Shalet, 2009; Sharma and Agarwal, 2013; Mäkelä and Toppari, 2017) (**Figure 6B**). Chez l'homme aussi les cellules restent connectées par des ponts cytoplasmiques pour permettre la synchronisation des différentes vagues de différenciation germinale (Greenbaum et al., 2011).

La sortie de l'état indifférencié et l'entrée dans la spermatogenèse sont régulées finement via des facteurs clés endocrines et paracrines. Parmi les facteurs endocrines, on peut citer les deux hormones clés de l'axe hypothalamo-hypophysio-testiculaire (HHT) (détaillées dans le paragraphe détaillé aux cellules de Leydig de ce chapitre) : la *Luteinizing hormone* (LH) et la *Follicle-stimulating hormone* (FSH) (Ramaswamy and Weinbauer, 2014). Elles jouent un rôle capital dans la spermatogenèse, non pas directement sur les cellules germinales, mais via les cellules somatiques environnantes. Parmi les facteurs paracrines, le *Stem cell factor* (SCF) sécrété par les cellules de Sertoli permettent la survie et la prolifération des spermatogonies en différenciation via son récepteur C-KIT (Mauduit, 1999). Egalement sécrété par les cellules de Sertoli, l'acide rétinoïque (retinoic acid, RA) entraîne la

différenciation des spermatogonies indifférenciées A_{a1} en spermatogonies $A1$ dans la spermatogenèse (Dann et al., 2008; Pellegrini et al., 2008). D'autres facteurs comme les œstrogènes ou l'activine pourraient également jouer un rôle local sur les cellules germinales (O'Shaughnessy, 2014).

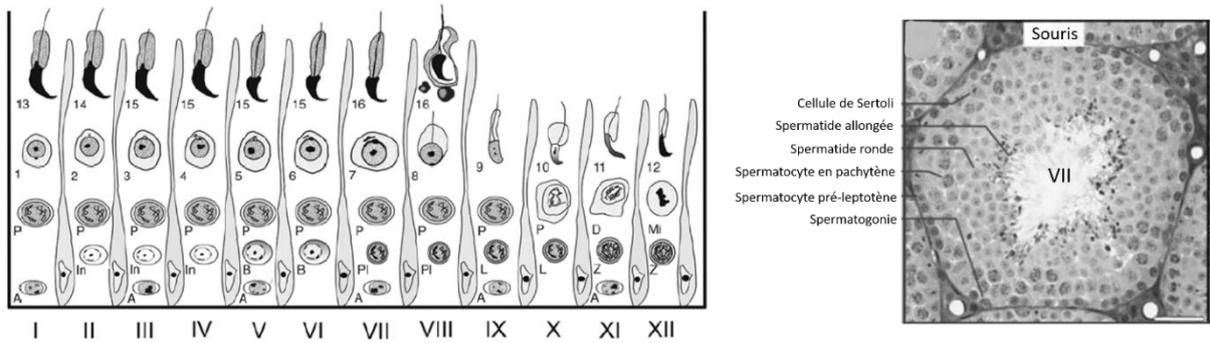
(3) Les deux divisions de méiose

Dans les deux espèces, les spermatogonies de type B se différencient en spermatocytes primaires, qui entreront en méiose (**Figure 3**). La méiose est un processus comprenant l'enchaînement de 2 divisions cellulaires (méiose I et méiose II), menant à la formation de 4 cellules haploïdes. Chaque division méiotique est divisée en 4 phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La prophase de première division de méiose (prophase I) est elle-même divisée en 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. La méiose des spermatocytes primaires aboutit à la formation des spermatocytes secondaires puis des spermatides rondes.

(4) Spermiogenèse et spermiation

Après la méiose, les spermatides rondes se différencient en spermatides allongées par un processus appelé spermiogenèse (O'Donnell, 2014). Lors de cette étape, des modifications radicales sont effectuées, résultant en l'apparition d'une cellule hautement différenciée. On peut citer la condensation de la chromatine, le développement d'un flagelle permettant plus tard une capacité de motilité, la formation de l'acrosome, essentiel pour la fécondation de l'ovocyte, et le relargage de la majorité du cytoplasme sous forme de corps résiduels, qui seront phagocytés par les cellules de Sertoli. Les spermatides allongées sont ensuite libérées dans la lumière du tube séminifère selon un processus appelé spermiation (O'Donnell et al., 2011; O'Donnell, 2014). Cette étape est permise entre autres par les cellules de Sertoli et les CMP. Enfin, les cellules germinales, maintenant appelées spermatozoïdes subiront d'autres étapes de maturation dans l'épididyme où ils seront stockés, puis dans les voies génitales femelles après éjaculation.

(A)



(B)

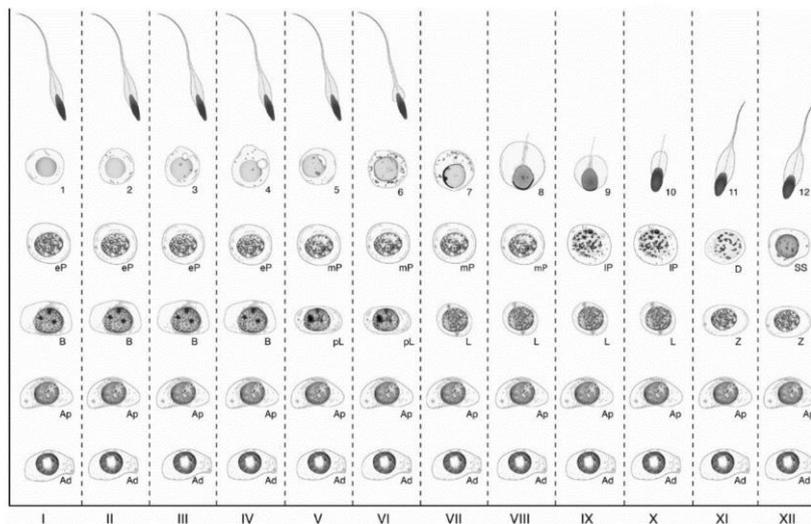


Figure 7 : Illustration du cycle de l'épithélium séminifère chez la souris (A) (tirées de Hess and Renato de Franca, 2008) et chez l'homme (B) (tiré de Muciaccia et al., 2013).

En un point donné du tube séminifère, un stade de l'épithélium séminifère (en lettres romaines) est défini comme l'association de cellules germinales à différentes étapes de différenciation. Chez la souris et chez l'homme, l'observation de douze stades successifs définit un cycle de l'épithélium séminifère. Chez la souris, A : spermatogonie A, In : spermatogonie intermédiaire, B : spermatogonie B, Pl : spermatozyte pré-leptotène, L : spermatozyte leptotène, Z : spermatozyte zygotène, P : spermatozyte pachytène, D : diacinèse, Mi : division mitotique, 1-8 : stades de différenciation successifs des spermatoïdes ronds, 9-16 : stades de différenciation successifs des spermatoïdes allongés jusqu'au spermatozoïde. Chez l'humain, Ad : spermatogonie Adark, Ap : spermatogonie Apale, B : spermatogonie B, pL : spermatozyte pré-leptotène, L : spermatozyte leptotène, Z : spermatozyte zygotène, eP : spermatozytes pachytène précoce, mP : spermatozyte pachytène moyen, IP : spermatozyte pachytène tardif, D : spermatozyte diplotène, SS : spermatozyte secondaire, 1-12 : stades de différenciation successifs des spermatoïdes jusqu'au spermatozoïde.

Chez les mammifères, il existe une organisation spatiale et temporelle très précise de la spermatogénèse (Clermont, 1972). La spermatogénèse est initiée de façon régulière et asynchrone le long du tube séminifère, entraînant l'existence de « vagues » de spermatogénèse. Ainsi, dans tout le tube séminifère se côtoient des cellules germinales à plusieurs stades de développement. En un point donné du tube séminifère, on définit un stade de l'épithélium séminifère comme une association particulière de cellules germinales à des stades de différenciation différents. Chez la souris, on retrouve douze stades de l'épithélium séminifère (**Figure 7A**). Chez l'homme, six stades avaient initialement été décrits (Clermont, 1963; Amann, 2008) mais une nouvelle nomenclature définit désormais douze stades, comme chez la souris (Muciaccia et al., 2013) (**Figure 7B**). Un cycle de l'épithélium séminifère est défini comme la période nécessaire à la réapparition d'un stade précis de différenciation au même endroit du tube séminifère. Ce cycle correspond également à la nouvelle entrée de spermatogonies dans la spermatogénèse à un point donné du tube. La cinétique de la spermatogénèse est propre à chaque espèce. Ainsi, un nouveau cycle se produit tous les 8,6 jours chez la souris et tous les 16 jours chez l'homme (Oakberg, 1956; Heller and Clermont, 1963; Clermont, 1972). En outre, un cycle dure environ 34,5 jours chez la souris et 74 jours chez l'homme.

b) Les cellules de Sertoli

Avec les CMP, les cellules de Sertoli constituent les cellules somatiques du tube séminifère. Elles ont des rôles majeurs qui permettent d'assurer la spermatogenèse et l'homéostasie du tissu testiculaire (pour revue : Chojnacka et al., 2016; França et al., 2016; O'Donnell et al., 2022) tels que :

- assurer la structure du tube séminifère,
- former la barrière hémato-testiculaire,
- sécréter une multitude de facteurs,
- phagocyter les corps résiduels, déchets de la spermatogenèse ainsi que certaines cellules germinales apoptotiques.

Les cellules de Sertoli vont permettre la progression de la spermatogénèse en assurant un support architectural aux cellules germinales. Ce sont des cellules polarisées, qui s'étendent de la base du tube séminifère jusqu'à sa lumière. De par cette architecture particulière sur toute la hauteur du tube séminifère, leur grande surface, leurs extensions cytoplasmiques ramifiées et leur cytosquelette élaboré, elles enserrant chacune plusieurs cellules germinales à tous les stades de différenciation et leur permettent une progression polarisée dans la spermatogénèse (Vogl et al., 2008). Chez l'humain et la souris, chaque cellule de Sertoli supporte approximativement 11 et de 30 à 50 cellules germinales respectivement.

Les cellules de Sertoli participent à l'établissement de la barrière hémato-testiculaire (BHT) (Cheng and Mruk, 2012; Mruk and Cheng, 2015; Stanton, 2016). Cette barrière est entre autres constituée de jonctions serrées au niveau du pôle basal des cellules de Sertoli (Mruk and Cheng, 2004) et permet la délimitation de deux compartiments au sein du tube séminifère : un compartiment dit « basal » comprenant les cellules pré-méiotiques, c'est-à-dire des spermatogonies jusqu'aux spermatocytes primaires en stade pré-leptotène/leptotène de prophase I. Un autre compartiment dit « luminal » comprend toutes les cellules post-méiotiques, des spermatocytes primaires en phase zygotène jusqu'aux spermatides allongées. La BHT permet d'une part un passage sélectif de molécules, créant des micro-environnements spécifiques à chaque grande phase de la spermatogenèse.

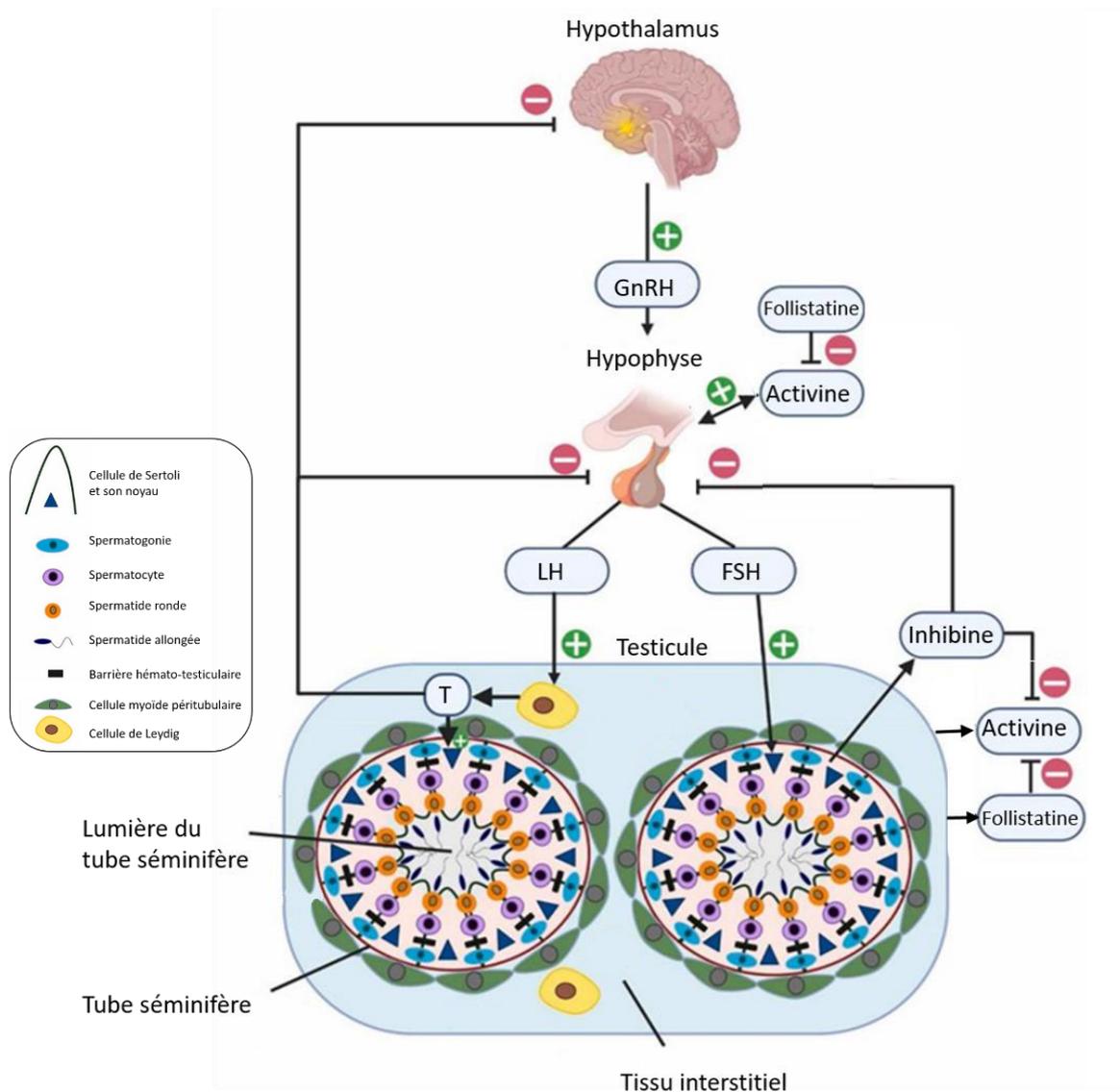


Figure 8 : L'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire (HHT) (modifié à partir de Aldahhan and Stanton, 2021).

La sécrétion de GnRH hypothalamique stimule la sécrétion de LH et de FSH hypophysaires, qui activent la sécrétion de testostérone (T) par les cellules de Leydig et la sécrétion d'inhibine B par les cellules de Sertoli. Ces sécrétions inhibent (testostérone, inhibine) ou stimulent (activine) les sécrétions de l'axe HHT par des mécanismes de rétro-contrôles positifs ou négatifs. L'activine est sécrétée par l'hypophyse et plusieurs types cellulaires dans le testicule dont les cellules de Sertoli, les cellules myoïdes périlitubulaires et les cellules de Leydig. La follistatine est sécrétée par les cellules germinales et les cellules de Sertoli ainsi que par des tissus extra-gonadiques. L'inhibine et la follistatine inhibent l'action de l'activine.

D'autre part, cette compartimentation permet la protection du compartiment luminal du système immunitaire, les cellules germinales post-méiotiques étant reconnues comme du non-soi (Fijak et al., 2010). Les cellules de Sertoli comportent également des jonctions adhérentes et des jonctions communicantes, entre elles-mêmes, avec les cellules germinales, et avec la lame basale, permettant la cohésion du tube (Mruk and Cheng, 2004). Certaines étapes de la différenciation germinale nécessitent une grande dynamique des jonctions entre les différents types cellulaires. Ainsi, le passage des spermatocytes primaires en phase pré-leptotène/leptotène de prophase I du compartiment basal au compartiment luminal passe par la restructuration des jonctions entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales, avec des phases de désassemblage et réassemblage (Smith and Braun, 2012; Xiao et al., 2014). De la même façon, un remaniement des jonctions est essentiel lors du stade spermatide allongée, ainsi que pour la libération des spermatides dans la lumière (Xiao et al., 2014).

En plus des jonctions entre les cellules de Sertoli, la BHT est également composée de vaisseaux sanguins et lymphatiques du testicule, imperméables à certains composés, et des CMP, qui établissent des jonctions serrées entre elles chez le rongeur (Dym and Fawcett, 1970).

Les cellules de Sertoli ont une forte capacité sécrétoire (França et al., 2016; O'Donnell et al., 2022). Grâce aux jonctions serrées établies entre elles, leurs sécrétions sont polarisées entre les compartiments apical et basal (Cheng and Mruk, 2012; Mruk and Cheng, 2015). Elles sécrètent des transporteurs ioniques et hormonaux, des sucres, des protéines et des lipides, qui sont utilisés par les cellules germinales. Elles sécrètent également les facteurs régulant l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules germinales évoqués plus haut. Les cellules de Sertoli sont aussi à l'origine de la sécrétion de l'activine A et de l'inhibine B (de Kretser et al., 2004a; Hedger and Winnall, 2012). Ces deux facteurs possèdent un rôle au niveau hypophysaire : l'activine A stimule la synthèse et la sécrétion de FSH (Ling et al., 1986) tandis que l'inhibine B les inhibent en se fixant au même récepteur (McCullagh, 1932) (**Figure 8**). Il a aussi été montré que l'activine A et l'inhibine B jouent un rôle paracrine et autocrine au sein du tissu testiculaire, pouvant réguler l'activité des cellules

de Leydig, des cellules germinales et des cellules de Sertoli (Hedger and Winnall, 2012). Les cellules de Sertoli sécrètent également des facteurs indispensables à la différenciation et la fonction des cellules de Leydig et des CMP, et d'autres qui contrôlent l'activité des cellules immunitaires et des cellules endothéliales du tissu interstitiel (O'Donnell et al., 2022). Les cellules de Sertoli participent également conjointement avec les CMP au dépôt de la lame basale par la sécrétion d'éléments de la matrice extracellulaire (Skinner et al., 1985). Enfin les cellules de Sertoli synthétisent le fluide tubulaire, indispensables à l'homéostasie des cellules germinales (Rato et al., 2010).

Les cellules de Sertoli permettent la phagocytose des cellules germinales apoptotiques, processus normal en condition physiologique (Nakanishi and Shiratsuchi, 2004). Elles phagocytent également les corps résiduels relargués par les spermatozoïdes en formation lors de l'étape de spermiogénèse, et participent à la spermiation (O'Donnell, 2014).

Les cellules de Sertoli fournissent un support structural, métabolique et chimique aux cellules germinales et assurent la synchronisation de la spermatogénèse. Pour assurer ces rôles, elles sont soumises à un certain nombre de facteurs régulateurs endocrines, paracrines et autocrines. On peut citer notamment la FSH, sécrétée au niveau central par l'hypophyse (**Figure 8**), et les androgènes, hormones synthétisées par les cellules de Leydig, qui sont des facteurs clé pour assurer le bon support de la spermatogénèse par les cellules de Sertoli (dont les rôles seront détaillés dans le paragraphe consacré aux cellules de Leydig de ce chapitre) (Walker and Cheng, 2005). Les cellules germinales, les CMP et les cellules de Sertoli elles-mêmes contrôlent les fonctions des cellules Sertoli via la sécrétion d'hormones, de facteurs de croissance et de cytokines (Jégou, 1993). La phagocytose des corps résiduels issus de la spermiogénèse apporte également des informations et peut réguler la sécrétion de facteurs pro- et anti-mitotiques par les cellules de Sertoli en direction des cellules germinales.

Il est admis que chez l'homme et la souris, ces cellules sont différenciées et ne prolifèrent plus. Il a cependant été montré une capacité proliférative des cellules de Sertoli dans des conditions hormonales particulières chez l'homme *in vivo* et chez l'homme et la souris *in vitro* (Tarulli et al., 2012).

c) Les cellules myoïdes périvitubulaires

Les CMP sont des cellules musculaires lisses, accolées à la lame basale, qui délimite les compartiments intra- et extratubulaires (Maekawa et al., 1996). On trouve une couche cellulaire chez la souris (Gardner and Holyoke, 1964) et de cinq à sept couches cellulaires chez l'humain (Ross and Long, 1966).

Les CMP participent à la formation de la lame basale en collaboration avec les cellules de Sertoli, en y déposant certains composés, comme la fibronectine, le collagène et des protéoglycanes (Skinner and Fritz, 1985; Skinner et al., 1985; Maekawa et al., 1996).

De par leurs propriétés contractiles, elles participent au transport péristaltique des spermatides allongées encore immobiles des tubes vers les canaux efférents (Romano et al., 2005; Mayerhofer, 2013).

Elles présentent également une fonction barrière, protégeant les cellules intratubulaires d'une exposition à certains composés, notamment via l'établissement de jonctions serrées entre elles chez les rongeurs (Dym and Fawcett, 1970). Les CMP font d'ailleurs parti intégrantes de la BHT.

Les CMP jouent non seulement un rôle structural dans l'architecture des tubes séminifères et le maintien des cellules intra-tubulaires dans un micro-environnement spécifique, mais présentent également un rôle actif de régulation de plusieurs types cellulaires testiculaires, notamment grâce à des sécrétions paracrines (Mayerhofer, 2013; Zhou et al., 2019; Heinrich and DeFalco, 2020). Elles produisent des facteurs de croissance comme le CSF-1 (Potter and DeFalco, 2017), également sécrété par les cellules de Leydig, qui est essentiel au maintien des CSS dans un état indifférencié (Oatley et al., 2009). Comme les cellules de Sertoli, elles sécrètent le GDNF (Potter and DeFalco, 2017), qui promeut l'auto-renouvellement des cellules germinales indifférenciées chez la souris (Chen et al., 2014) et chez l'homme (Spinnler et al., 2010). Elles influent également sur l'activité des cellules de Sertoli, via la sécrétion du facteur *Peritubular factors that modulate Sertoli cell function* (P-Mod-S) (Norton and Skinner, 1989), et sur l'activité des cellules endothéliales, régulant la vascularisation des tubes séminifères (Flenkenthaler et al., 2014).

Une grande partie de la régulation des CMP passe par les androgènes, sécrétés par les cellules de Leydig. L'étude de modèles de souris dont le récepteur aux androgènes (*Androgen receptor*, AR) est spécifiquement invalidé dans les CMP (Welsh et al., 2009; Zhang et al., 2006) a permis de montrer que les androgènes régulaient plusieurs processus dans ces cellules dont leurs propriétés contractiles, leur prolifération et leurs capacités sécrétoires (Mayerhofer, 2013; Zhou et al., 2019; Heinrich and DeFalco, 2020). L'étude de leur phénotype chez des hommes atteints de différentes pathologies suggère qu'elles pourraient également constituer des régulateurs de l'immunité et de l'inflammation (Mayerhofer, 2013; Heinrich and DeFalco, 2020).

La régulation de la spermatogenèse est un processus complexe qui fait intervenir de nombreux types cellulaires du testicule. Les cellules de Sertoli, en collaboration avec les CMP permettent la création d'un micro-environnement nécessaire à l'équilibre physiologique des cellules germinales, qui oscillent entre assurer un stock de cellules germinales souches et entrer en spermatogenèse pour produire des spermatozoïdes.

Séparé du tube séminifère par la lame basale, le tissu interstitiel est également un compartiment clé de la fonction testiculaire.

2. Le tissu interstitiel et la fonction endocrine

Le tissu interstitiel humain et murin sont composés de nombreux types cellulaires, parmi lesquels les cellules des vaisseaux lymphatiques et sanguins, les cellules périvasculaires, les fibroblastes, les cellules immunitaires, les télocytes nouvellement identifiés, et les cellules endocrines de Leydig (Kerr, 1992).

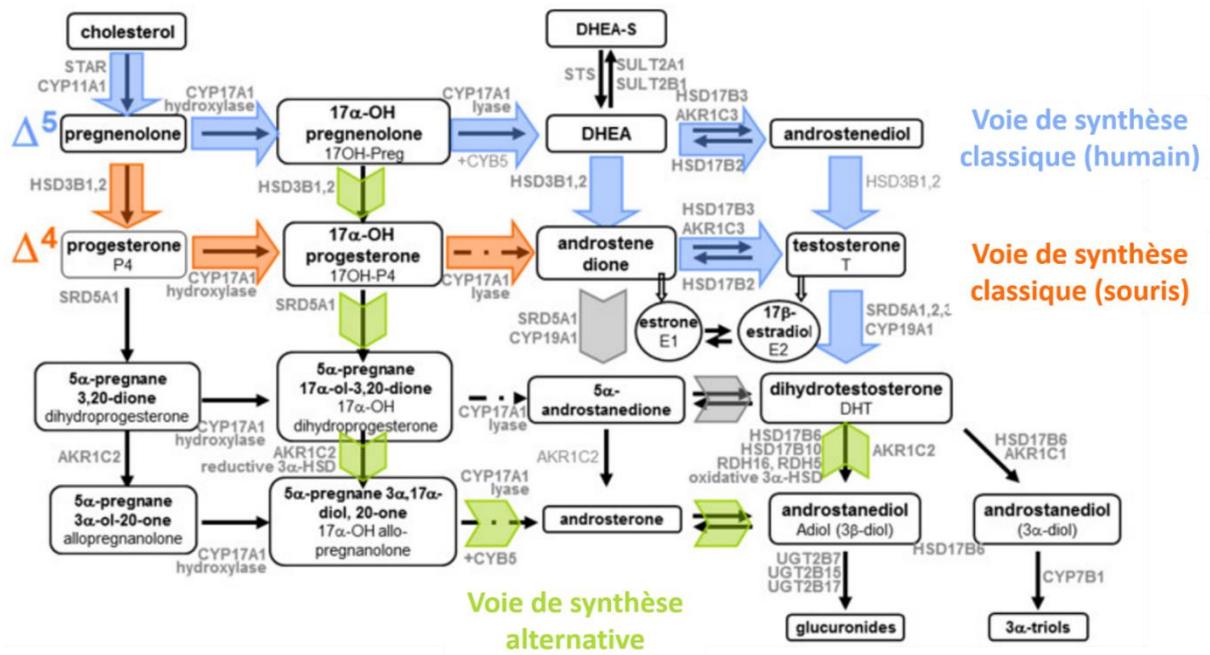


Figure 9 : Schéma de la stéroïdogénèse dans le testicule (tiré de Connan-Perrot et al., 2021)

Les précurseurs stéroïdiens et les différents métabolites (encadrés) sont transformés sous l'activité catalytique d'enzymes (en gris). Les voies de synthèse $\Delta 5$ (en bleu) et $\Delta 4$ (en orange) sont préférentiellement suivies dans le testicule humain et murin respectivement. Chez la souris, une voie de synthèse alternative (en vert) permet la synthèse de DHT sans passer par la synthèse de testostérone.

a) Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont des cellules endocrines dont le rôle majeur est la production d'androgènes, principalement de testostérone (Haider, 2004; Huhtaniemi and Teerds, 2018; Zirkin and Papadopoulos, 2018).

(1) L'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire

La prolifération, la différenciation et l'activité des cellules de Leydig sont régulées par des facteurs endocrines produits au niveau central ainsi que par des facteurs paracrines et autocrines produits au niveau gonadique par les autres types cellulaires testiculaires et par les cellules de Leydig elles-mêmes (Haider, 2004; Tremblay, 2015; Heinrich and DeFalco, 2020).

Parmi ces facteurs, un système majeur de la régulation des fonctions des cellules de Leydig et plus largement du testicule est l'axe HHT. Cet axe est composé des sécrétions de l'hypothalamus, de l'hypophyse et du testicule (Ramaswamy and Weinbauer, 2014; Corradi et al., 2016a; Kaprara and Huhtaniemi, 2018) (**Figure 8**). La Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) est une neurohormone sécrétée de manière pulsatile par des noyaux de neurones spécialisés de l'hypothalamus. Transportée jusqu'à l'hypophyse par le système sanguin porte hypothalamo-hypophysaire, la fixation de la GnRH sur ses récepteurs stimule la biosynthèse et la sécrétion de LH et de FSH par des cellules spécialisées de l'hypophyse (Schally et al., 1971; Shacham et al., 2001; Counis et al., 2005). Ces deux hormones sont libérées dans la circulation systémique, atteignent le testicule et se fixent à leurs récepteurs, exprimés sur les cellules de Sertoli pour la FSH et sur les cellules de Leydig pour la LH. La FSH stimule l'activité des cellules de Sertoli assurant le bon déroulement de la spermatogenèse (Walker and Cheng, 2005) et entraîne leur sécrétion d'inhibine B. La LH stimule l'activité stéroïdienne des cellules de Leydig, entraînant la sécrétion de testostérone (Tremblay, 2015).

Plusieurs rétrocontrôles sont en place pour réguler la sécrétion des différentes hormones de l'axe HHT (**Figure 8**). La testostérone, sécrétée par les cellules de Leydig, exerce un rétrocontrôle négatif sur la libération de LH par l'hypophyse et sur la libération de la GnRH par l'hypothalamus. De plus, trois protéines membres de la famille du *Transforming growth factor β* (TGF β), l'inhibine, l'activine et la follistatine, exercent un rétrocontrôle négatif ou positif selon le facteur, sur la sécrétion de FSH par l'hypophyse. L'inhibine B et l'activine A sont les formes principales qui jouent un rôle dans la fonction de reproduction (de Kretser et al., 2004a; Hedger and Winnall, 2012). Comme il a été vu plus haut dans le paragraphe consacré aux cellules de Sertoli, l'inhibine B, sécrétée principalement par les cellules de Sertoli, est un facteur qui inhibe de manière endocrine la sécrétion de FSH hypophysaire (Bilezikjian et al., 1993). L'activine A est sécrétée par les cellules de Sertoli, les CMP et les cellules de Leydig, où elle joue un rôle paracrine et autocrine : elle est capable d'inhiber la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig et jouerait un rôle dans la division cellulaire et la différenciation des cellules germinales. L'activine A est également sécrétée par l'hypophyse elle-même, où elle stimule localement la sécrétion de FSH (Bilezikjian et al., 1993). La follistatine est un facteur sécrété par les cellules germinales et les cellules de Sertoli dans le testicule et par des tissus extra-gonadiques, pouvant inhiber l'action locale de l'activine en se fixant dessus (de Kretser et al., 2004b) .

(2) La stéroïdogénèse et les rôles de la testostérone

Comme évoqué plus haut, la régulation de la synthèse de la testostérone passe majoritairement par l'hormone hypophysaire LH, qui quand elle se fixe sur son récepteur sur les cellules de Leydig, stimule leur prolifération et la transcription ainsi que l'activité de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse (Tremblay, 2015; Potter and DeFalco, 2017; Zirkin and Papadopoulos, 2018). La stéroïdogénèse comprend une succession d'étapes enzymatiques (**Figure 9**).

La première consiste en la translocation du cholestérol au sein de la mitochondrie, principalement par le transporteur *Steroidogenic acute regulatory protein* (STAR) (Miller and Bose, 2011). Les sources de cholestérol sont multiples. Le cholestérol peut être (Hu et al., 2010; Miller and Bose, 2011) :

- apporté par la circulation sanguine,
- issu de l'hydrolyse des esters de cholestérol stockés dans les gouttelettes lipidiques intracellulaires,
- importé de la membrane plasmique, constituée d'une bicouche lipidique,
- synthétisé *de novo* dans le réticulum endoplasmique.

La suite de la stéroïdogénèse fait intervenir plusieurs classes d'enzymes comme les cytochromes P450 (CYP) et les *hydroxysteroid dehydrogenases* (HSD) qui catalysent la formation de nombreux précurseurs intermédiaires jusqu'à la formation de testostérone (Miller and Auchus, 2011; Payne and Hales, 2004).

Il existe plusieurs voies de synthèse de testostérone. La voie Delta 5 ($\Delta 5$) est principalement utilisée dans le testicule humain, tandis que la voie préférentielle de synthèse chez le rongeur est la voie Delta 4 ($\Delta 4$) (Conley and Bird, 1997). Sans passer par la synthèse de testostérone, une voie alternative permet la synthèse d'un autre androgène, la 5 α -dihydrotestostérone (5 α -DHT, ou DHT), métabolite actif dans le testicule pendant la vie fœtale et dans des tissus extra-testiculaires chez l'adulte (Flück and Pandey, 2014).

La testostérone diffuse dans le tissu testiculaire et agit de façon paracrine dans les tubes séminifères et dans le tissu interstitiel. Elle pénètre également dans les vaisseaux sanguins à proximité et rejoint la circulation générale pour remplir son action endocrine dans des tissus extra-gonadiques (Tyagi et al., 2017; Zhou et al., 2019).

L'action de la testostérone et de la DHT est médiée via l'AR, qui est un récepteur nucléaire (Davey and Grossmann, 2016). Si ces deux molécules se fixent sur ce même récepteur, l'affinité de la DHT pour l'AR est meilleure que celle de la testostérone (Grino et al., 1990). La fixation d'un ligand sur l'AR entraîne l'activation d'une voie de signalisation canonique et de deux voies de signalisation alternatives (Walker, 2011). Concernant l'activation de la voie de signalisation canonique, la fixation d'un ligand à l'AR entraîne sa translocation dans le noyau où il joue le rôle d'un facteur de transcription et régule la

transcription de plusieurs gènes. Concernant les deux voies de signalisation alternatives, la fixation du ligand sur l'AR peut induire d'une part l'activation en chaîne de protéines kinases, résultant également en la régulation de transcription de gènes, et d'autre part peut induire un influx de calcium dans la cellule, dont le rôle est encore peu connu.

Plusieurs types cellulaires testiculaires possèdent l'AR : les cellules de Sertoli et les CMP dans les tubes séminifères et les cellules de Leydig, les cellules endothéliales et les cellules musculaires entourant les vaisseaux dans le tissu interstitiel (Sar et al., 1990; Wang et al., 2009; O'Hara and Smith, 2015). Il semblerait que la plupart des cellules germinales n'expriment pas l'AR sauf à des stades de différenciation spermatogénique spécifiques (Wang et al., 2009; Potter and DeFalco, 2017).

Des modèles de souris invalidées pour l'AR dans différents types cellulaires ont permis de montrer que sa signalisation dans les cellules de Leydig, de Sertoli et les CMP est essentielle à la spermatogenèse (Wang et al., 2009; Smith and Walker, 2014).

Dans les cellules de Sertoli, la testostérone est particulièrement importante pour quatre mécanismes essentiels à la spermatogenèse : (1) la cohésion de la BHT lors du passage des cellules germinales au cours de la méiose, (2) la progression de la méiose, (3) les mécanismes de jonctions entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales au stade de spermatide allongée, et (4) la libération des spermatides allongées dans la lumière du tube (Smith and Walker, 2014; Zhou et al., 2019).

Dans les CMP, la testostérone est essentielle pour leurs capacités contractiles et régule leur sécrétion de facteurs comme le GDNF et le CSF-1, évoqués dans le paragraphe consacré aux CMP (Mayer et al., 2018).

S'ajoutant à leur rôle dans la fonction de reproduction, les androgènes ont des rôles multiples dans plusieurs tissus, comme il est illustré par la distribution de l'AR dans le corps (Rana et al., 2014).

A partir de la puberté, la cellule de Leydig exprime l'enzyme aromatase, convertissant la testostérone en œstradiol. Cette hormone peut jouer un rôle central, en inhibant la libération de LH hypophysaire, mais a également un rôle paracrine testiculaire car il a été montré qu'elle influait sur plusieurs types cellulaires (Akingbemi, 2005; Rochira et al., 2005;

Carreau et al., 2010). Un ratio spécifique entre œstrogènes et androgènes apparaît essentiel pour la spermatogenèse.

(3) Les autres facteurs sécrétés

Les cellules de Leydig sécrètent également des facteurs paracrines. Elles sécrètent l'*Insulin-like growth factor 1* (IGF1) qui stimule la prolifération de multiples types cellulaires dans le testicule, dont les CSS, et qui régule la production de testostérone (Huang et al., 2009; Potter and DeFalco, 2017; Heinrich and DeFalco, 2020). Elles sécrètent également le TGF β et des interleukines (IL), qui semblent pouvoir réguler la spermatogenèse (Zhou et al., 2019). De plus, la sécrétion du facteur de croissance CSF-1 par les cellules de Leydig permet la prolifération et l'auto-renouvellement des spermatogonies indifférenciées (Oatley et al., 2009). En outre, les cellules de Leydig seraient une source de sécrétion de l'activine A (de Kretser et al., 2004a). Les cellules de Leydig sont également sécrétrices de facteurs régulateurs de la contractilité des CMP (Heinrich and DeFalco, 2020) dont les prostaglandines et l'ocytocine. L'ocytocine pourrait également réguler la stéroïdogénèse (Thackare et al., 2006). Enfin, les cellules de Leydig sécrètent l'*Insuline-like factor 3* (INSL3) (Zhou et al., 2019).

L'INSL3 est une hormone non stéroïdienne sécrétée par les cellules de Leydig au cours de la vie fœtale, qui régule la descente trans-abdominale des testicules pendant le développement, de pair avec les androgènes (Ivell and Anand-Ivell, 2009). Également exprimée par les cellules de Leydig adultes, cette hormone aurait un rôle de régulation de la production des stéroïdes et dans la survie de spermatozoïdes dans le testicule. Sa concentration sérique a été corrélée avec le nombre de cellules de Leydig fonctionnelles dans le testicule humain adulte (Ivell et al., 2013). À noter que la sécrétion de l'INSL3 par les cellules de Leydig semble être indépendante des régulations de l'axe HHT et elle n'exerce pas de rétro contrôle sur l'hypothalamus ou l'hypophyse (Ivell et al., 2014).

b) Les autres types cellulaires

Chez le rongeur et chez l'homme, le tissu interstitiel contient des cellules endothéliales, des cellules immunitaires, des télocytes, ainsi que des cellules musculaires lisses autour des vaisseaux sanguins et des cellules mésenchymateuses (Kerr, 1992).

Le tissu interstitiel est parcouru de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, permettant l'arrivée au testicule d'oxygène, de nutriments de messagers hormonaux. Les cellules vasculaires jouent un rôle important pour l'établissement de la niche spermatogoniale. Il a en effet été montré que la distribution des spermatogonies dans les tubes n'était pas aléatoire mais qu'au contraire les cellules se localisent de façon préférentielle dans des régions du tube séminifère adjacentes ou non à des vaisseaux sanguins, selon leur stade de différenciation (Chiarini-Garcia et al., 2001; Yoshida et al., 2007; Chan et al., 2014) (**Figure 5**). De plus, des études récentes ont rapporté que les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et sanguins étaient capables de sécréter des facteurs promoteurs de l'auto-renouvellement des SCC (Bhang et al., 2018; Kitadate et al., 2019).

Le tissu interstitiel contient également des cellules immunitaires, principalement des macrophages mais aussi des monocytes, des cellules dendritiques et des lymphocytes (Bhushan et al., 2020). Les macrophages phagocytent les potentiels agents infectieux et les cellules germinales apoptotiques, et permettent la relative immunotolérance des cellules germinales post-méiotiques (DeFalco et al., 2015). Les macrophages assurent aussi des fonctions non immunitaires, comme la régulation de la différenciation et de la stéroïdogénèse des cellules de Leydig. Ils participent également à la synthèse de certains facteurs régulateurs de l'auto-renouvellement et de la différenciation aux cellules germinales et en modulent l'accessibilité. Des études récentes ont montré qu'il existerait en réalité plusieurs sous populations de macrophages avec des origines, des localisations au sein du tissu interstitiel et des rôles différents (Meinhardt et al., 2022).

Le tissu interstitiel contient également par ailleurs des télocytes, récemment mis en lumière (Marini et al., 2018). Ces cellules retrouvées proches de la lame basale possèdent des extensions cytoplasmiques importantes (télopodes) et forment des jonctions avec les

CMP, les cellules de Leydig, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Ces cellules joueraient un rôle dans le maintien de l'architecture du testicule, permettraient le transfert de molécules entre les vaisseaux et le tissu testiculaire et réguleraient l'activité des cellules environnantes par des sécrétions paracrines.

Le testicule est un organe complexe, avec des régulations multiples contrôlant l'ensemble de ses fonctions. Le bon fonctionnement des fonctions testiculaires majeures, la spermatogenèse et la stéroïdogénèse, chez l'adulte dépend de l'établissement correct au cours de la vie embryonnaire du testicule et de l'ensemble de ses facteurs régulateurs. Une étape primordiale de la santé reproductive masculine se déroule donc au cours de l'ontogenèse testiculaire. Une atteinte lors de cette ontogenèse, qu'elle soit d'origine génétique ou environnementale, peut induire des conséquences néfastes bien plus tard au cours de la vie de l'individu (Rey and Grinspon, 2011).

B) Ontogenèse du testicule

Le développement gonadique chez la souris et chez l'humain est richement décrit dans la littérature (pour revue : Rey et al., 2000; Svingen and Koopman, 2013; O'Shaughnessy and Fowler, 2014; O'Shaughnessy, 2015; Mäkelä et al., 2019).

1. De la gonade indifférenciée

La première étape de l'ontogenèse testiculaire est le développement des gonades indifférenciées (Wilhelm et al., 2013; Nef et al., 2019). Ces dernières, également appelées crêtes génitales, apparaissent au jour embryonnaire (E, équivalent au jours post-coït (jpc) souvent trouvé dans la littérature) 10,5 chez la souris (Byskov, 1986) et à la 4^{ème} semaine de développement (SD, équivalent à la semaine de grossesse (SG) et à la semaine post-conception (SPC) également trouvés dans la littérature) chez l'homme (Satoh, 1991). Elles se développent à partir d'un épaissement de l'épithélium cœlomique accolé au mésonéphros, le rein embryonnaire transitoire.

De façon concomitante à leur développement, les gonades indifférenciées sont colonisées par la première population de cellules germinales : les cellules germinales primordiales (*Primordial germ cells*, PGC). Ces cellules sont spécifiées à partir d'un tissu extra-embryonnaire dès E7,5 chez la souris (Chiquoine, 1954; Ginsburg et al., 1990; McLaren, 2003; Lawson and Hage, 2007) et environ à la 3^{ème} SD chez l'homme (Fuss, 1912; McKay et al., 1953; De Felici, 2013). Elles vont ensuite migrer tout en se multipliant activement (Wylie, 1999) et elles atteignent la gonade indifférenciée à E11,5 chez la souris (Clark and Eddy, 1975; Molyneaux et al., 2001; Molyneaux and Wylie, 2004) et au cours de la 5^{ème} SD chez l'homme (Fujimoto et al., 1977). Une fois arrivées dans la gonade, leur phénotype est modifié (Baillie, 1964; Donovan, 1986) ainsi que l'expression de nombreux gènes (L. Li et al., 2017). On les appelle désormais des gonocytes.

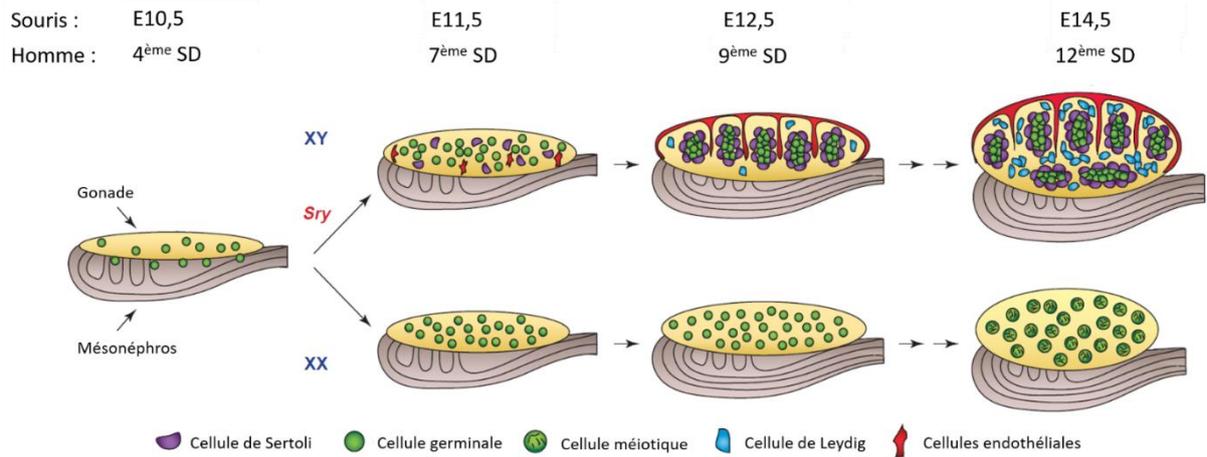


Figure 10 : Chronologie de la différenciation de la gonade fœtale murine et humaine (modifié à partir de Ross and Capel, 2005).

Jusqu'à là indifférenciée, l'expression du gène SRY dans la gonade mâle (XY) entraîne sa différenciation, et la formation des cordons séminifères. Les cellules germinales mâles n'entrent pas en méiose, contrairement à leurs homologues féminins.

Jusque-là identiques chez le mâle et la femelle, les gonades se différencient. Chez le mâle, la différenciation gonadique est initiée par la spécification des cellules précurseurs des cellules de Sertoli (dites de pré-Sertoli). Dans ces cellules, issues de la prolifération de l'épithélium coelomique chez la souris (Karl and Capel, 1998) et l'homme (Satoh, 1991), l'expression du gène *Sex determining region of the Y chromosome* (SRY) entre E11,5 et E12,5 chez la souris (Koopman et al., 1990; Gubbay et al., 1990; Hacker et al., 1995; Jeske et al., 1995; Bullejos and Koopman, 2001; Albrecht and Eicher, 2001) et à la 7^{ème} SD chez l'homme (Sinclair et al., 1990; Berta et al., 1990; Hanley et al., 2000) (**Figure 10**) entraîne l'expression du gène *Sry-related HMG box9* (SOX9) (da Silva et al., 1996; Kent et al., 1996; De Santa Barbara et al., 2000; Sekido et al., 2004) parmi d'autres (Sekido and Lovell-Badge, 2013; Stévant and Nef, 2019). Grâce à l'étude de nombreux mutants chez la souris et l'humain, il a été montré que SOX9 est l'acteur clé permettant l'engagement vers la différenciation testiculaire et l'inhibition de la destinée ovarienne (Kobayashi, 2005).

2. Au testicule embryonnaire

a) Anatomie et fonction

Malgré des différences inter-espèces, la succession des grandes étapes du développement testiculaire est très similaire chez la souris et l'homme (Ostrer et al., 2007). A l'instar du testicule adulte, le testicule embryonnaire est un organe composé de multiples types cellulaires, à l'origine de sécrétions paracrines, autocrines et endocrines (Voutilainen, 1992; O'Shaughnessy and Fowler, 2011; Ivell et al., 2017).

(1) Les cellules de Sertoli

L'expression de SOX9 dans les cellules de Sertoli induit l'expression de plusieurs gènes (Sekido and Lovell-Badge, 2013), et la sécrétion de différents facteurs dont le *Fibroblast growth factor 9* (FGF9) essentiel à la répression de la différenciation femelle (Kim et al., 2006; Jameson et al., 2012) et la *Prostaglandin D2* (PDG2) (Wilhelm et al., 2007), capable de recruter de nouvelles cellules de Sertoli (Wilhelm et al., 2005). Ces deux facteurs

peuvent en retour activer l'expression de SOX9 dans des boucles d'autorégulation positives (Jakob and Lovell-Badge, 2011). L'expression de SOX9 induit la différenciation des cellules de Sertoli (Sekido et al., 2004; Rahmoun et al., 2017) et l'expression de facteurs promoteurs de leur prolifération (Schmahl et al., 2000). La prolifération des cellules de Sertoli est une étape clé de l'ontogenèse testiculaire. Tout d'abord un nombre suffisant de ces cellules doit être atteint pour faire basculer la différenciation de la gonade vers une destinée testiculaire, comme il a été montré dans des études sur les souris chimériques (Palmer and Burgoyne, 1991; Patek et al., 1991; Nagamine et al., 1999). De plus, le nombre de cellules de Sertoli dans le testicule à la fin du développement détermine le nombre de cellules germinales qu'elles supporteront à l'âge adulte, et donc la capacité de production de spermatozoïdes (Orth, 1982; Sharpe et al., 2003).

Une fois spécifiées, les cellules de Sertoli jouent un rôle central dans l'ontogenèse testiculaire. Tout d'abord, elles vont participer à la formation des cordons séminifères, futurs tubes séminifères. Ce processus s'effectue entre E11,5 et 13,5 chez la souris (Nel-Themaat et al., 2011; Cool et al., 2012) et de la 7^{ème} à la 9^{ème} SD chez l'homme (O'Rahilly, 1983), divisant progressivement la gonade mâle en deux compartiments : le tissu interstitiel et les cordons séminifères. Les cellules de Sertoli s'agrègent autour de clusters de gonocytes (Gondos, 1981; Nel-Themaat et al., 2011), leur phénotype se modifie et elles forment des jonctions serrées entre elles, chez la souris (Nagano and Suzuki, 1976; Nel-Themaat et al., 2011; Li et al., 2014) et chez l'homme (Gondos, 1981), prémices de la future BHT.

Les cellules de Sertoli jouent également un rôle central dans la spécification et l'activité des autres types cellulaires du testicule, notamment grâce à la sécrétion de facteurs. Ainsi, elles sont essentielles à la différenciation des CMP et des cellules de Leydig (Yao et al., 2002; Clark et al., 2000; Pierucci-Alves et al., 2001). De plus, elles sont nécessaires à la migration de cellules endothéliales du mésonéphros adhérent (Cupp et al., 2003) et régulent plusieurs phénomènes cellulaires des gonocytes comme l'inhibition de leur entrée précoce en méiose (Wartenberg, 1978).

Enfin, la spécification des cellules de Sertoli et l'expression de SOX9 stimule leur sécrétion de l'*Anti-Müllerian hormone* (hormone anti-Müllerienne, AMH), également appelée *Müllerian inhibiting substance* (MIS) (De Santa Barbara et al., 1998; Arango et al., 1999). La sécrétion d'AMH débute rapidement après la spécification des cellules de Sertoli,

environ à E12,5 chez la souris (Munsterberg and Lovell-Badge, 1991) et entre la 8^{ème} et la 9^{ème} SD chez l'homme (Rajpert-De Meyts et al., 1999; Ostrer et al., 2007). L'AMH est un facteur essentiel dans la différenciation du tractus génital mâle (Behringer et al., 1994) (décrite dans le paragraphe consacré plus bas). D'autres rôles lui ont été attribués, notamment dans la différenciation des cellules germinales (Zhou et al., 1993; Zhou and Hutson, 1995).

Les cellules de Sertoli fœtales sécrètent également l'inhibine B dès leur différenciation, jusqu'à l'approche de la naissance (Majdic et al., 1997; Roberts, 1997; Anderson et al., 2002). Ce facteur est détecté dans le sang de cordon et le liquide amniotique (Wallace et al., 1997). Il a été montré chez la souris que les cellules de Leydig sont sources d'activine A (Archambeault and Yao, 2010; Mendis et al., 2011). Chez l'homme, les cellules de Leydig pourraient être source d'activine A et d'inhibine B tandis que les gonocytes pourraient sécréter de l'activine B (Anderson et al., 2002).

(2) Les cellules germinales

Jusqu'à-là identiques chez le mâle et la femelle, c'est peu après la formation des cordons que les cellules germinales mâles sont spécifiées, à partir de E13,5 chez la souris et entre la 11^{ème} et la 12^{ème} SD chez l'homme. Le déterminant majeur de cette différenciation germinale passe par l'environnement somatique de la gonade, testiculaire ou ovarien (Adams and McLaren, 2002; Hu et al., 2015). Ainsi, contrairement aux cellules germinales fœtales femelles qui entrent en division méiotique, les gonocytes vont s'engager vers la différenciation mâle, dite aussi « voie spermatogénique », qui implique différents phénomènes successifs (pour revue : Bowles and Koopman, 2010; Rossitto et al., 2015; Spiller et al., 2017; Spiller and Bowles, 2019) :

- résister aux signaux inducteurs d'entrée en méiose et maintenir un caractère prolifératif et pluripotent,
- sortir du cycle cellulaire et entrer en quiescence,
- réguler ultérieurement leur pluripotence.

Les cellules de Sertoli jouent un rôle clé dans la régulation de tous ces mécanismes. Ainsi, dès la formation des cordons, la sécrétion de facteurs sertoliens entraîne l'expression de

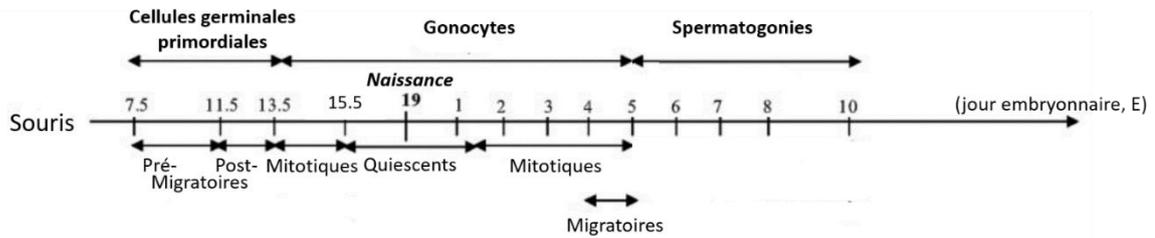
plusieurs gènes considérés comme spécifiques de l'engagement dans la différenciation mâle par les gonocytes.

On peut citer entre autres *Nanos homolog 2* (NANOS2), marqueur important de la voie spermatogénique (Tsuda et al., 2003; Saga, 2008; Suzuki and Saga, 2008) dont l'expression est stimulée par FGF9 (Barrios et al., 2010; Bowles et al., 2010), PDG2 (Moniot et al., 2014) et *Nodal growth differentiation factor* (NODAL) (Wu et al., 2013), sécrétés par les cellules de Sertoli.

Chez la souris, le signal inducteur de l'entrée en méiose des cellules germinales dans l'ovaire fœtal et dans le testicule adulte est le RA de par son rôle de facteur de transcription (Vernet et al., 2006; Anderson et al., 2008; Hogarth and Griswold, 2010, 2013; Feng et al., 2014). A noter, des études récentes ont montré chez la souris que l'entrée en méiose des ovocytes dans l'ovaire murin (Chassot et al., 2020; Vernet et al., 2020) et celle des gonocytes dans le testicule murin (Teletin et al., 2018; Topping and Griswold, 2022) peut se dérouler en l'absence de synthèse ou de signalisation du RA. Le RA est sécrété par le mésonephros dans le fœtus murin (Bowles et al., 2006; Feng et al., 2014). Dans le testicule fœtal, divers mécanismes sont mis en place dans les cellules de Sertoli afin d'inhiber ce signal pro-méiotique (Jørgensen and Rajpert-De Meyts, 2014; Endo et al., 2019). Les cellules de Sertoli ainsi que certaines cellules interstitielles produisent une enzyme de la famille des cytochromes P450 (CYP450), la *CYP450, family 26, subfamily B, member 1* (CYP26B1). Cette enzyme est capable de métaboliser l'acide rétinoïque, l'empêchant d'atteindre les gonocytes et donc inhibant leur entrée en méiose (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006; Vernet et al., 2006).

L'inhibition de l'entrée en méiose des gonocytes passe également par la sécrétion d'autres facteurs comme le FGF9, sécrété par les cellules de Sertoli peu après leur différenciation (Barrios et al., 2010; Bowles et al., 2010) et d'autres qui restent à être caractérisés (Guerquin et al., 2010). On peut également citer NODAL, libéré par les cellules de Sertoli et par les gonocytes eux-mêmes, qui inhibe la méiose (Souquet et al., 2012; Wu et al., 2013). Enfin, NANOS2 (Suzuki and Saga, 2008; Saga, 2010) et *Doublesex and mab-3 related transcription factor 1* (DMRT1) (Matson et al., 2010), exprimés par les gonocytes agissent également comme inhibiteurs autocrines de l'entrée en méiose.

(A)



(B)

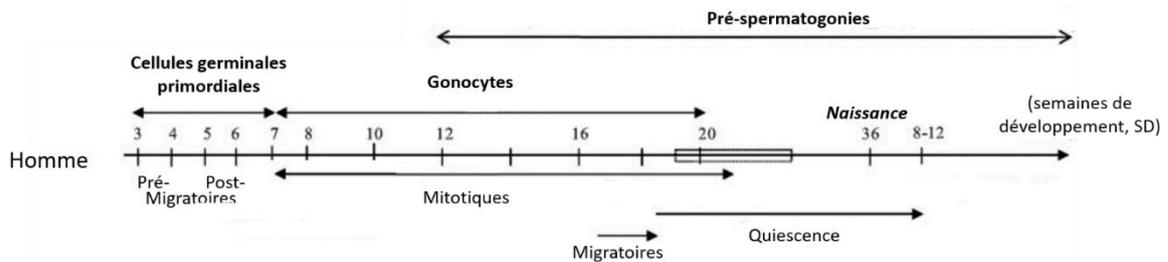


Figure 11 : Chronologie de la différenciation des cellules germinales au cours du développement chez la souris (A) et chez l'homme (B) (modifié à partir de Culty, 2009).

Les cellules germinales primordiales sont les cellules primordiales qui migrent dans la gonade indifférenciée, où elles se différencient en gonocytes. Ces derniers sont d'abord mitotiques avant d'entrer en quiescence, sur une période relativement courte chez la souris et de façon beaucoup plus asynchrone chez l'homme. Chez la souris, les gonocytes se différencient en spermatogonies après la naissance tandis que chez l'homme, les gonocytes se différencient en pré-spermatogonies au cours de la vie post-natale. Dans les deux espèces, la différenciation des gonocytes est associée avec une reprise de la mitose et une migration au sein du cordon séminifère. Chez la souris, les premières vagues de spermatogenèse sont initiées quelques jours après la naissance tandis que chez l'homme, c'est à partir de la puberté que la spermatogenèse débutera.

Chez l'humain, les gonocytes sont aussi préservés d'une entrée en méiose précoce et continuent de proliférer entre la 12^{ème} et la 15^{ème} SD (Jorgensen et al., 2012). Les mécanismes régulant cette inhibition de la méiose sont toutefois moins connus que chez la souris et il semble qu'il existe des différences inter-espèces (Jørgensen and Rajpert-De Meyts, 2014). Comme chez la souris, les cellules de Sertoli ont un rôle important dans ce processus (Wartenberg, 1978) et on retrouve aussi l'implication des facteurs NANOS2 (Childs et al., 2011), NODAL (L. Li et al., 2017) et DMRT1 (Jorgensen et al., 2012). De la même façon, l'entrée en méiose dans la gonade fœtale humaine repose également en partie sur l'action du RA (Le Bouffant et al., 2010; Childs et al., 2011) produit par le mésonéphros. Cependant, la métabolisation de ce dernier par l'enzyme CYP26B1 ne semble pas être le mécanisme inhibiteur primaire de l'entrée en méiose des gonocytes humains (Le Bouffant et al., 2010; Childs et al., 2011; Frydman et al., 2017) contrairement aux gonocytes murins.

Les PGC puis les gonocytes sont des cellules prolifératives et pluripotentes, et ce jusqu'à E13,5-E14,5 chez la souris (Western et al., 2010) (**Figure 11A**). Plusieurs facteurs sont associés au maintien de leur pluripotence, comme le FGF9, qui stimule l'expression des gènes associés à la pluripotence (Bowles et al., 2010) dont NODAL (Spiller et al., 2012). Lorsque les gonocytes s'engagent dans la différenciation mâle, ils vont peu à peu entrer en quiescence et perdre leur caractère pluripotent.

L'arrêt de la prolifération est un phénomène graduel et asynchrone chez la souris, se produisant de E12,5 à E14,5 (Western et al., 2008, 2010). L'entrée en quiescence est caractérisée par des modifications de l'expression de facteurs régulateurs du cycle cellulaire (Western et al., 2008; Spiller et al., 2009). Elle semble être à la fois médiée par un programme intrinsèque des gonocytes (Ohkubo et al., 1996) et implique l'expression des facteurs DMRT1 (Krentz et al., 2009) et NANOS2 (Saba et al., 2014a). D'autre part, elle dépend également de l'exposition à des facteurs extrinsèques, qui ne sont pas tous clairement identifiés. Il a été rapporté que des membres de la famille du TGF β , sécrétés par les cellules de Sertoli (Moreno et al., 2010; Mendis et al., 2011; Miles et al., 2013), ainsi que la PDG2 (Moniot et al., 2014), sécrétée par les cellules de Sertoli et les gonocytes eux-mêmes, seraient des facteurs impliqués dans l'entrée et/ou le maintien en quiescence des gonocytes. Un facteur encore non caractérisé, sécrété par des cellules interstitielles, induirait également l'arrêt mitotique (Guerquin et al., 2010). D'autres études suggèrent que

l'absence de RA (Trautmann et al., 2008; Saba et al., 2014b) ainsi que l'AMH (L. Li et al., 2017) sont également impliqués dans le contrôle de la quiescence des gonocytes.

Chez la souris, les gonocytes en quiescence sont appelés « pro-spermatogonies » (McCarrey, 2013), même si d'autres nomenclatures existent (Hilscher et al., 1974). Elles resteront en quiescence mitotique jusqu'à quelques jours après la naissance, à l'établissement des premières vagues de spermatogenèse (Nagano et al., 2000; Vergouwen et al., 1991) (**Figure 11A**). Une caractéristique de la différenciation mâle est la perte progressive du caractère pluripotent des gonocytes, simultanément à leur entrée en quiescence. Exprimés jusqu'à E14,5-E15,5, les gènes marqueurs de la pluripotence sont peu à peu éteints (Western et al., 2010). Cette étape est permise par l'action de PDG2 (Moniot et al., 2014), par la diminution des niveaux de FGF9, et grâce à la régulation de l'expression de NANOS2 (Saba et al., 2014a) et de DMRT1 (Krentz et al., 2009) dans les gonocytes.

Chez l'humain, les gonocytes sont en prolifération pendant une période plus longue que chez la souris, de manière relative à la durée de la gestation (Mamsen et al., 2011) (**Figure 11B**). Les gonocytes humains rentrent également en quiescence mais de façon très hétérogène dans le tissu testiculaire et on peut encore trouver des gonocytes prolifératifs jusqu'au 3^{ème} trimestre de la grossesse (Honecker et al., 2004; Rouiller-Fabre et al., 2009; Mamsen et al., 2011). Dans le testicule humain également, l'entrée en quiescence des gonocytes est concomitante à leur différenciation, jusqu'à un stade dit « pré-spermatogonie ». Sur des critères d'expression de marqueurs protéiques (Gaskell et al., 2004), de morphologie (Gondos and Hobel, 1971) et d'expression de facteurs liés à la pluripotence (Rajpert-De Meyts, 2004; Pauls et al., 2006), il a en fait été proposé chez l'homme l'existence de 3 populations : les gonocytes, les cellules intermédiaires et pré-spermatogonies. De la même façon que chez la souris, l'entrée en quiescence des gonocytes est concomitante avec une diminution de la pluripotence (L. Li et al., 2017).

Les facteurs intrinsèques et extrinsèques régulant la pluripotence et le cycle cellulaire sont essentiels. Un défaut de ces signalisations peut conduire à une sur-prolifération et le développement de tumeurs testiculaires des cellules germinales chez la souris (Bustamante-Marín et al., 2013) et chez l'humain (Skakkebak et al., 1987; Rajpert-De Meyts and Hoei-Hansen, 2007).

(3) Les cellules myoïdes périvitubulaires

L'origine exacte des CMP était jusqu'à peu encore incertaine du fait de l'absence de marqueurs moléculaires spécifiques (Jeanes et al., 2005). Les CMP ne dérivent pas des cellules ayant migré du mésonéphros (Cool et al., 2008; Combes et al., 2009b) mais de progéniteurs stéroïdogéniques comme il a été proposé récemment chez la souris (Ademi et al., 2022). Il est décrit que les cellules de Sertoli sont à l'origine de la spécification des CMP dans le testicule murin fœtal, via la sécrétion de *Desert Hedgehog* (DHH) (Clark et al., 2000; Pierucci-Alves et al., 2001). Peu de temps après la formation des cordons, les CMP nouvellement différenciées s'agrègent autour de ces derniers. Elles sont morphologiquement reconnaissables à E13,5 chez la souris (Jeanes et al., 2005) et à 12 SG chez l'homme (Ostrer et al., 2007) et elles produisent la lame basale à la base des cordons, en coopération avec les cellules de Sertoli.

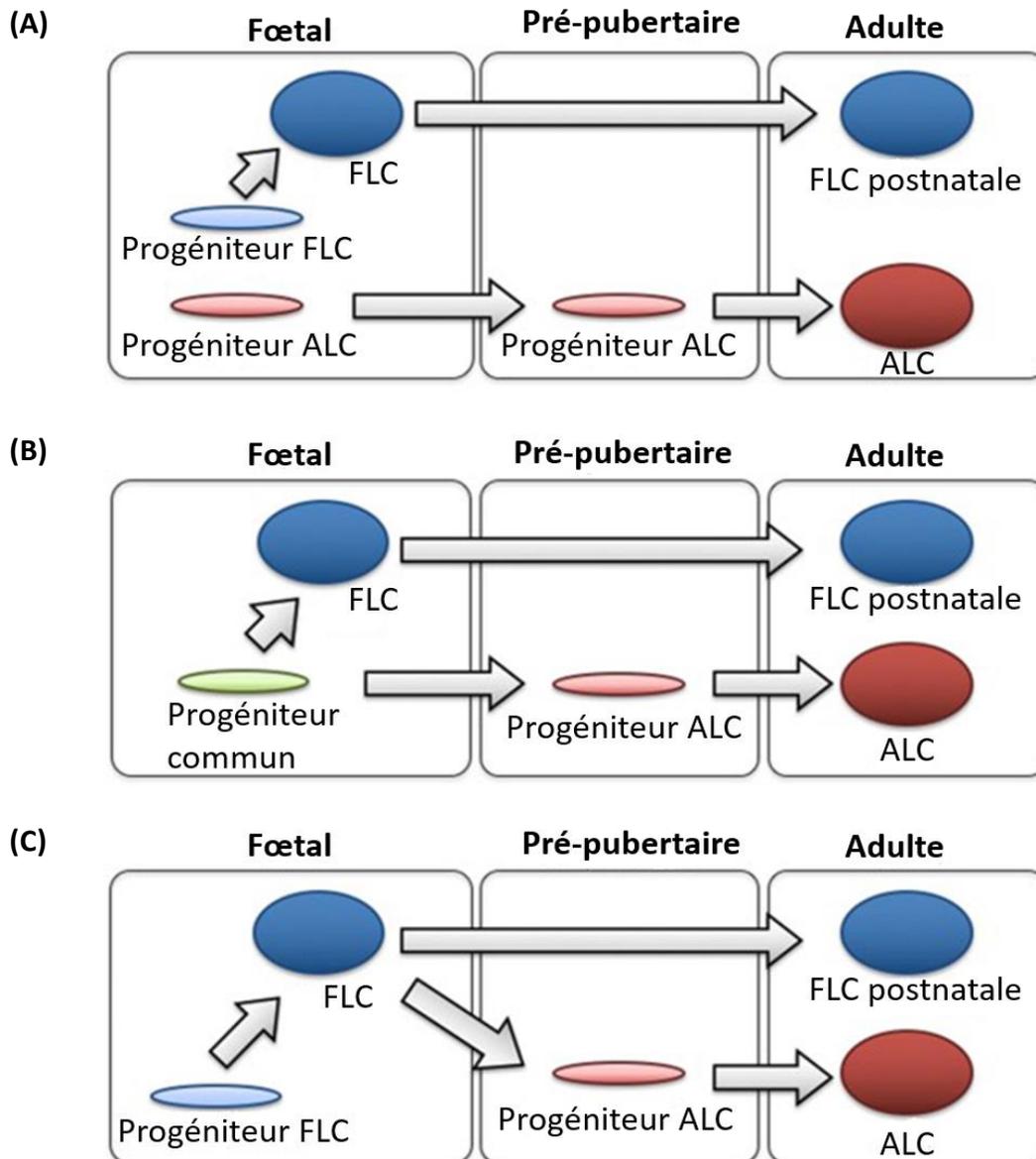


Figure 12 : Les différents modèles (A, B et C) expliquant l'origine des cellules de Leydig (modifié à partir de Shima, 2019).

3 modèles ont été proposés pour expliquer l'origine des cellules de Leydig fœtales (FLC) et adultes (ALC) : (A) Les FLC et les ALC dériveraient de progéniteurs distincts, présents dans le testicule dès le stade fœtal. Les progéniteurs des ALC resteraient quiescentes jusqu'à la vie adulte où elles se différencieraient en ALC. (B) Les FLC et les ALC dériveraient d'un progéniteur commun qui donnerait les FLC pendant la vie fœtale et les ALC chez l'adulte. (C) Les ALC dériveraient d'une dé-différenciation d'une partie des FLC dans le testicule pré-pubertaire.

(4) Les cellules de Leydig et l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire

La production d'androgènes par les cellules de Leydig dans le fœtus mâle est indispensable à l'ontogenèse testiculaire ainsi qu'à sa masculinisation. Comme évoqué précédemment, il existe au moins 2 populations de cellules de Leydig chez les mammifères, les cellules de Leydig fœtales (*Fetal Leydig cells*, FLC) et les cellules de Leydig adultes (*Adult Leydig cells*, ALC) (Roosen-Runge and Anderson, 1959; Habert et al., 2001; O'Shaughnessy et al., 2006; Griswold and Behringer, 2009; Svechnikov et al., 2010; Wen et al., 2016; Zirkin and Papadopoulos, 2018; Shima, 2019). Elles présentent un phénotype (Kerr and Knell, 1988) et un profil transcriptomique différent (Miyabayashi et al., 2017). Les FLC occupent le testicule au cours de la vie fœtale et sont progressivement perdues après la naissance, remplacées par les ALC (Kerr and Knell, 1988; Ariyaratne and Chamindrani Mendis-Handagama, 2000).

Les FLC se différencient à partir de progéniteurs mésenchymateux du tissu interstitiel au moment de la formation des cordons, à environ E12,5 chez la souris (Byskov, 1986; Merchant-Larios et al., 1993) et à la 7^{ème} SD chez l'homme (Pelliniemi and Niemi, 1969). Les cellules de Sertoli sont à l'origine des signaux inducteurs de la spécification stéroïdogène des FLC. L'origine des ALC et des FLC n'est pas encore bien caractérisée. Il existe plusieurs hypothèses (Shima, 2019) (**Figure 12**). Certaines études suggèrent que les ALC et les FLC dériveraient de progéniteurs distincts (**Figure 12A**) tandis que d'autres avancent qu'elles se différencieraient de la même population progénitrice (**Figure 12B**). Cette population progénitrice serait composée de cellules souches spécifiques des cellules de Leydig ou bien encore d'autres types cellulaires capables de transdifférenciation. Enfin, certains groupes ont fait l'hypothèse d'une dé-différenciation des FLC qui donneraient naissance aux ALC dans le testicule néo-natal (**Figure 12C**)

Chez la souris (Pointis et al., 1979) comme chez l'homme (Reyes et al., 1974), les FLC commencent à produire des androgènes peu de temps après leur différenciation. A noter que dans le testicule murin, les cellules de Leydig ne sécrètent pas directement de testostérone mais produisent un précurseur qui est converti en testostérone par les cellules de Sertoli (O'Shaughnessy et al., 2000; Shima et al., 2013).

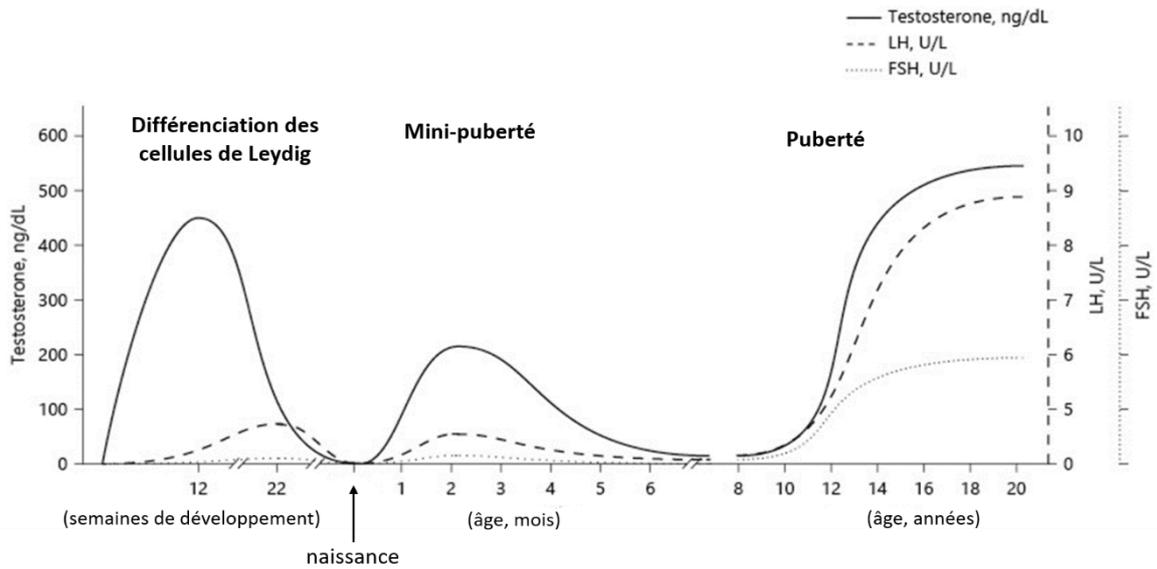


Figure 13 : Les 3 phases d'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-testiculaire (HHT) chez l'homme (modifié à partir de Becker and Hesse, 2020).

La différenciation des cellules de Leydig entraîne un pic de la sécrétion de testostérone, indépendamment de la stimulation par la LH. L'axe HHT est ensuite activé de façon transitoire au cours de la vie fœtale et peu après la naissance (mini-puberté). A partir de la puberté, il est activé de façon pérenne. Ces activations sont caractérisées par un pic de sécrétion des gonadotropines LH et FSH, la LH stimulant la production de testostérone.

Chez la souris, la testostérone est sécrétée à partir de E13, atteint un pic de concentration à E16-17 et diminue à E18 (Pointis et al., 1979). La production d'androgènes des FLC et le maintien de leur population est initialement indépendante de la LH hypophysaire fœtale (O'Shaughnessy et al., 1998) jusqu'à E16 puis passe sous son contrôle à la fin de la gestation (Pointis and Mahoudeau, 1977).

Chez l'homme, la testostérone est sécrétée à la 7^{ème} SD, elle augmente fortement entre la 8^{ème} et la 11^{ème} SD, atteint un pic entre la 11^{ème} et la 14^{ème} SD puis sa concentration sérique connaît un déclin progressif après la 20^{ème} SD (Reyes et al., 1974; Takagi et al., 1977; Tapanainen et al., 1981; Troisi et al., 2003) (**Figure 13**). Comme chez la souris, la sécrétion d'androgènes est indépendante de la LH pendant le 1^{er} trimestre de gestation mais elle repose sur la stimulation d'une autre hormone sécrétée par le placenta, l'*Human chorionic gonadotropin* (hCG), qui active le même récepteur que la LH (Huhtaniemi et al., 1977; Huhtaniemi and Lautala, 1979; Word et al., 1989). La concentration d'hCG atteint un pic entre la 8^{ème} et la 12^{ème} SD chez l'homme puis diminue tout en restant à un niveau relativement haut jusqu'à la fin de la gestation (Clements et al., 1976; Takagi et al., 1977). Contrairement à la LH (Cigorruga et al., 1978), l'hCG est un ligand qui n'entraîne pas de désensibilisation de ses récepteurs, permettant une stimulation continue de la sécrétion de testostérone (Leinonen and Jaffe, 1985).

L'INSL3 est une autre hormone sécrétée par les ALC de façon constitutive chez l'homme et la souris. Elle est détectable au moment de la différenciation des FLC autour de E13,5 chez la souris (Zimmermann et al., 1997) et à la 11^{ème} SD chez l'humain dans le fluide amniotique (Anand-Ivell et al., 2008).

Chez les rongeurs, les FLC disparaissent à la fin de la vie fœtale et au cours des premières semaines de vie (Habert et al., 2001; Haider, 2004). On peut néanmoins toujours détecter des FLC dans le tissu testiculaire adulte chez la souris (Kaftanovskaya et al., 2015; Shima et al., 2015). Il a été montré dans cette espèce que les cellules de Sertoli régulent la population d'ALC notamment via la sécrétion d'AMH *in vitro* (Rouiller-Fabre et al., 1998) et *in vivo* (Behringer et al., 1994).

Chez l'homme, le nombre de FLC augmente fortement jusqu'à la moitié de la gestation puis leur nombre diminue progressivement et elles disparaissent presque complètement à la fin

de la gestation (Pelliniemi and Niemi, 1969; Nistal et al., 1986; Codesal et al., 1990; Prince, 1990; Lejeune et al., 1998; Chemes, 2001; Faria et al., 2003; O'Shaughnessy et al., 2007).

Concernant l'AR, chez l'homme, il est exprimé par les CMP dès 7 SD et par quelques FLC (Shapiro et al., 2005). Il a d'ailleurs été proposé que les CMP puissent médier certains effets des androgènes (Welsh et al., 2009), en particulier l'établissement des cellules de Sertoli (O'Shaughnessy and Fowler, 2011). L'AR n'est pas exprimé par les cellules germinales pendant la vie foétale et les cellules de Sertoli commencent à l'exprimer au 5^{ème} mois de grossesse (Chemes et al., 2008). Enfin, les ALC expriment l'AR et sa signalisation est essentielle à leur maturation, leur maintien et leur activité (Kaftanovskaya et al., 2015; O'Hara et al., 2015).

(5) Les autres types cellulaires

Il a récemment été mis en évidence que le testicule est peuplé de plusieurs sous-populations de macrophages, avec des origines développementales différentes (Meinhardt et al., 2022). Il a été décrit chez la souris qu'une de ces sous-populations, les macrophages interstitiels sont présents dès E7,5 et dérivent du sac vitellin tandis qu'une autre sous-population, les macrophages péritubulaires émergent 2 semaines après la naissance et dérivent de progéniteurs de la moelle osseuse (Mossadegh-Keller et al., 2017; Mossadegh-Keller and Sieweke, 2018; Meinhardt et al., 2022).

Comme évoqué plus haut chez la souris, simultanément à la prolifération et la différenciation des cellules de Sertoli, des cellules endothéliales issues du mésonephros migrent dans la gonade et forment le vaisseau cœlomique (future artère testiculaire) ainsi qu'un réseau de capillaires artériels dans le tissu interstitiel (Martineau et al., 1997; Coveney et al., 2008; Brennan et al., 2002). Ce phénomène induit la mise en place de la vascularisation du testicule embryonnaire. Cette vascularisation, spécifique de la gonade mâle, est nécessaire à l'arrivée de nutriments et d'autres facteurs de signalisation.

Il a de plus été montré que cette migration de cellules du mésonephros est essentielle à la formation des cordons (Buehr et al., 1993; Martineau et al., 1997; Tilmann and Capel, 1999; Combes et al., 2009b). En effet, les cellules endothéliales participent au cloisonnement des agrégats de cellules de Sertoli et de gonocytes en véritables structures tubulaires (Cool et al.,

2012) via la sécrétion de facteurs (Cool et al., 2011). Ces cellules participent aussi au maintien de la différenciation des cellules de Sertoli (Tilman and Capel, 1999) et elles sécrètent des facteurs nécessaires à la prolifération des cellules interstitielles (Cool et al., 2011).

Chez l'humain également on observe la migration de cellules endothéliales à 7 SD et la formation de vaisseaux artériels à 12 SD (Ostrer et al., 2007).

Peu de temps après la mise en place de la circulation artérielle, la circulation veineuse est mise en place (Brennan et al., 2002). La formation des vaisseaux lymphatiques du testicule est une des dernières étapes de l'organogénèse testiculaire. L'organisation de ces derniers diffère suivant l'espèce considérée (Hirai et al., 2012)

Enfin, des fibres nerveuses sont détectées autour de testicule dès 16 SD chez l'humain, et elles se localisent entre les cordons séminifères à 20 SD (Otulakowski, 1992). Chez la souris, la présence de nerfs dans le testicule fœtal est moins caractérisée (Svingen and Koopman, 2013).

Notons qu'au cours de l'ontogénèse testiculaire, l'apoptose est un phénomène physiologique en condition normales, et ce dans plusieurs types cellulaires (Helal et al., 2002; Rouiller-Fabre et al., 2009; Nguyen et al., 2020).

La succession des événements constituant l'ontogénèse testiculaire a été étudiée par de nombreux groupes, chez la souris et chez l'homme. Ces études se basaient largement sur des observations morphologiques et le suivi des différents types cellulaires *in situ* par des marquages immunohistochimiques. Les avancées récentes des technologies transcriptomiques dites à haut débit, permettent aujourd'hui de suivre le développement gonadique et les différentes populations du testicule adulte de façon extrêmement précise (Guo et al., 2015; L. Li et al., 2017; Lecluze et al., 2018; Guo et al., 2018; Stévant et al., 2019; Guo et al., 2020, 2021; Wang et al., 2022).

b) Devenir des structures reproductives jusqu'à la naissance puis la puberté

(1) Le testicule et l'axe hypothalamo-hypophysio-testiculaire

Parallèlement à la différenciation des différents types cellulaires, les cordons séminifères s'allongent progressivement et s'épaississent chez la souris (Combes et al., 2009a; Cool et al., 2012). Ils se connectent au rete testis naissant qui débouche sur les tubules du mésonéphros, futurs canaux efférents (Kulibin and Malolina, 2020). A partir de E15,5, ils se courbent car l'espace testiculaire disponible se réduit. En effet, c'est à ce moment qu'apparaît l'albuginée, la capsule fibreuse entourant le testicule. Chez l'homme, les cordons s'allongent et s'épaississent également tout au long de la différenciation testiculaire. Leur diamètre est maximal à 16 SD et reste constant jusqu'à la fin de la gestation. L'albuginée apparaît à la mi-gestation et forme des septa entre 25 et 28 SD. Les cordons d'abord rectilignes s'incurvent. Leur courbure est maximale à 30 SD. Au cours de la tubularisation des cordons, le phénotype des cellules de Sertoli se modifie. Elles passent d'un phénotype mésenchymateux à un phénotype épithélial polarisé, avec des protrusions entourant les cellules germinales et un déplacement de leur noyau vers la lame basale (Nel-Themaat et al., 2011).

Comme il a été vu plus haut, chez la souris les gonocytes sont quiescents à partir de E14,5 et ce, jusqu'après la naissance (Hilscher et al., 1974). A E18,5, ils entament une migration du centre des cordons vers la lame basale (Pui and Saga, 2017), qui s'achève plus ou moins 1 jour après la naissance (jpn, jour post-natal) (Nagano et al., 2000). Cette migration coïncide avec une différenciation progressive des gonocytes en spermatogonies, qui s'accompagne de changements morphologiques et d'expression génique (Zheng et al., 2014; Yue et al., 2015; Pui and Saga, 2017). La plupart des spermatogonies sont différenciées et au contact de la lame basale à 4,5 jpn, et ceci coïncide avec l'apparition des premières SCC (McLean et al., 2003). Au même moment, les cellules germinales ré-entrent dans le cycle cellulaire (Nagano et al., 2000) et la première vague de spermatogenèse commence quelques jours après.

Chez l'humain, l'entrée en quiescence des gonocytes étant un phénomène hautement asynchrone et étendu dans le temps. En forte prolifération entre 6 et 10 SD, le nombre de

gonocytes augmente ensuite de façon continue jusqu'à la naissance (Bendsen et al., 2003; O'Shaughnessy et al., 2007; Mamsen et al., 2011). Chez l'humain aussi, la différenciation des gonocytes en cellules intermédiaires puis en pré-spermatogonies coïncide avec la migration des cellules du centre des cordons vers la lame basale mais à la différence de la souris, ces processus prennent plusieurs mois. Les gonocytes commencent à se différencier de manière asynchrone et progressive entre la 17^{ème} et la 19^{ème} SD (Gaskell et al., 2004; Rajpert-De Meyts, 2004; Pauls et al., 2006). A partir de la 25^{ème} SD, plus de la moitié des cellules germinales sont des pré-spermatogonies (Pauls et al., 2006), même s'il a été relevé que quelques gonocytes pouvaient persister jusqu'à 3-4 mois après la naissance (Rajpert-De Meyts, 2004). A noter qu'à partir de leur différenciation, les pré-spermatogonies sont des cellules peu voir non proliférativement actives (L. Li et al., 2017). Il est proposé que les pré-spermatogonies subissent une différenciation pour devenir des spermatogonies autour de 3 mois après la naissance, suite à l'activation temporaire de l'axe HHT (voir plus bas). Leur nombre augmente ensuite pendant l'enfance de l'individu puis la prolifération ralentit entre 8 et 10 ans (Müller and Skakkebak, 1983; Paniagua and Nistal, 1984; Cortes, 1990). Autour de la puberté elles subissent un pic de prolifération (Müller and Skakkebak, 1983; Paniagua and Nistal, 1984; Cortes, 1990) et les premières vagues de spermatogenèse commencent.

La succession des étapes que subissent les cellules germinales est essentielle. L'altération d'un de ces processus, comme par exemple un défaut de la différenciation des gonocytes, peut résulter en l'apparition de tumeurs testiculaires des cellules germinales (Rajpert-De Meyts and Høi-Hansen, 2007) (voir dans la partie consacré au cancer testiculaire de ce chapitre).

Concernant les cellules somatiques, chez la souris, le nombre des cellules de Sertoli augmente continuellement depuis la différenciation testiculaire jusqu'aux environs de la puberté puis reste stable pendant la vie adulte (Kluin et al., 1984; Baker and O'Shaughnessy, 2001). Au moment de la puberté, elles subissent une étape de différenciation ultime en cellules de Sertoli matures (Sharpe et al., 2003).

Chez l'homme, les cellules de Sertoli prolifèrent dès leur spécification jusqu'à 16 SG (Waters and Trainer, 1996; Ostrer et al., 2007). Leur nombre reste ensuite relativement stable le reste de la grossesse. Elles connaissent un pic de prolifération au 3^{ème} mois post-natal puis

leur nombre reste stable jusqu'à la puberté où elles subiront de nouveau un pic de prolifération (Cortes et al., 1987; Nistal et al., 1982; Nistal and Paniagua, 1983).

Chez la souris, après un pic de prolifération au moment de la différenciation testiculaire, les FLC sont faiblement prolifératives tout au long de la gestation et leur nombre reste relativement stable, jusqu'à disparaître au cours des premières semaines post-natales. Les ALC apparaissent au 7^{ème} jpn, elles se différencient entre 10 et 20 jpn et subissent un pic de prolifération (Vergouwen et al., 1991; Baker and O'Shaughnessy, 2001).

Chez l'homme, après leur spécification, les FLC prolifèrent jusqu'à un maximum à 18 SD, puis leur prolifération diminue progressivement jusqu'à être presque nulle à la naissance (Pelliniemi and Niemi, 1969; Codesal et al., 1990; Holstein et al., 1971; Prince, 1990; Waters and Trainer, 1996; Ostrer et al., 2007). L'activation temporaire de l'axe HHT autour de 3 mois post-natal (voir plus bas) entraîne l'apparition et la prolifération des ALC, puis leur prolifération diminue au 4^{ème} mois post-natal (Codesal et al., 1990). Le prochain pic de prolifération des ALC est déclenché à la puberté.

Comme il a été vu précédemment, la sécrétion initiale d'androgènes fœtale par les FLC ne requiert pas de stimulation par les gonadotropines puis elle en devient progressivement dépendante. A partir de ce moment, l'axe HHT connaît 3 pics d'activation au cours de la vie d'un individu, caractérisés par une forte sécrétion des gonadotropines LH et FSH (**Figure 13**).

La première activation de l'axe HHT se déroule au cours de la vie fœtale. Chez la souris, il semblerait que l'hypophyse fœtale commence à sécréter les gonadotropines aux environs de la fin de la gestation (O'Shaughnessy et al., 1998). En revanche, chez l'homme, les gonadotropines sont sécrétées relativement tôt au cours de la gestation puisque la LH et la FSH sont sécrétées à partir de la 9^{ème} SD (Kaplan and Grumbach, 1976; Hagen and McNeilly, 1977). Elles sont détectables dans le sang fœtal entre la 12^{ème} et la 14^{ème} SD (Clements et al., 1976; Kaplan and Grumbach, 1976) et leur sécrétion devient GnRH-dépendante à partir de la 30^{ème} SD (Guimiot et al., 2012). La libération de LH entraîne la libération de testostérone par les FLC. Un pic de LH et de FSH est atteint à la mi-gestation puis leur concentration diminue jusqu'à être presque nulle chez les nouveau-nés (Takagi et

al., 1977; Massa et al., 1992; Guimiot et al., 2012). Cette diminution est causée par l'augmentation progressive de la sécrétion d'œstrogènes par le placenta à la fin de la gestation, qui exercent un contrôle négatif sur l'axe HHT fœtal (Winter et al., 1975, 1976; Troisi et al., 2003). La FSH stimule probablement la prolifération et l'activité des cellules de Sertoli mais ses effets sont moins connus dans le testicule fœtal (Plant and Marshall, 2001; O'Shaughnessy et al., 2007). Les androgènes sécrétés par les cellules de Leydig et l'AMH sécrété par les cellules de Sertoli jouent un rôle primordial dans la masculinisation du tractus génital dans le fœtus mâle.

Dans plusieurs espèces mammifères, on observe peu après la naissance une seconde activation transitoire de l'axe HHT, appelée aussi « mini-puberté » (pour revue : Kuirin-Hänninen et al., 2014; Lanciotti et al., 2018; Becker and Hesse, 2020; Bizzarri and Cappa, 2020; Lucaccioni et al., 2021) (**Figure 13**).

Chez l'homme, les hormones placentaires, inhibitrices de l'axe HHT, disparaissent de la circulation du nouveau-né au cours des premiers jours de vie (Bidlingmaier et al., 1973; Winter et al., 1975). Délivré de l'inhibition exercée par ces hormones placentaires, l'axe HHT est ré-activé à la 1^{ère} semaine post-natale (Forest et al., 1974, 1973). Les niveaux de LH et de FSH s'élèvent à partir du 6^{ème}-10^{ème} jpn, atteignent un pic entre la 2nd et la 10^{ème} semaine post-natale, commencent à diminuer entre 4^{ème} et le 6^{ème} mois post-natal (Winter et al., 1975, 1976; Schmidt and Schwarz, 2000; Bergadá et al., 2006) et chutent complètement entre le 6^{ème} et le 9^{ème} mois post-natal (Winter et al., 1975). La mini-puberté joue un rôle important dans le développement de plusieurs organes génitaux et le développement cognitif du fœtus. Elle entraîne aussi un pic de prolifération transitoire des cellules de Sertoli (Cortes et al., 1987) et des cellules germinales (Müller and Skakkebak, 1983). Elle permettrait également la différenciation des pré-spermatogonies en spermatogonies A_{dark}, réserve de cellules souches germinales chez l'individu adulte (Forest et al., 1973; Hadžiselimović et al., 1986; Rajpert-De Meyts, 2004). Enfin, elle stimule également de façon transitoire la prolifération des cellules de Leydig. On observe néanmoins une chute du nombre total des cellules de Leydig au 3^{ème} mois dû à l'apoptose des FLC (Nistal et al., 1986; Codesal et al., 1990; Lejeune et al., 1998; Chemes, 2001).

Au cours de cette période, la FSH stimule la production d'AMH (Al-Attar et al., 1997; Lukas-Croisier et al., 2003; Lasala et al., 2004; Aksglaede et al., 2010) et d'inhibine B (Andersson et

al., 1998) par les cellules de Sertoli qui atteignent un pic puis diminuent en quelques semaines.

La LH stimule de son côté la production de testostérone (Winter et al., 1976) par les cellules de Leydig. La production de testostérone atteint un pic entre le 2^{ème} et le 3^{ème} mois post-natal (Forest et al., 1973; Winter et al., 1976; Bidlingmaier et al., 1983; Bergadá et al., 2006) puis re-diminue entre le 6^{ème} et le 9^{ème} mois post-natal. L'absence de récepteurs aux androgènes dans les cellules de Sertoli fœtales et infantiles (Berensztein et al., 2006) permet d'empêcher l'initiation de la spermatogenèse précoce. Cette absence permet également à l'AMH d'éviter le rétrocontrôle négatif de sa sécrétion par la testostérone (Al-Attar et al., 1997; Boukari et al., 2009), entraînant le maintien de ses niveaux.

Cette activation transitoire de l'axe HHT en période néo-natale est observée dans d'autres espèces. Ainsi, on retrouve également une décharge de gonadotropines chez la souris entre le 2^{ème} et le 6^{ème} jpn et un pic de testostérone (Corbier et al., 1992). C'est à ce moment que les pré-spermatogonies se différencient en spermatogonies de type indifférenciées (R. Li et al., 2017). Chez la souris, environ à 4 jpn, l'activine A, sécrétée par les pré-spermatogonies et l'inhibine B, sécrétée par les cellules de Sertoli jouent un rôle dans la transition prolifération/quiescence des cellules de Sertoli et la différenciation des pré-spermatogonies en spermatogonies (Barakat et al., 2008; Mithraprabhu et al., 2010; Barakat et al., 2012). Leur niveau diminue ensuite quelque jour après le pic.

Après les périodes d'activation transitoires fœtale et néo-natale de l'axe HHT, c'est au cours de la puberté que s'activera l'axe HHT de manière pérenne (Lewis and Lee, 2009; Rey, 2014; Guo et al., 2020). La puberté décrit la période de réactivation de l'axe HHT et l'acquisition des caractères sexuels secondaires, permettant la capacité de reproduction de l'individu. La puberté est divisée en 5 phases cliniques chez le garçon (Marshall and Tanner, 1970).

Contrôlée par divers stimulus, la réactivation de la sécrétion hypothalamique de GnRH entraîne la sécrétion hypophysaire de LH et de FSH (Plant, 2015; Herbison, 2016). La LH permet l'achèvement de la différenciation des Leydig avec pour conséquence l'augmentation de la concentration des androgènes, d'abord dans le testicule puis dans le sang (Boyar et al., 1974; Rivarola et al., 1983).

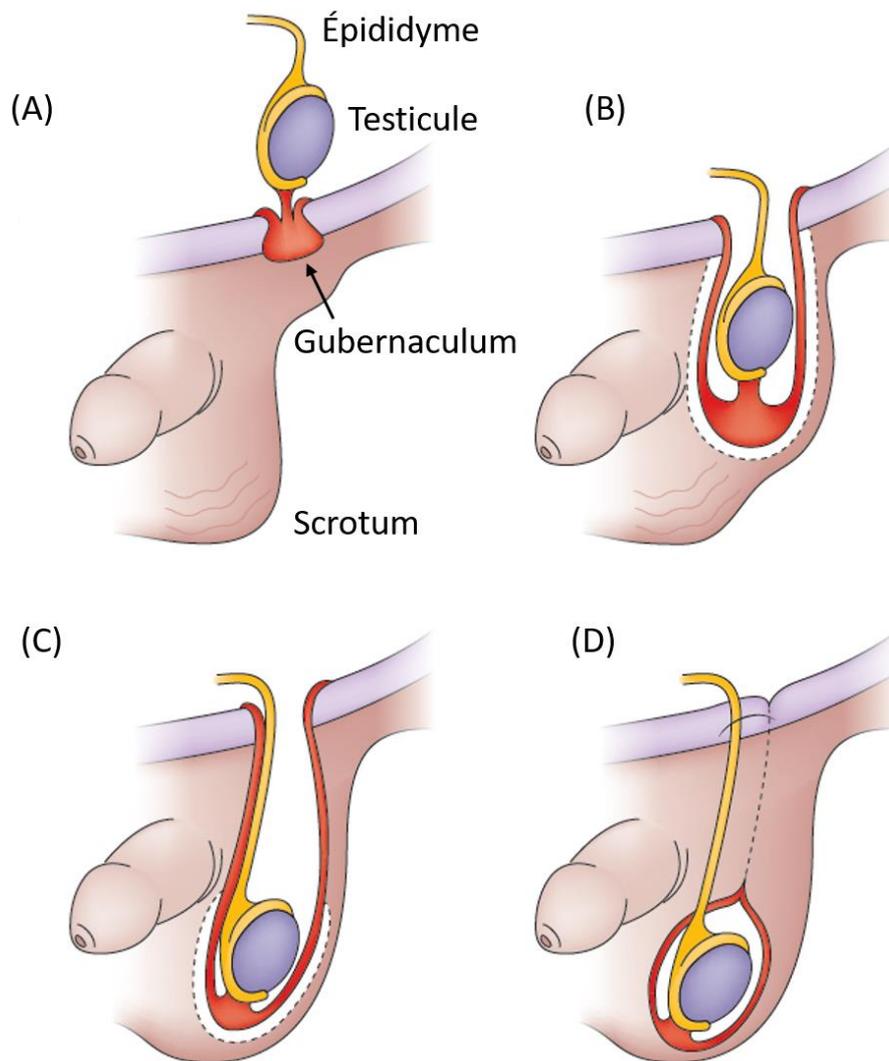


Figure 14 : La descente testiculaire chez l'homme (modifié à partir de Gurney et al., 2017).

Chez la plupart des mammifères, le testicule fœtal initialement intra-abdominal (A) doit migrer dans le scrotum extra-abdominal (D) afin s'assurer sa physiologie. La descente testiculaire, dirigée par le gubernaculum, est caractérisée par une première phase dite « trans-abdominale » (B) et une deuxième phase dite « inguino-scrotale » (C).

Les cellules de Sertoli deviennent progressivement sensibles aux androgènes à partir de la 2^{ème} moitié de la grossesse jusqu'à la puberté (Chemes et al., 2008). Les androgènes entraînent la maturation des cellules de Sertoli (Rey et al., 2009), caractérisée par une perte de la capacité mitotique et de la production d'AMH (Rey et al., 1993; Rey, 1998; Rey et al., 2003; Aksglaede et al., 2010; Jeffery et al., 2015), ainsi que des transformations morphologiques et sécrétoires, aboutissant entre autres à la formation finale de la BHT (Nistal et al., 1982; Nistal and Paniagua, 1983; Rey et al., 2009). Déjà sécrétées pendant la vie fœtal, les inhibines et les activines sont toujours sécrétées par les cellules de Sertoli adultes (de Kretser et al., 2004a). La sécrétion de FSH entraîne la prolifération des cellules de Sertoli et l'augmentation du volume testiculaire (Koskenniemi et al., 2017). La réorganisation de l'épithélium séminifère et la création d'une lumière au centre des cordons achève leur maturation en tubules séminifères. Les premières vagues de spermatogenèse se mettent en place : les cellules germinales se différencient et entrent en mitose, augmentant d'autant plus le volume du testicule (Koskenniemi et al., 2017).

De manière concomitante aux étapes de différenciation et de maturation évoquées plus haut, le testicule subit un processus majeur : la descente testiculaire.

(2) La descente testiculaire

Chez la plupart des mammifères, dont l'homme et la souris, le testicule doit migrer de la région abdominale vers une région extracorporelle pour être à la température optimale de 35°C requise pour la spermatogenèse (**Figure 14**). La descente testiculaire est un processus biphasique, réalisé sous l'action conjugué d'hormones (pour revue : Hutson, 1985; Hutson et al., 1997; Klonisch et al., 2004; Hughes and Acerini, 2008; Mamoulakis et al., 2015; Hutson et al., 2016)

La première phase dite « trans-abdominale » s'étend entre E15,5 et E17,7 chez la souris (Wensing, 1973) et de la 10^{ème} à la 15^{ème} SD chez l'homme (Wyndham, 1943) (**Figure 14B**). Elle implique la modification de 2 ligaments attachant le testicule au corps : le ligament suspenseur crânial qui régresse, tandis que le ligament génitoinguinal caudal, ou

« gubernaculum », s'épaissit et se raccourcit, permettant au testicule, contrairement à l'ovaire, de rester en position abdominale basse tandis que le corps du fœtus s'allonge.

Chez la souris, il est connu que l'INSL3 joue un rôle essentiel sur l'épaississement du gubernaculum, étape majeure de la descente testiculaire. La stimulation de son récepteur *Relaxin-family peptide receptor 2* (RXFP2), exprimé sur le gubernaculum, stimule la prolifération cellulaire (Feng et al., 2009; Bay et al., 2011; Ivell and Anand-Ivell, 2011). Chez l'humain, le rôle de l'INSL3 dans la descente testiculaire est moins bien décrit. Néanmoins, l'existence de mutations de l'INSL3 ou de son récepteur étant liées à un défaut de la descente testiculaire et l'INSL3 étant détecté chez le fœtus humain au moment de cette phase, il est très probable que l'INSL3 joue également un rôle majeur dans la phase trans-abdominale (Bay et al., 2011; Ivell and Anand-Ivell, 2011). Des études ont également rapporté un rôle de l'AMH sur le raccourcissement du gubernaculum lors de cette phase chez l'homme (Hutson and Lopez-Marambio, 2017) ainsi qu'un rôle des androgènes sur la disparition du ligament suspenseur crânial (Emmen et al., 1998; van der Schoot and Elger, 1992; Barthold et al., 2000).

La deuxième phase, dite « inguino-scrotale » s'étend de E18 jusqu'à 20 jpn chez la souris et de 25 à 35 SD chez l'homme. C'est lors de cette phase, sous le contrôle des androgènes, que le gubernaculum s'allonge et entraîne le testicule dans la région pubienne jusqu'au scrotum (**Figure 14C**).

Un défaut lors des phases de descente testiculaire peut conduire à une cryptorchidie, une malformation congénitale pour laquelle un ou deux testicules ne sont pas descendus à la naissance (détaillée dans la partie consacrée aux malformations congénitales). La cryptorchidie peut mener à une infertilité mais est également un facteur de risque pour d'autres pathologies comme le cancer du testicule.

(3) Différenciation du tractus génital

Chez l'humain comme chez la souris, c'est lors de la gestation que se mettent en place les caractères sexuels primaires, c'est-à-dire la différenciation du tractus génital.

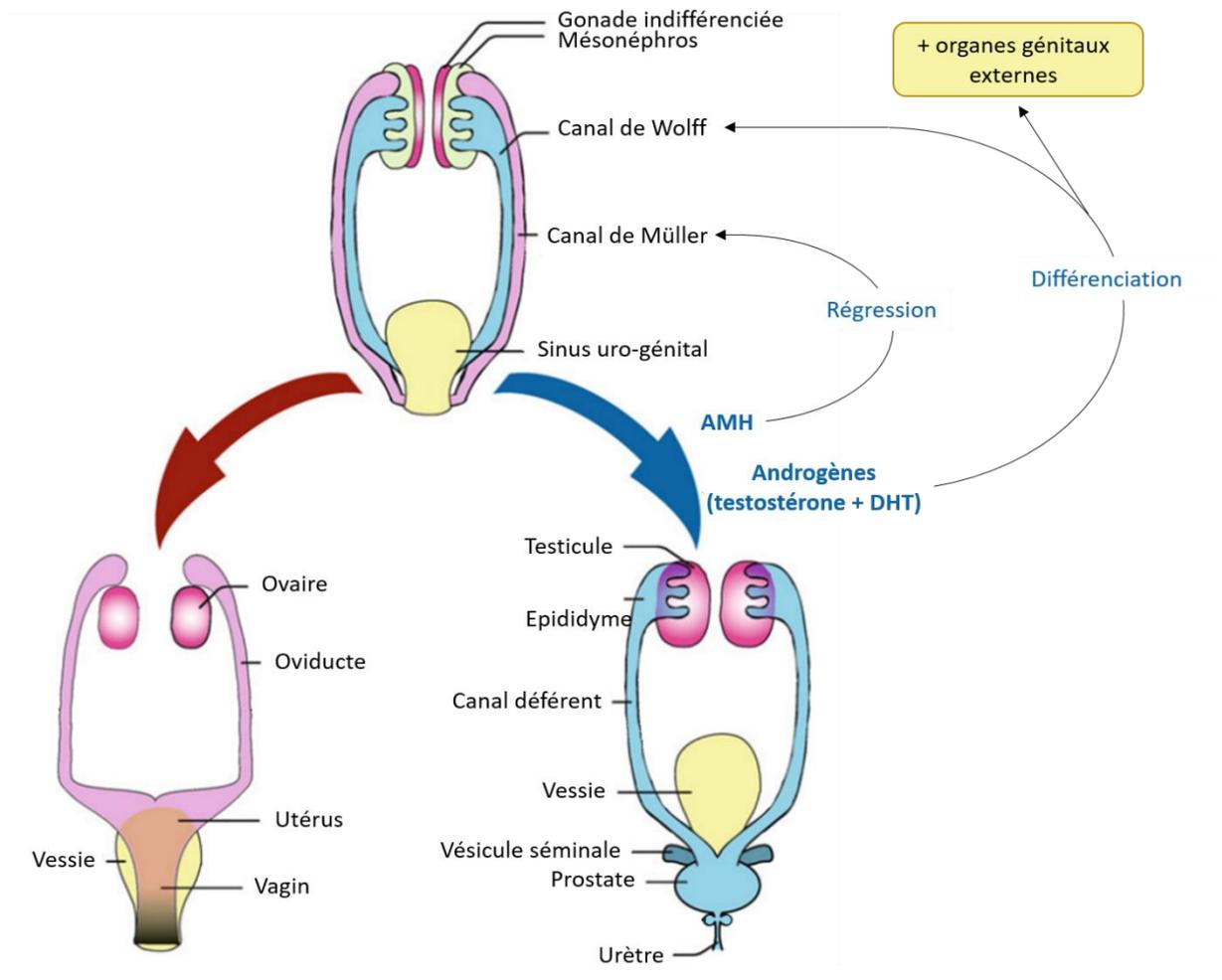


Figure 15 : La différenciation du tractus uro-génital (modifié à partir de Pask, 2016).
 La sécrétion d'AMH et d'androgènes (testostérone et 5 α -dihydrotestostérone (DHT)) entraîne la différenciation masculine du tractus uro-génital et des organes génitaux externes.

Le tractus génital comprend le tractus uro-génital (aussi appelé organes génitaux internes) et les organes génitaux externes (ou tubercule uro-génital).

Le tractus uro-génital est composé du sinus uro-génital, future prostate, et de 2 paires de canaux issus du mésonéphros qui co-existent dans les 2 sexes au début du développement : les canaux de Wolff et les canaux de Müller (Wilson, 1978). Les canaux de Wolff seront à l'origine de l'épididyme, du canal déférent et des vésicules séminales chez le mâle. Les organes génitaux externes sont composés du repli urétral, du tubercule génital et de l'épaississement labio-scrotal qui donneront chez le mâle, le pénis, le gland du pénis et le scrotum respectivement (**Figure 15**).

La différenciation du tractus génital se déroule entre E14,5 et E17,5 chez la souris (Mullen and Behringer, 2014) et entre la 8^{ème} et la 10^{ème} SD chez l'homme (Jirásek, 1977) et repose en grande partie sur des sécrétions testiculaires dont les androgènes et l'AMH.

La différenciation des organes génitaux externes est sous le contrôle des androgènes. Les tissus dont le développement est androgène-dépendant peuvent être subdivisés entre ceux qui requièrent l'action de la testostérone et ceux qui requièrent l'action d'un de ses métabolites : la *5 α -dihydrotestosterone* (DHT). Ces 2 hormones agissent sur le même récepteur (Kim et al., 2002). La testostérone induit le maintien et la différenciation des canaux de Wolff en vésicules séminales, canaux déférents et épидидymes, en coopération avec d'autres facteurs (Hannema and Hughes, 2007), tandis que la DHT induit la formation des organes génitaux externes, de l'urètre et de la prostate (Wilson, 1983; Shaw and Renfree, 2014). Un défaut de la production ou de la réponse aux androgènes mènent à des défauts plus ou moins sévères de la différenciation du tractus génital mâle (Scott et al., 2009; Auchus and Miller, 2012; Flück and Pandey, 2014). Par exemple, la perturbation de la production ou de la signalisation de la DHT peut entraîner une altération de la différenciation de l'urètre, conduisant à une pathologie appelée hypospadias (Cunha et al., 2015) (détaillée dans la partie consacrée aux malformations congénitales). Chez la souris, la voie alternative de production de DHT, qui ne passe pas par la synthèse de testostérone, est d'ailleurs essentielle à la masculinisation fœtale (Flück et al., 2011).

Dans le fœtus mâle, parallèlement au maintien et à la différenciation des canaux de Wolff, les canaux de Müller régressent. La régression des canaux de Müller est permise grâce à la

Ecosystems

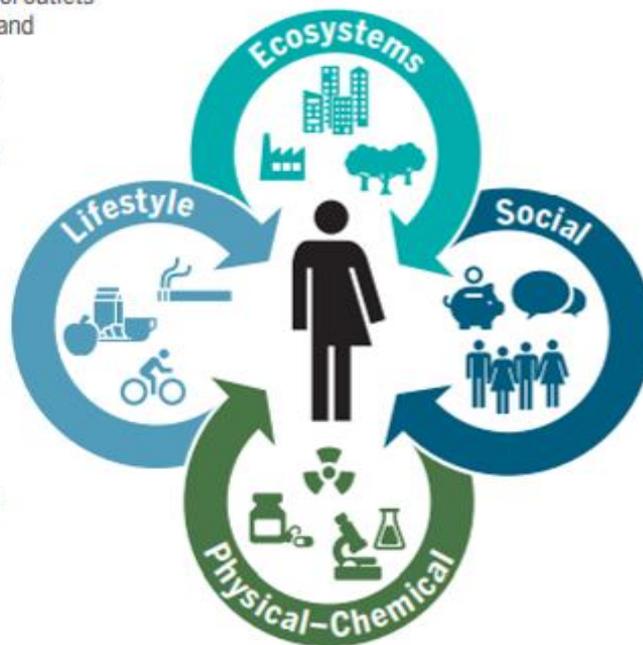
Food outlets, alcohol outlets
Built environment and urban land uses
Population density
Walkability
Green/blue space

Lifestyle

Physical activity
Sleep behavior
Diet
Drug use
Smoking
Alcohol use

Social

Household income
Inequality
Social capital
Social networks
Cultural norms
Cultural capital
Psychological and mental stress



Physical-Chemical

Temperature/humidity
Electromagnetic fields
Ambient light
Odor and noise
Point, line sources, e.g. factories, ports
Outdoor and indoor air pollution
Agricultural activities, livestock
Pollen/mold/fungus
Pesticides
Fragrance products
Flame retardants (PBDEs)
Persistent organic pollutants
Plastic and plasticizers
Food contaminants
Soil contaminants
Drinking water contamination
Groundwater contamination
Surface water contamination
Occupational exposures

Figure 16 : Le concept d'exposome (tiré de Vermeulen et al., 2020).

D'abord limité aux expositions chimiques environnementales, la notion d'exposome intègre maintenant l'ensemble des expositions de tous types auquel un individu est soumis au cours de sa vie

sécrétion de l'AMH par les cellules de Sertoli (Hannema and Hughes, 2007; Moses and Behringer, 2019). Un défaut de la production ou de la signalisation de l'AMH est à l'origine d'une pathologie appelée cryptorchidie (Virtanen and Toppari, 2008) (également détaillée dans la partie consacrée aux malformations congénitales).

Le bon déroulement de toutes les étapes de l'ontogenèse testiculaire est primordial pour assurer la physiologie testiculaire et la fertilité chez l'homme adulte. Une période précise du développement a été décrite, initialement chez le rat, appelée « fenêtre de programmation masculine » (Welsh et al., 2008). Au cours de cette période, un défaut de production ou d'action des différentes hormones peut entraîner le développement de perturbations reproductives évoquées plus haut dont des malformations congénitales, comme la cryptorchidie et l'hypospadias, une altération des paramètres spermatiques mais aussi le cancer testiculaire. Ce défaut peut être d'ordre génétique mais peut également découler d'expositions environnementales.

C) Effet de l'environnement sur la santé reproductive

1. Exposome : exemple des perturbateurs endocriniens

L'ensemble des expositions auxquelles un individu est exposé, et ce depuis la vie foetale est défini sous le nom « d'exposome » (Wild, 2005). La définition est maintenant étendue à une exposition au sens large à une multitude de facteurs de toutes catégories (Vermeulen et al., 2020). On peut ainsi citer des facteurs physico-chimiques (comme les expositions à des produits phytosanitaires ou à différents plastiques) et des facteurs dépendants de l'éco-système environnant (comme les aménagements urbains ou la densité de population) mais aussi des facteurs dépendants du mode de vie (comme la qualité du sommeil ou le régime alimentaire) et des facteurs sociaux (comme les relations sociales et le revenu) (**Figure 16**).

Depuis le début du XX^{ème} siècle, le développement du secteur industriel et de la recherche ont conduit au fait que les humains (ainsi que la faune sauvage et domestique)

sont exposés à de plus en plus de substances chimiques. Ces substances sont d'origine et d'usage variés. On peut citer des composés utilisés dans l'industrie (plastifiants, retardateurs de flamme), dans l'agriculture (pesticides, fongicides, insecticides) et dans des produits de consommation courante (cosmétiques, emballages, médicaments).

En conséquence, les femmes enceintes sont exposées de manière quotidienne à un ensemble de substances chimiques selon plusieurs voies d'exposition (inhalation, ingestion, transdermale...) qui peuvent potentiellement atteindre le fœtus, exposé aux composés circulants chez la mère (Rager et al., 2020). L'exposition du fœtus à différents composés dépend en grande partie du placenta. Outre son rôle hormonal, immunorégulateur et transporteur des nutriments et des déchets de la mère au fœtus et vice-versa, cette structure régule l'accès de nombreuses molécules de la mère au fœtus. Le niveau d'exposition du fœtus va dépendre entre autres des capacités du placenta à filtrer des molécules selon leurs propriétés physico-chimiques (charge, solubilité, taille...), de ses capacités de métabolisation, et de l'existence de transports actifs permettant d'exclure des composés hors du compartiment fœtal. Malgré l'importance du rôle de barrière du placenta, il a été rapporté que plusieurs composés chimiques, dont des substances toxiques, pouvaient atteindre le fœtus et avoir des effets négatifs sur ce dernier (Barr et al., 2007). Le passage transplacentaire peut modifier la concentration du composé étudié, la durée d'exposition mais également sa nature, si ce sont ses métabolites qui atteignent le fœtus.

Plusieurs substances chimiques ont été identifiées comme affectant la fonction de reproduction mâle (Petrelli and Mantovani, 2002). Certains composés ont un effet toxique sur les cellules, affectent leur métabolisme et/ou jouent sur leur épigénome. Certaines substances sont capables d'interférer avec le système endocrinien et sont désignés sous le terme de perturbateurs endocriniens (PE) (Kabir et al., 2015; Monneret, 2017; Barouki, 2017). Parmi plusieurs définitions, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit en 2002 un PE comme « une substance ou un mélange de substance altérant la fonction du système endocrinien avec pour conséquence des effets néfastes sur l'organisation, sa descendance ou des (sous)-populations ». Les PE peuvent agir sur la synthèse des hormones, leur sécrétion par la cellule, leur transport, leur métabolisation, ainsi que leur signalisation dans les cellules cibles (La Merrill et al., 2020). Leurs voies d'exposition sont multiples, les trois principales étant la voie respiratoire, la voie digestive et la voie cutanée. L'Union

Européenne a reconnu environ 200 composés comme PE avérés chez l'homme (<https://edlists.org/the-ed-lists/list-i-substances-identified-as-endocrine-disruptors-by-the-eu>). Parmi les PE, on trouve des molécules naturelles, issues de végétaux, des produits pharmaceutiques, phytosanitaires, de combustion ou encore des molécules à usage domestique ou industriel (Keith, 1998). On peut ainsi citer le bisphénol A contenu dans des contenants alimentaires (Rubin, 2011), certains parabènes contenus dans des cosmétiques (Boberg et al., 2010), des pesticides utilisés dans l'agriculture comme le dichlorodiphényltrichloéthane (DDT) (Safe, 2020), des retardateurs de flamme utilisés dans l'industrie textile (Mughal and Demeneix, 2017), des phtalates issus de l'industrie plastique et cosmétique (Benjamin et al., 2017) mais aussi des principes actifs de médicaments couramment utilisés, comme les analgésiques (Kristensen et al., 2016). L'étude des PE reste complexe. Ces molécules sont en effet capables d'induire des effets à faible dose, d'entraîner des courbes effets/doses non monotones, de révéler des effets longtems après l'exposition et de produire des effets très différents selon s'ils sont considérés seuls ou en mélange (Vandenberg et al., 2013).

Plusieurs études ont montré que certains PE affectent la fonction de reproduction chez l'homme (Meeker, 2010; Adamo et al., 2011; Sweeney et al., 2015; Sifakis et al., 2017; Lympéri and Giwerzman, 2018), ayant même des effets sur plusieurs générations (Brehm and Flaws, 2019). De la même façon, d'autres groupes ont montré qu'une exposition lors du développement fœtal à des PE entraînent des effets néfastes sur la fonction de reproduction, révélés pour certains seulement à l'âge adulte (Rouiller-Fabre et al., 2014; Bonde et al., 2016a; Kilcoyne and Mitchell, 2019a; Cargnelutti et al., 2021). Les effets néfastes d'un PE dépendent entre autres de la durée et de la période d'exposition. Le développement testiculaire fait intervenir une multitude de types cellulaires et de facteurs de régulation endocrines, paracrines et même physiques. Cette période cruciale de mise en place des fonctions reproductrices, contrôlée en partie génétiquement, est hautement sensible à l'environnement, et ce dès les premières étapes de la différenciation gonadique (Koopman, 2010). Evoquée plus haut chez le rat, une fenêtre d'exposition particulièrement sensible aux expositions environnementales, dont les PE, est la période de masculinisation du système reproducteur mâle (Welsh et al., 2008; Scott et al., 2009; van den Driesche et al.,

2017). Elle correspondrait à la période de 8 à 14 SD chez l'homme (van den Driesche et al., 2017).

Parallèlement à l'augmentation du nombre de substances chimiques, potentiellement PE, présentes dans l'environnement, il a été décrit dans la faune sauvage puis chez l'homme une augmentation de la fréquence des troubles de plusieurs fonctions physiologiques dont la reproduction. Parmi ces troubles, le cancer testiculaire, la diminution de la concentration spermatique et 2 malformations congénitales, l'hypospadias et la cryptorchidie, trouveraient leur origine au cours de la vie fœtale et auraient des étiologies étroitement liées.

2. Augmentation des troubles de la santé reproductive mâle

a) Le cancer du testicule

Le cancer du testicule est un cancer relativement rare dans la population générale, représentant entre 1 et 1,5% des cancers dans le monde (Ferlay et al., 2015). Il a représenté 1,2% des cancers au cours de l'année 2020 en Europe (Dyba et al., 2021). Les taux d'incidence les plus élevés sont retrouvés dans les pays Nordiques, en particulier le Danemark et la Norvège et les plus faibles en Asie et en Afrique (Purdue et al., 2005; Chia et al., 2010; Znaor et al., 2014). Malgré sa relative faible incidence, il est le cancer le plus fréquent chez l'homme entre 15 et 40 ans. Le cancer testiculaire est un cancer dont le diagnostic et les traitements sont bien décrits et présente un haut taux de survie (>95%) (Baird et al., 2018; Smith et al., 2018).

Les tumeurs testiculaires les plus fréquentes (95-98%) sont des tumeurs testiculaires des cellules germinales (*Testicular germ cell tumor*, TGCT en anglais) (Rajpert-De Meyts et al., 2016; Cheng et al., 2018; Batool et al., 2019). La classification de l'OMS en 2016 distingue 2 sous-groupes de TGCT : les TGCT dérivées de néoplasies germinales *in situ* (*Germ cell neoplasia in situ*, GCNIS en anglais), trouvées auparavant dans la littérature sous les

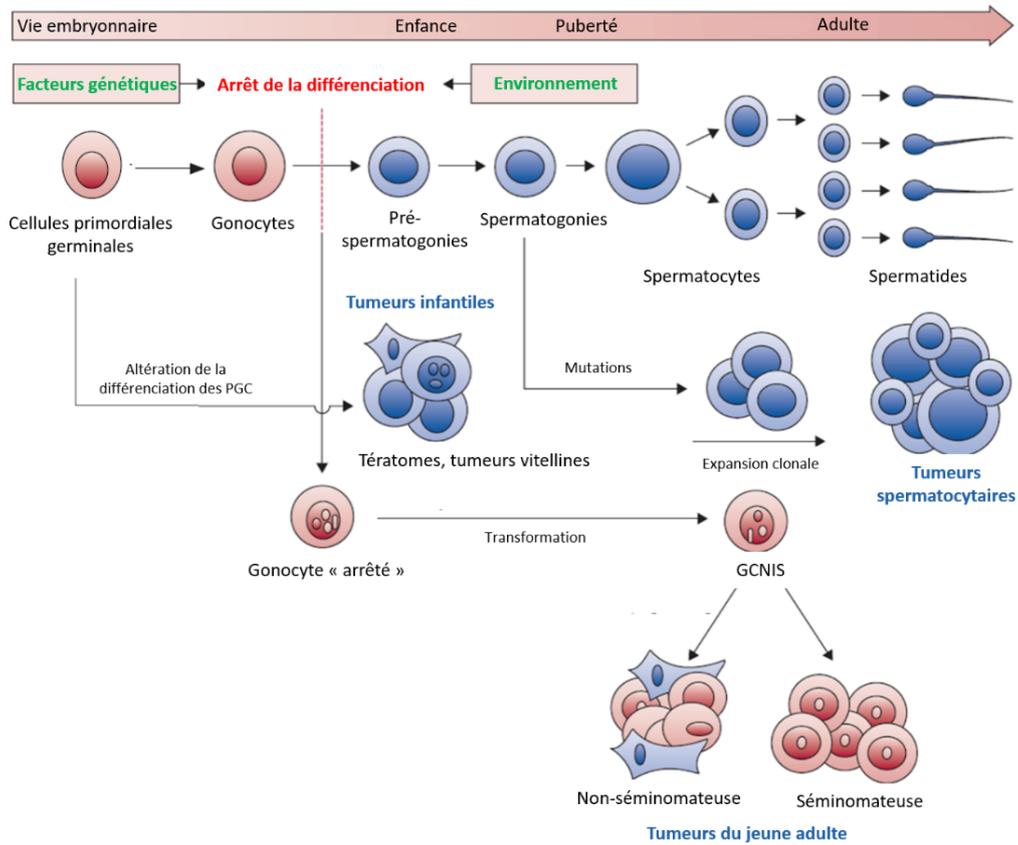
dénomination carcinome *in situ* (CIS) ou *Intratubular germ cell neoplasia, unclassified* (IGCNU), qui représentent 90% des TGCT et celles qui ne sont pas dérivées des GCNIS (Moch et al., 2016; Cheng et al., 2017; Tourne et al., 2019).

Parmi les TGCT non dérivées des GCNIS, on distingue les tératomes et les tumeurs vitellines (anciennement les TGCT de type I dans la littérature (Oosterhuis and Looijenga, 2005) qui sont des tumeurs pré-pubertaires, et les tumeurs spermatocytaires (anciennement les TGCT de type III), survenant chez l'homme âgé.

Les TGCT issues de GCNIS (anciennement les TGCT de type II) sont subdivisées en 2 types : les TGCT séminomateuses et les TGCT non séminomateuses. Les TGCT séminomateuses sont identifiées dans 50-60% des diagnostics de TGCT issues de GCNIS, à un âge médian de 35 ans et elles sont composées exclusivement de cellules germinales ressemblant aux cellules germinales fœtales et aux GCNIS (des structures appelées séminomes). Les TGCT non séminomateuses représentent 40-55% des diagnostics des TGCT issues de GCNIS, à un âge médian de 25 ans. Elles se forment à partir de carcinomes embryonnaires, formés de cellules germinales très indifférenciées. Les carcinomes embryonnaires peuvent ensuite se différencier en plusieurs types cellulaires et former des structures très hétérogènes. Une TGCT non séminomateuse peut ainsi contenir des composantes somatiques (les tératomes), germinales (tumeurs vitellines), extra-embryonnaires (choriocarcinomes) et des carcinomes embryonnaires restés en l'état. Il n'est pas rare de trouver les deux types de TGCT chez un même patient. De plus, il a été montré que les TGCT séminomateuses peuvent dériver en TGCT non séminomateuses, ces dernières étant des tumeurs plus agressives et moins sensibles aux traitements anti-cancéreux que les TGCT séminomateuses (Facchini et al., 2019).

Au contraire de l'homme, les rongeurs ne développent pas de GCNIS (Walt et al., 1993) (Oosterhuis and Looijenga, 2005). De rares souches de souris consanguines développent des tumeurs spontanément mais il s'agit de tératomes, dérivés de carcinomes embryonnaires (Stevens and Little, 1954; Stevens and Hummel, 1957; Stevens, 1973). Ces structures correspondent en fait aux tératomes pré-pubertaires (TGCT de type I) chez l'homme. Afin d'étudier les TGCT issus de GCNIS, des modèles de lignées cellulaires existent pour les TGCT séminomateuses (Mizuno et al., 1993; Eckert et al., 2008; de Jong et al., 2008) et les TGCT non séminomateuses (Andrews et al., 1984; Teshima et al., 1988). S'agissant de

(A)



(B)

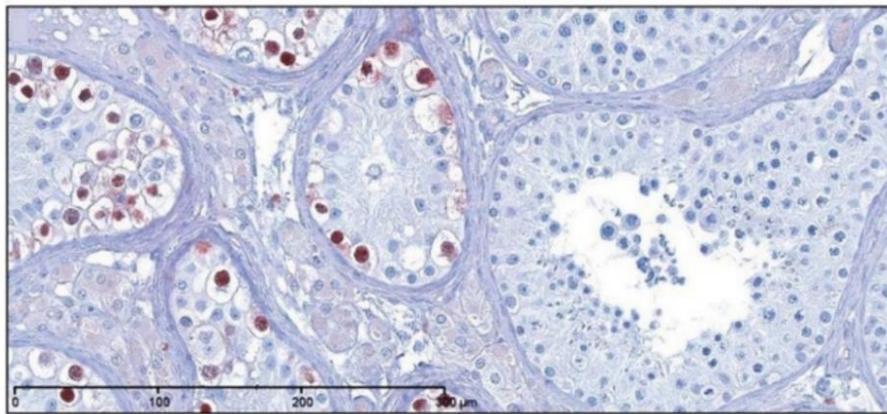


Figure 17 : Le cancer testiculaire chez l'homme.

(A) **Modèle de développement des différentes tumeurs germinales testiculaires** (modifié à partir de Rajpert-De Meyts et al., 2015). Les tumeurs de l'enfant (tératomes, tumeurs vitellines), de l'homme adulte (spermatocytaires) et du jeune adulte (issues de GCNIS) dérivent d'une perturbation des cellules germinales, à différents stades de différenciation. (B) **Photo d'une immunohistochimie d'une coupe de testicule humain adulte marquant les GCNIS** (tiré de Skakkebaek et al., 2016). Dans certains tubes séminifères, adjacents à des tubes séminifères normaux, on distingue des GCNIS (noyaux marron, marqués par un anticorps dirigé contre POU5F1).

cellules transformées, l'étude des mécanismes de tumorigenèse peut s'en trouver limitée, selon la question biologique.

Le phénotype des GCNIS est relativement bien caractérisé (Dieckmann and Skakkebaek, 1999; Rørth et al., 2000; Rajpert-De Meyts et al., 2003). Concernant leur provenance, peu après leur découverte en 1972 (Skakkebaek, 1972), il avait été suggéré que les GCNIS, dériveraient de gonocytes dont la différenciation aurait été altérée (Skakkebaek et al., 1987; Jørgensen et al., 1995; Rajpert-De Meyts et al., 1998). Chez l'humain, les gonocytes se différencient en pré-spermatogonies au cours du développement fœtal et des premiers mois post-natals. Une perturbation de la différenciation à un moment clé du développement gonadique (Jørgensen et al., 2013) peut retarder la différenciation des gonocytes et les rendre plus susceptibles à la transformation (Dolci et al., 2015) (**Figure 17 A**). Ces CGNIS resteraient en quiescence pendant la vie fœtale et l'enfance des individus, pouvant accumuler des mutations supplémentaires, jusqu'à une ré-activation à partir de la puberté, qui mèneraient à une progression maligne des GCNIS en TGCT (Looijenga et al., 2011).

Depuis, de nombreux arguments viennent étayer l'hypothèse que les GCNIS seraient en fait des gonocytes dont la différenciation aurait été altérée (Rajpert-De Meyts and Hoei-Hansen, 2007; Baroni et al., 2019), en particulier des études ayant rapporté l'expression de marqueurs protéiques spécifiques (Honecker et al., 2004) et des données transcriptomiques (Sonne et al., 2009). Les GCNIS présentent ainsi un profil génique ressemblant à celui des PGC et des gonocytes et expriment des gènes spécifiques des cellules germinales et d'autres associés à la pluripotence, à l'état indifférencié, au développement tumorigène, à la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. On peut citer les facteurs *PR/SET domain 1* (PRDM1, aussi connu sous le nom de BLIMP1), *MAGE family member A4* (MAGEA4), *DEAD-box helicase 4* (DDX4), *Testis-specific protein Y-encoded* (TSPY), *Placental-like alkaline phosphatase* (PLAP), C-KIT et son ligand SCF, *Sry-related HMG box17* (SOX17), *POU class 5 homeobox 1* (POU5F1, aussi connu sous le nom de OCT3/4) (**Figure 17 B**), *Homeobox NANOG* (NANOG), *Lin-28 Homolog A* (LIN28), AP-2 γ (aussi trouvé sous le nom de *Transcription factor AP-2 gamma*, TFAP2C), *Glutathione S-transferase* (GST) et CD44 (Honecker et al., 2004; Looijenga et al., 2014; Rajpert-De Meyts et al., 2015; Nettersheim et al., 2016). Une diminution de l'expression de cyclines du cycle cellulaire ainsi que de certains suppresseurs de tumeurs comme *Tumeur protein p53* (TP53) et *RB transcriptional corepressor 1* (RB1,

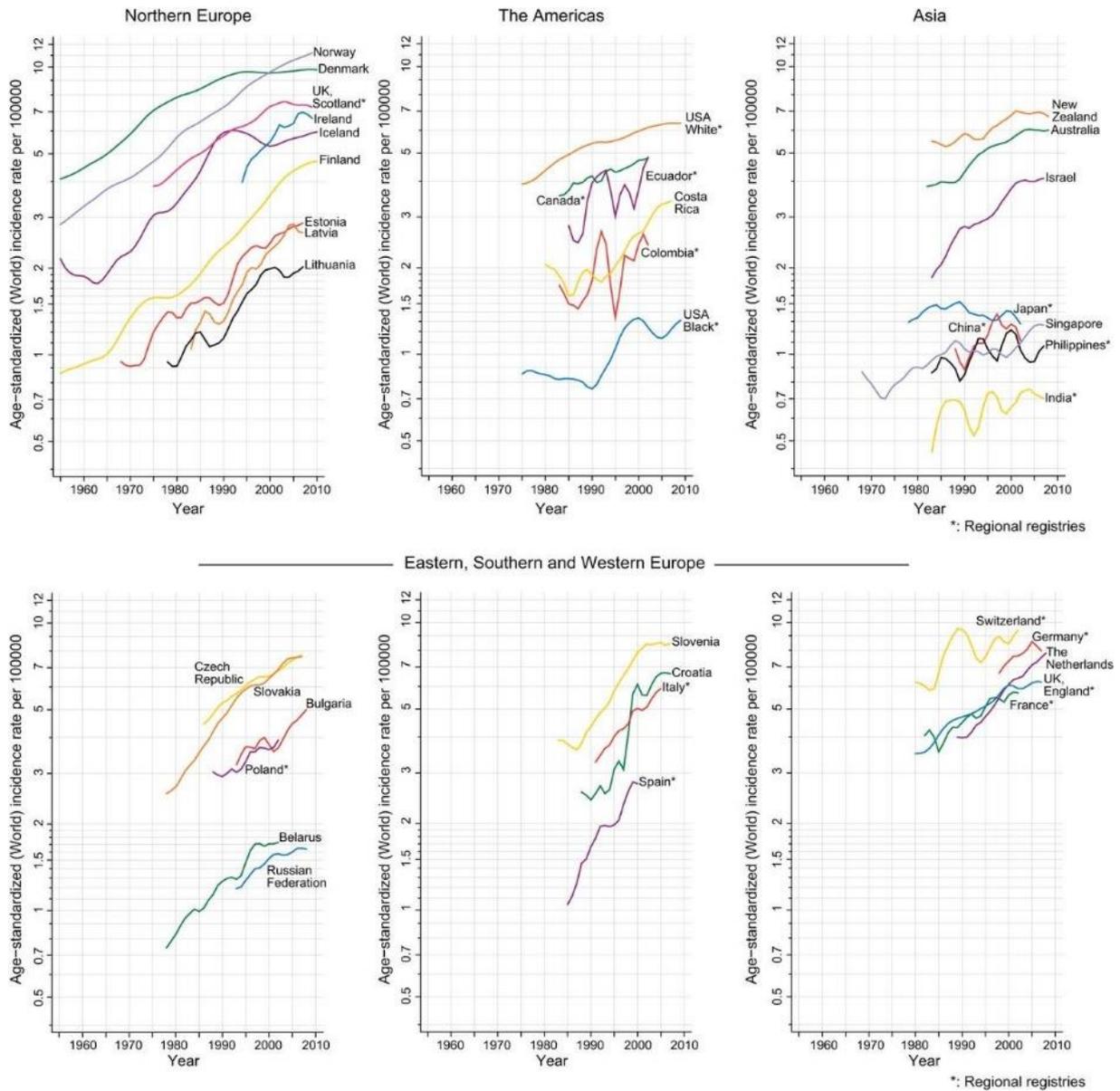


Figure 18 : Tendances de l'incidence du cancer testiculaire dans le monde entre 1960 et 2010 (tiré de Skakkebaek et al., 2016).

Le taux d'incidence du cancer testiculaire est en augmentation dans le monde ces 50 dernières années. La Norvège et le Danemark sont les pays qui présentent le plus haut taux d'incidence.

anciennement connu sous le nom de rétinoblastome, Rb) a également été observée. De façon physiologique, le génome des PGC/gonocytes est hautement déméthylé puis il se méthyle de façon concomitante à la différenciation en pré-spermatogonies. A l'inverse, les GCNIS sont caractérisés par une rétention de la déméthylation, pouvant favoriser l'apparition de mutations et d'anomalies caryotypiques lors de la division cellulaire (Almstrup et al., 2010; Kristensen et al., 2014). Il a été observé une grande hétérogénéité des profils transcriptomiques des GCNIS, potentiellement reliée au stade de différenciation auquel la différenciation s'est arrêtée et corrélée avec leurs capacités de prolifération et d'invasion (Rajpert-De Meyts et al., 1998; Mitchell et al., 2014). Il est également possible de distinguer les TGCT séminomateuses des TGCT non séminomateuses par l'expression différentielle de certains marqueurs (Alagaratnam et al., 2011; Chieffi and Chieffi, 2013; von Eyben and Parraga-Alava, 2020a).

L'incidence (nombre de nouveaux cas par an dans une population donnée) du cancer testiculaire (causé par des TGCT issues de GCNIS) est en augmentation ces dernières décennies dans le monde (Huyghe et al., 2003; Nigam et al., 2015; Znaor et al., 2014; Trabert et al., 2015; Gurney et al., 2019) (**Figure 18**) et il est estimé qu'il va continuer d'augmenter (Le Cornet et al., 2014).

b) Malformations congénitales : cryptorchidie et hypospadias

La cryptorchidie et l'hypospadias sont les pathologies congénitales les plus fréquentes chez les nouveau-nés garçons (pour revue : Hutson, 2000; Rodprasert et al., 2020).

A la naissance, les testicules sont normalement en position extra-abdominale dans le scrotum grâce au processus de descente testiculaire au cours de la vie fœtale décrit plus haut. La cryptorchidie est une pathologie pour laquelle un ou les deux testicules ne sont pas descendus dans le scrotum. Elle affecte 2 à 9% des nouveau-nés garçons (Virtanen and Toppari, 2008). Les facteurs clés de la descente testiculaire sont la sécrétion de testostérone et d'INSL3, sécrétée par les cellules de Leydig. Un défaut de la production ou de la

signalisation de ces facteurs peut entraîner une cryptorchidie. Le diagnostic de la cryptorchidie est étroitement lié à l'infertilité et au risque de développer un cancer testiculaire (Schnack et al., 2010; Trabert et al., 2015; Virtanen and Toppari, 2015). De plus, de la même façon que le cancer testiculaire, les données épidémiologiques montrent une augmentation globale de son incidence dans le monde (Paulozzi, 1999; Toppari, 2001).

La localisation physiologique de l'ouverture (ou méat) urétral est sur le haut du gland du pénis. L'hypospadias est un défaut de cette localisation, entraînant la position du méat sur la face ventrale du pénis, au niveau du scrotum ou du périnée selon le degré de sévérité de la

pathologie. Sa prévalence est entre 0,2 et 1%. La différenciation des organes génitaux externes, dont le développement du pénis et la fermeture urétrale, a lieu au cours du premier trimestre chez l'homme. Elle dépend fortement de la signalisation de la DHT, convertie à partir de la testostérone, qui se fixe sur l'AR. Une perturbation de l'action et/ou de la signalisation des androgènes joue un rôle dans l'apparition de ce trouble. L'hypospadias serait significativement associée avec le risque de cryptorchidie (Weidner et al., 1999). Malgré des différences entre les pays, l'incidence de l'hypospadias serait également globalement en hausse dans le monde (Yu et al., 2019).

c) La diminution de la qualité spermatique

La qualité spermatique dépend de la concentration spermatique ainsi que de la qualité des spermatozoïdes, dont leur morphologie et leur motilité. La diminution de la concentration spermatique, évaluable à partir de la puberté, peut avoir une étiologie adulte et est multifactorielle mais peut également découler d'une perturbation fœtale lors de la mise en place de stock de cellules germinales et/ou de cellules de Sertoli. Il a été montré que, malgré des différences inter-nationales, la concentration spermatique était globalement en diminution des dernières décennies (Levine et al., 2017).

3. Le syndrome de dysgénésie testiculaire

a) Hypothèse d'une origine fœtale commune des altérations reproductives

Suite aux résultats de plusieurs études dans les années 1990, Barker propose le concept de *Developmental origins of health and disease* (DOHAD), qui énonce que des maladies révélées chez l'adulte trouveraient leur origine au cours de la vie fœtale (Barker, 2007). Plus précisément, l'altération dans le développement d'un tissu/organe au cours de fenêtres de sensibilité développementales précises, par des facteurs environnementaux de

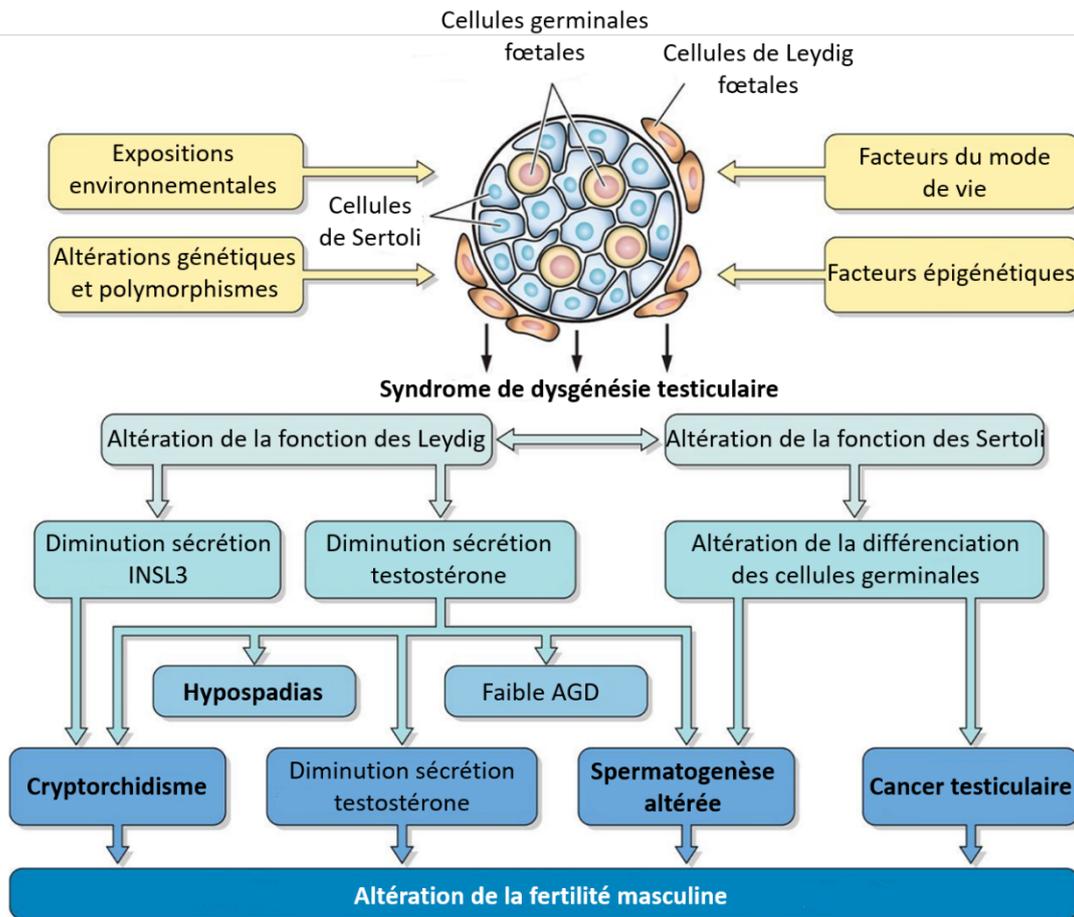


Figure 19 : L'hypothèse du *Testicular Dysgenesis Syndrome* (TDS, syndrome de dysgénésie testiculaire) proposée par le groupe de Niels Skakkebaek (modifié à partir de Skakkebaek et al., 2016).

Le TDS propose une étiologie fœtale commune à plusieurs troubles de la fonction de reproduction masculine. L'altération de la physiologie du testicule causée par différents facteurs (encadrés jaunes), entraîne des altérations de l'activité et/ou de la différenciation des trois principaux types cellulaires du testicule (les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et les cellules germinales). Ces perturbations peuvent entraîner l'apparition de troubles de la santé reproductive (encadrés bleus foncés), révélés à plusieurs moments de la vie. AGD pour *ano-genital distance*, la distance ano-génitale, souvent utilisé comme marqueur d'une dysgénésie gonadique.

tous types (nutritives, chimiques environnementaux, infections, stress...), causerait des prédispositions au développement de maladies chez l'adulte. Il est maintenant admis que le développement fœtal est une période hautement sensible à son environnement et critique, conditionnant la santé chez l'individu adulte.

Ce concept est applicable à la santé reproductive. L'observation d'une tendance mondiale à l'augmentation de l'incidence de plusieurs troubles de la santé reproductive chez le mâle dont l'étiologie semble liée, amène Niels Skakkebaek et son équipe à proposer le concept de *Testicular dysgenesis syndrom* (TDS, syndrome de dysgénésie testiculaire) (Skakkebaek et al., 2001). Dans ce syndrome, des altérations génétiques et/ou une exposition environnementale entraîneraient un défaut de différenciation et/ou d'activité des cellules testiculaires, dont les cellules germinales, les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli, causant une ou plusieurs pathologies liées entre elles chez un même individu (**Figure 19**) :

- un cancer testiculaire, causé par un défaut de la différenciation des cellules germinales fœtales,
- des malformations congénitales : la cryptorchidie et l'hypospadias, causées par un défaut de production/d'action des androgènes et/ou de l'INSL3,
- une réduction du compte/de la concentration spermatique, causée par une altération des stocks de cellules germinales et/ou des cellules de Sertoli.

L'hypothèse de l'existence du TDS reste cependant toujours controversée (Akre and Richiardi, 2009; Thorup et al., 2010).

b) Hypothèse d'une causalité environnementale dans l'apparition de ces troubles

Certains facteurs de risque périnataux (comme le poids de naissance ou la naissance prématurée) ainsi que le mode de vie de la mère ou de l'individu adulte (consommation d'alcool, sédentarité, stress, sommeil, etc.) augmentent les risques de développer les pathologies reproductives précédemment citées. Des facteurs de risque génétiques ont été

identifiés comme impliqués dans l'apparition des TGCT issues de GCNIS (Richiardi et al., 2007; Kanetsky et al., 2009; McGlynn and Cook, 2009; Cook et al., 2010; Sheikine et al., 2012; Mclver et al., 2013; UK Testicular Cancer Collaboration et al., 2017; Fukawa and Kanayama, 2018), dans des cas de cryptorchidie et d'hypospadias (Bouty et al., 2015; Barthold et al., 2016; Kalfa et al., 2019; Elamo et al., 2022) ainsi que pour des altérations de la qualité spermatique. Cependant, ces facteurs de risque génétiques n'expliqueraient qu'une faible proportion de ces cas pathologiques.

Dès 1993, Sharpe et Skakkebaek faisaient l'hypothèse que certaines expositions environnementales seraient des facteurs de risque pour le développement de troubles de la reproduction évoqués plus haut (Sharpe and Skakkebaek, 1993a). Depuis, de plus en plus d'arguments viennent étayer cette thèse (Skakkebaek et al., 2001; Toppari et al., 2010; Skakkebaek et al., 2016a) :

- la vitesse à laquelle l'incidence de ces troubles augmente permet d'exclure qu'une causalité génétique (comme l'apparition de mutations) serait entièrement responsable de ces troubles,
- la corrélation géographique existante entre ces troubles (Serrano et al., 2013),
- les études d'enfants d'individus s'installant dans un autre pays ont montré qu'ils présentaient un risque de développement de TGCT du pays dans lequel les parents avaient immigré (Hemminki and Li, 2002; Myrup et al., 2008),
- plusieurs de ces troubles constituent des facteurs de risque pour les autres (comme par exemple la cryptorchidie pour le cancer testiculaire),
- des études dans des modèles animaux et plusieurs méta-analyses de données épidémiologiques de grande ampleur chez l'homme ont depuis montré l'association entre une exposition pendant la vie fœtale à certains PE et l'apparition des troubles mentionnés (Sharpe and Skakkebaek, 2003; Sharpe, 2006; Rouiller-Fabre et al., 2014; Sweeney et al., 2015; Bonde et al., 2016a; Lympéri and Giwercman, 2018; Kilcoyne and Mitchell, 2019a; Mattiske and Pask, 2021; Rodprasert et al., 2021).

Au cours du développement testiculaire, le micro-environnement testiculaire est finement régulé par les sécrétions des cellules de Leydig et de Sertoli, et joue un rôle

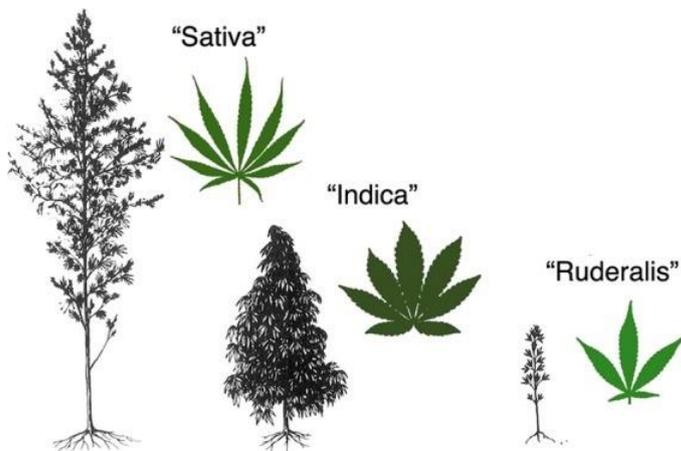
primordial sur la prolifération, l'activité et la différenciation de tous les types cellulaires. Dans l'hypothèse du TDS, une substance environnementale susceptible d'affecter la fonction d'une ou plusieurs de ces cellules, peut entraîner un déséquilibre hormonal et paracrine intra-testiculaire, contribuant à l'apparition de troubles du développement testiculaire, qui seraient révélés autour de la naissance (cryptorchidie et hypospadias) ou chez l'adulte (TGCT et altération de la qualité spermatique).

Il a récemment été mis en évidence qu'un facteur environnemental était corrélé avec l'incidence du cancer testiculaire chez l'homme adulte : la consommation de cannabis (Gurney et al., 2015a; Ghasemiesfe et al., 2019a; Song et al., 2020a).

(A)

Kingdom:	Plantae (plants)
Subkingdom:	Tracheobionta (vascular plants)
Superdivision:	Spermatophyta (seed plants)
Division:	Magnoliophyta (flowering plants)
Class:	Magnoliopsida (dicotyledons)
Subclass:	Hamamelididae
Order:	Urticales
Family:	Cannabaceae
Genus:	<i>Cannabis</i>
Species:	<i>sativa</i>
Taxonomic authority abbreviation:	L.

(B)



(C)

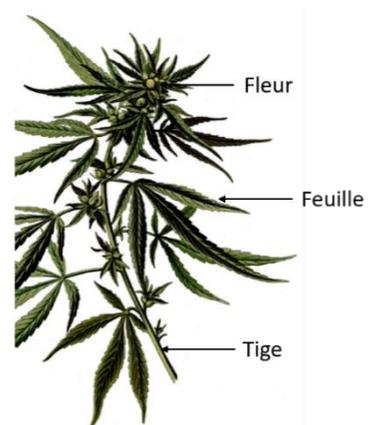


Figure 20 : *Cannabis sativa* L

A) Taxonomie de l'espèce *Cannabis sativa* L (tiré de ElSohly et al., 2017). L'espèce *sativa* est elle-même divisée en sous-espèces dont le nombre diffère selon les études. **B) Proposition de classification de *Cannabis sativa* L en 3 sous-espèces : *sativa*, *indica*, et *ruderalis*** (tiré de McPartland, 2018). Cette classification fait encore débat. **C) Illustration d'une partie d'un plant de *Cannabis sativa* L** (modifié à partir de Small, 2015). On distingue les fleurs (qui contiennent les graines), les feuilles et la tige (qui contient la résine).

CHAPITRE II. DES PHYTOCANNABINOÏDES AUX ENDOCANNABINOÏDES

A) Description

1. Taxonomie

Le cannabis appartient à la famille des *Cannabaceae* et au genre *Cannabis* qui comprend, de façon communément acceptée, une seule espèce : *Cannabis sativa* L (Pollio, 2016; McPartland, 2018) (**Figure 20 A**). L'espèce est elle-même divisée en sous espèces dont le nombre et la classification font encore débat actuellement parmi les botanistes, des siècles d'hybridation ayant complexifié les critères de distinction. La classification de Small et Cronquist (Small and Cronquist, 1976) propose deux sous-espèces : *Cannabis sativa* subsp *sativa* et *Cannabis sativa* subsp *indica*, elles-mêmes divisées en variétés (Small, 2015) tandis que d'autres groupes en proposent trois : *Cannabis sativa* subsp *sativa*, *Cannabis sativa* subsp *indica* et *Cannabis sativa* subsp *ruderalis* (Zhang et al., 2018) sur des critères génétiques, morphologiques, de composition et de lieu d'habitat naturel (**Figure 20 B**).

Le terme « cannabis », tel qu'il est employé dans le langage courant décrit en fait les variétés de la sous-espèce *Cannabis sativa* subsp *indica*, appelées « sativa » et « indica » dans le commerce de stupéfiants, et utilisées pour leurs propriétés psychoactives et/ou médicinales. L'espèce *Cannabis sativa* L contient aussi des sous-espèces utilisées pour une variété d'autres usages, par exemple comme source de nourriture ou comme le chanvre, utilisé pour ses fibres textiles.

Selon l'usage, les fleurs, la résine, les feuilles, et les tiges peuvent être utilisées (ElSohly et al., 2017) (**Figure 20 C**)

2. Composition

La composition de cannabis est décrite dans plusieurs revues (Turner et al., 1980; ElSohly and Slade, 2005) et fait régulièrement l'objet d'identification de nouveaux composés (ElSohly et al., 2017). A la date où est rédigé ce manuscrit, 565 composés de *Cannabis sativa* L ont été identifiés. Parmi ces composés, 125 sont des cannabinoïdes, faisant d'eux la classe de composés majoritaire du cannabis (Radwan et al., 2021; Salehi et al., 2022). Produits par la plante, on les appelle « phytocannabinoïdes », par opposition aux « endocannabinoïdes », produits de manière endogène par de nombreuses espèces animales dont l'homme (décrits plus dans le paragraphe consacré au système des endocannabinoïdes de ce chapitre). Les phytocannabinoïdes, caractérisés par un squelette tarpénophénolique à 21 carbones, sont divisées en 11 classes, chacune définie par une molécule représentative (Hanuš et al., 2016; Radwan et al., 2021) :

- le cannabichromène (CBC)
- le cannabidiol (CBD)
- le cannabielsoin (CBE)
- le cannabigerol (CBG)
- le cannabicyclool (CBL)
- le cannabinoïde (CBN)
- le cannabinoïde (CBND)
- le cannabitrinol (CBT)
- le (-)- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)
- le (-)- Δ^8 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC)
- les autres types

En plus de la molécule représentative, chaque classe contient les différents isomères de cette molécule ainsi que ses précurseurs et ses produits de dégradation.

Cannabis sativa L contient également des terpènes, des composés phénoliques, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des acides gras et des composés azotés parmi d'autres composés (Leghissa et al., 2018; Radwan et al., 2021). Il a été montré que ce sont les terpènes, classe la plus représentée après les cannabinoïdes, qui donnent le goût et l'odeur caractéristiques du

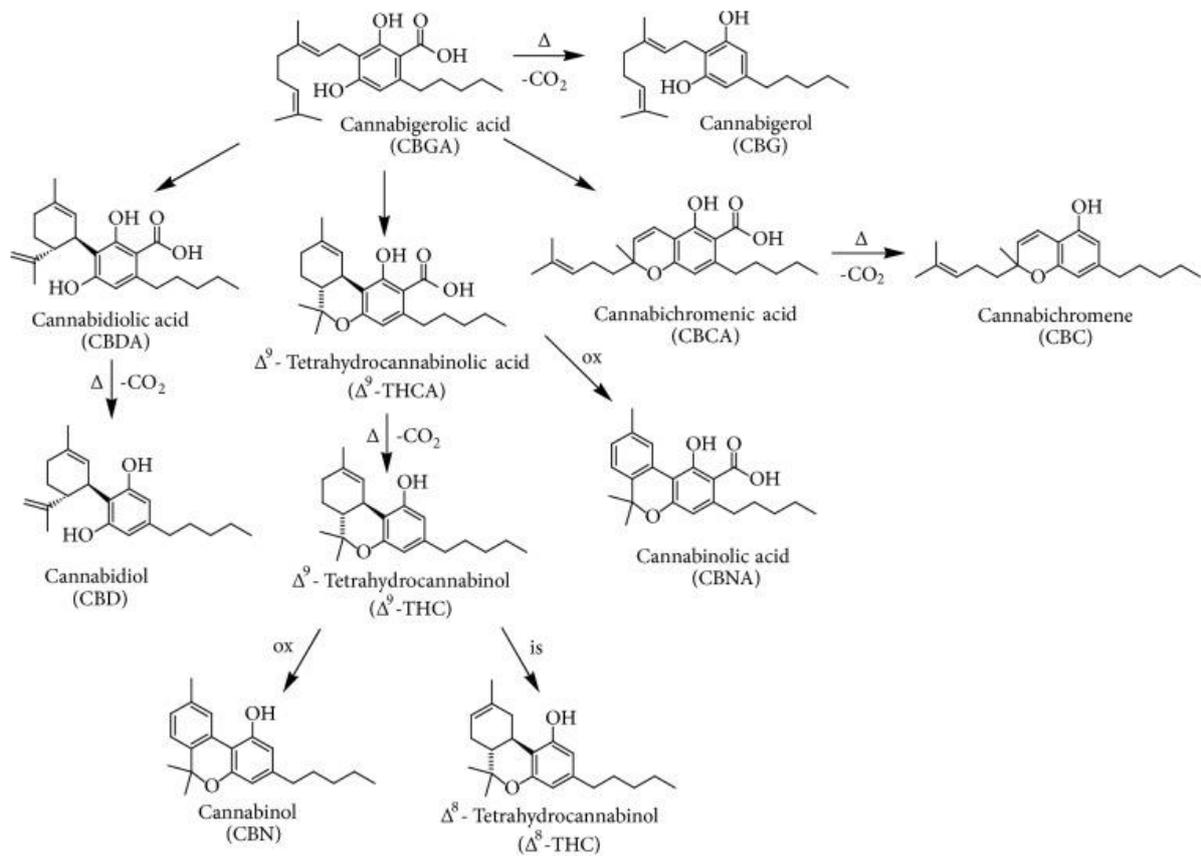


Figure 21 : Voies de synthèse de plusieurs phytocannabinoïdes de *Cannabis sativa L* (tiré de Pellati et al., 2018).

Les phytocannabinoïdes sont synthétisés et stockés sous forme acide par la plante, puis subissent une décarboxylation sous l'effet d'une forte chaleur (Δ) et du temps. Le CBGA, le CBDA, le CBCA et le Δ^9 -THCA sont les phytocannabinoïdes primaires synthétisés par la plante. Les autres phytocannabinoïdes dérivent de ces derniers sous l'effet de la chaleur (Δ), du dioxyde de carbone (CO_2), de l'oxygène (ox) ou par un processus d'isomérisation (is).

cannabis. Il a été montré que les terpènes sont capables de moduler certains effets des phytocannabinoïdes (Russo, 2011; Singh and Sharma, 2015; Booth and Bohlmann, 2019; Sommano et al., 2020; Gonçalves et al., 2020).

Les phytocannabinoïdes (et les terpènes en plus faible quantité) sont trouvés dans la résine produite par des glandes sécrétoires spécifiques de la plante de cannabis (appelés poils ou trichomes) (Tanney et al., 2021). Dans la consommation de cannabis récréationnel, on distingue la consommation des petites feuilles (bractées) et des fleurs (retrouvées sous le nom de bourgeons floraux et inflorescences) séchées, sous le nom de « marijuana » et la consommation de préparation de résine purifiée sous le nom de « hashish » (Small, 2015).

Dans la plante, les phytocannabinoïdes sont synthétisés et stockés sous leur forme acide (par exemple, *Cannabidiol acid*, CBDA pour le CBD) (Schultz and Haffner, 1960) puis ils sont décarboxylés et retrouvent leur forme neutre sous l'influence d'une forte chaleur ou avec le temps (typiquement au cours de la période de séchage des feuilles) (**Figure 21**). De plus, parmi les phytocannabinoïdes, seulement quatre (sous leur forme acide) sont en fait synthétisés de manière primaire par la plante : le CBG(A) (précurseur des trois autres), le CBD(A), le CBC(A) et le Δ^9 -THC(A) (Hanuš et al., 2016). Les autres phytocannabinoïdes sont obtenus par des processus de transformation non-enzymatiques, comme une exposition à chaleur, au dioxyde de carbone (CO₂), après une oxydation ou une isomérisation (**Figure 21**).

Ainsi, par exemple, l'exposition du Δ^9 -THC aux rayons ultraviolets ou à l'oxygène peut l'oxyder et entraîner la formation de CBN, un phytocannabinoïde possédant environ 10% de l'activité du Δ^9 -THC (Perez-Reyes et al., 1973).

Parmi tous les phytocannabinoïdes, deux d'entre eux ont reçu une attention particulière :

- le Δ^9 -THC, consommé de manière récréationnel car il est responsable en grande majorité des effets psychoactifs du cannabis (Watchel et al., 2002) et qui peut être utilisé dans certaines thérapies,
- le CBD, utilisé de manière récréationnelle et qui présente un intérêt thérapeutique dans de nombreuses pathologies (Izzo et al., 2009).

Si l'environnement et le stade de développement jouent un rôle important dans la composition en phytocannabinoïdes et en autres molécules des plants de cannabis, cette

dernière est surtout sous contrôle génétique (de Meijer et al., 2003; Fernandez et al., 2020; Small, 2015; ElSohly et al., 2017). Ainsi, la composition varie de façon drastique suivant la sous-espèce à laquelle on s'intéresse. Il a été proposé une classification en trois phéno- ou chémotypes selon le ratio des pourcentages de Δ 9-THC et de CBD de la plante d'intérêt (Fetterman et al., 1971; Small and Beckstead, 1973; Pacifico et al., 2006) :

- le chémotype I dit « drug-type » avec un ratio Δ 9-THC/CBD élevé,
- le chémotype II intermédiaire avec un ratio Δ 9-THC/CBD proche de 1,
- le chémotype III dit « fiber-type » avec un ratio Δ 9-THC/CBD faible, avec un maximum de 0,3% de Δ 9-THC (Small et al., 1976).

Lorsque la communauté scientifique s'est intéressée aux récepteurs par lesquels les phytocannabinoïdes exerçaient leurs effets, le système des endocannabinoïdes a alors été mis en évidence.

B) Le système des endocannabinoïdes

1. Description du système et signalisation

Le système des endocannabinoïdes (ECB) est composé de récepteurs, de leurs ligands endogènes, les endocannabinoïdes, et d'enzymes qui synthétisent, transportent et métabolisent les ligands (pour revue : Schurman et al., 2019; Lu and Mackie, 2021).

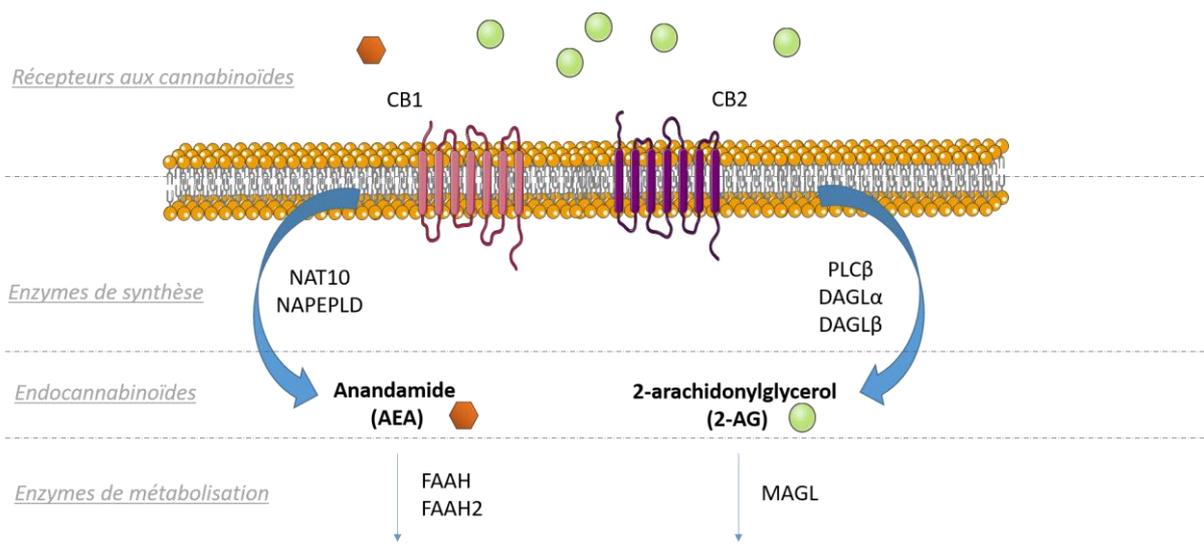


Figure 22 : Le système des endocannabinoïdes (ECB)

L'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG) sont les ligands endogènes (endocannabinoïdes) les mieux caractérisés du système des ECB. Ils sont synthétisés à partir de précurseurs lipidiques issus de la membrane plasmique par différentes enzymes de synthèse et métabolisés par des enzymes en fin de signalisation. Il existe pour chaque endocannabinoïdes des voies de synthèse et de métabolisation alternatives. Les endocannabinoïdes agissent sur plusieurs récepteurs, dont CB1 et CB2 mais aussi sur des récepteurs alternatifs.

a) Les ligands endogènes : les endocannabinoïdes

Il existe 2 grandes familles d'endocannabinoïdes :

- les *N-acylethanolamine* (NAE) comprenant le *N-arachidonoyl ethanolamine* (anandamide, AEA), le *palmitoylethanolamide* (PEA), le *stearoylethanolamide* (SEA), l'*olcoylethanolamide* (OEA), le *linolcoylethanolamide* (LEA), l'*eicosapentatenoylethanolamide* (EPEA) et le *docosahexanoylethanolamide* (DHEA)
- les *monoacylglycerol* comprenant le *2-arachidonoyl glycerol* (2-AG) et le *2-oleoiglycerol* (2-OG)

L'AEA (Devane et al., 1992) et le 2-AG (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995) sont les endocannabinoïdes les plus décrits et étudiés (**Figure 22**)

Ces ligands sont synthétisés « sur demande » à partir de précurseurs lipidiques issus de la membrane plasmique, après une augmentation du calcium intracellulaire dans la plupart des cas. Il a récemment été décrit un système de stockage des endocannabinoïdes dans des cellules neuronales (Gabrielli et al., 2015).

La voie canonique de synthèse de l'AEA se déroule en 2 étapes (Okamoto et al., 2007, 2009) (**Figure 22**) :

- 1) le transfert de la chaîne acyl d'un glycerophospholipide sur un phospholipide membranaire spécifique : un *arachidonoyl phosphatidylcholine*, entraîne la formation d'un phospholipide membranaire : le *N-acylphosphatidylethanolamine phospholipid* (NAPE). Cette réaction est catalysée par l'enzyme *N-acyltransferase 10* (NAT10), dépendante du calcium.
- 2) l'hydrolyse du NAPE par l'enzyme *N-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D-type* (NAPE-PLD), entraîne la formation de l'AEA.

De façon additionnelle à cette voie de synthèse canonique, il existe au moins trois voies de synthèse alternatives, indépendantes de la NAT et/ou de la NAPE-PLD, qui impliquent chacune deux enzymes (Ueda et al., 2013) :

- une voie impliquant la *phospholipase C* (PLC) et la *protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22* (PTPN22) (Liu et al., 2006, 2008)

- une voie impliquant la *phospholipase A2* (PLA2) et la *2-lyso-phospholipase D* (lyso-PLD) (Sun et al., 2004; Tsuboi et al., 2013),
- une voie impliquant l' α/β *hydrolase domain-containing 4* (ABHD4) et la *glycerophosphodiester phosphodiesterase 1* (GDE1) (Simon and Cravatt, 2006, 2010)

Le 2-AG est également produit en 2 étapes (Ueda et al., 2011; Murataeva et al., 2014) (**Figure 22**):

- 1) l'hydrolyse d'un *2-arachinoyl-phosphatidylinositol-4,5-biphosphate* (PIP₂) par l'enzyme PLC entraîne la formation de diacylglycérol (DAG),
- 2) l'hydrolyse du DAG par deux *diacylglycerol lipases* α (DAGL α) et β (DAGL β) entraîne la formation du 2-AG.

Alternativement, il a été montré que le 2-AG peut être produit par une autre voie de synthèse qui implique la *phospholipase A1* (PLA1) suivie de la *lyso-phospholipase C* (lyso-PLC) (Higgs and Glomset, 1994; Sugiura et al., 2002).

Les ECB sont des facteurs paracrines et autocrines. A la fin de la signalisation, les ECB sont métabolisés.

La voie principale de métabolisation de l'AEA passe par les enzymes *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) et *fatty acid amide hydrolase 2* (FAAH2) (Cravatt et al., 1996, 2001; Wei et al., 2006) (**Figure 22**), qui génèrent de l'acide arachidonique (AA) et une éthanolamine. Chez l'homme, FAAH et FAAH2 sont exprimées spécifiquement selon les tissus. FAAH mais pas FAAH2, est exprimée dans le cerveau, le petit intestin et le testicule. FAAH2 à l'inverse est détecté dans le cœur, mais pas FAAH. FAAH et FAAH2 sont détectées dans le rein, le foie, le poumon et la prostate (Wei et al., 2006). Chez la souris, FAAH2 n'est pas exprimée (Wei et al., 2006).

Il existe également d'autres voies de dégradation de l'AEA (Ueda et al., 2013) qui impliquent l'activité de :

- la *cyclooxygenase-2* (COX-2) (Kozak et al., 2002; Rouzer and Marnett, 2011),

- la *5-lipoxygenase* (ALOX5, trouvé aussi sous 5-LOX), la *12-lipoxygenase* (ALOX12 ou 12-LOX), et la *15-lipoxygenase* (ALOX15 ou 15-LOX) (Hampson et al., 1995; van der Stelt et al., 2000),
- plusieurs enzymes P450 comme CYP3A4 et CYP2D6, ainsi que la *cytochrome P450, family 4, subfamily F, member 2* (CYP4F2) et la *cytochrome P450, family 4, subfamily X, member 1* (CYP4X1) (Snider et al., 2010; Urquhart et al., 2015).

Le 2-AG est métabolisé de plusieurs façons. Il est principalement hydrolysé (85% de son hydrolyse dans le cerveau de souris) par l'enzyme *monoacylglycerol lipase* (MAGL) (Dinh et al., 2002; Blankman et al., 2007) et de façon moins importante par les enzymes *α/β -hydrolase domain containing 12* (ABHD12) (9% de son hydrolyse dans le cerveau de souris) et 6 (ABHD6) (4% de son hydrolyse dans le cerveau de souris) (Blankman et al., 2007) ainsi qu'en très faible proportion par la FAAH (Marzo et al., 1998) (**Figure 22**). Il a de plus été montré que le 2-AG peut être hydrolysé par l'enzyme *α/β -hydrolase domain containing 2* (ABHD2), hautement exprimé dans les spermatozoïdes et dans d'autres organes (poumons, cerveau et glandes surrénales) (Miller et al., 2016). L'hydrolyse du 2-AG génère la formation d'AA et de glycérol.

Le 2-AG peut également être métabolisé par l'enzyme COX-2 et certaines enzymes *lipoxygenase* (LOX) (Kozak et al., 2002; Rouzer and Marnett, 2011).

Les enzymes de synthèse et de métabolisation des ECB sont intracellulaires. Or, la majorité des récepteurs des ECB étant membranaires (voir plus bas), les ECB doivent être libérés dans l'espace extracellulaire peu après leur synthèse. De même, à la fin de la signalisation, ils sont réintégrés dans la cellule où ils sont métabolisés. Due à leur nature polaire, les ECB ne passent pas la membrane plasmique et ils ne semblent pas dépendre d'un transport dépendant de l'adénosine tri-phosphate (ATP) ou de l'ion sodium (Na^{2+}) (Nicolussi and Gertsch, 2015). Il a en fait été montré que l'AEA et le 2-AG utiliseraient un transporteur spécifique, l'*endocannabinoid membrane transporter* (EMT) (Chicca et al., 2012). L'EMT permettrait la diffusion facilitée de ces deux ligands, et ce de manière bidirectionnelle, pour entrer et sortir de la cellule. Cette protéine n'est pas encore identifiée et clonée à ce jour. A

noter, la diffusion facilitée étant un phénomène dirigé par des gradients de concentrations, si un processus (par exemple l'administration d'une molécule spécifique) inhibe la dégradation intracellulaire des ECB, la réabsorption des ECB s'en trouvera également affectée.

Le 2-AG constitue un intermédiaire important du métabolisme lipidique car un produit issu de sa dégradation, l'AA, est utilisé dans pour la synthèse de prostaglandines, des messagers pro-inflammatoires (Nomura et al., 2011). L'étape clé de ce rôle du 2-AG passe par l'activité de l'enzyme MAGL, qui régule la dégradation du 2-AG. L'importance du 2-AG dans la régulation du système des ECB et de l'inflammation sont reflétées dans les niveaux de 2-AG dans le cerveau de souris, 1000 fois plus importants que ceux de l'AEA (Schurman et al., 2019).

b) Les récepteurs des cannabinoïdes

(1) Les récepteurs spécifiques aux cannabinoïdes

Il existe 2 récepteurs spécifiques des cannabinoïdes chez l'homme : les *Cannabinoid receptor 1* (CB1) (Matsuda et al., 1990; Gérard et al., 1991) et 2 (CB2) (Munro et al., 1993) (pour revue : Howlett, 2002; Howlett and Abood, 2017; Ye et al., 2019): **(Figure 22)**. Ils présentent 44% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés. CB1 et CB2 sont également retrouvés chez la souris et présentent une forte homologie avec les récepteurs humains (97% et 82% d'homologie dans la séquence d'acides aminés respectivement) (Chakrabarti et al., 1995; Shire et al., 1996). Les propriétés pharmacologiques sont très similaires entre l'homme et les rongeurs mais il existe des variations inter-espèces, notamment au niveau de la liaison des ligands (McPartland et al., 2007).

Chez l'homme, CB1 est enrichi au niveau du système nerveux central et est présent dans des organes et tissus périphériques comme le cœur, le poumon, la rate, les vaisseaux, le thymus, les os, foie, le pancréas, le tissu adipeux ainsi qu'au niveau du système reproducteur (Galiegue et al., 1995). CB1 est impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques dont le métabolisme musculaire, le métabolisme énergétique, les mécanismes de douleurs, ainsi que la fertilité. Il a été mis en évidence chez l'homme,

l'existence de variants d'épissage de CB1, CB1A (Shire et al., 1995) et CB1B (Ryberg et al., 2005) qui présentent des affinités différentes pour certains ligands et activent des voies de signalisation différentes. A noter, ces variants sont exprimés en très faible abondance chez l'homme (<5% des CB1 totaux). Chez la souris, ces variants d'épissage existent aussi (Ruehle et al., 2017).

Les récepteurs CB2 sont exprimés abondamment dans les tissus remplissant une fonction immunitaire comme la rate et le thymus, mais aussi au niveau central et dans d'autres tissus périphériques comme le poumon et le testicule (Galiegue et al., 1995; Van Sickle et al., 2005). Il a également été montré chez l'homme et la souris l'existence d'une autre isoforme de CB2 (CB2A, CB2B étant l'isoforme découverte initialement) (Liu et al., 2009). Chez l'humain, l'isoforme CB2A est hautement exprimée dans le testicule et le cerveau tandis que CB2B est exprimée au niveau périphérique (Liu et al., 2009). Chez la souris, ces spécificités tissulaires ne sont pas observées.

Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et sont composés d'une queue en N-terminal de la protéine, située dans l'espace extracellulaire, de 7 domaines transmembranaires et d'une queue C-terminale intracellulaire (Hilger et al., 2018). Il existe une multitude de RCPG dans le corps, répondant à divers ligands comme les hormones, les neurotransmetteurs, les acides gras ou encore les ions. Selon les ligands, la fixation sur le site actif principal du récepteur (ou liaison « orthostérique ») entraîne différents effets. Ainsi :

- la fixation d'un agoniste entraîne le changement de conformation du récepteur de son état « neutre » (avec une activité basale) vers un état complètement « actif », ce qui induit le déclenchement de voies de signalisation,
- la fixation d'un agoniste partiel entraîne un changement de conformation du récepteur de son état « neutre » vers un état « partiellement actif », entraînant l'activation de certaines voies de signalisation,
- la fixation d'un antagoniste entraîne l'inhibition de la fixation de l'agoniste, laissant le récepteur dans son état « neutre »,
- la fixation d'un agoniste inverse entraîne le changement de conformation du récepteur dans un état « inactif », inhibant l'activité basale du récepteur qu'il possède même en l'absence de ligand.

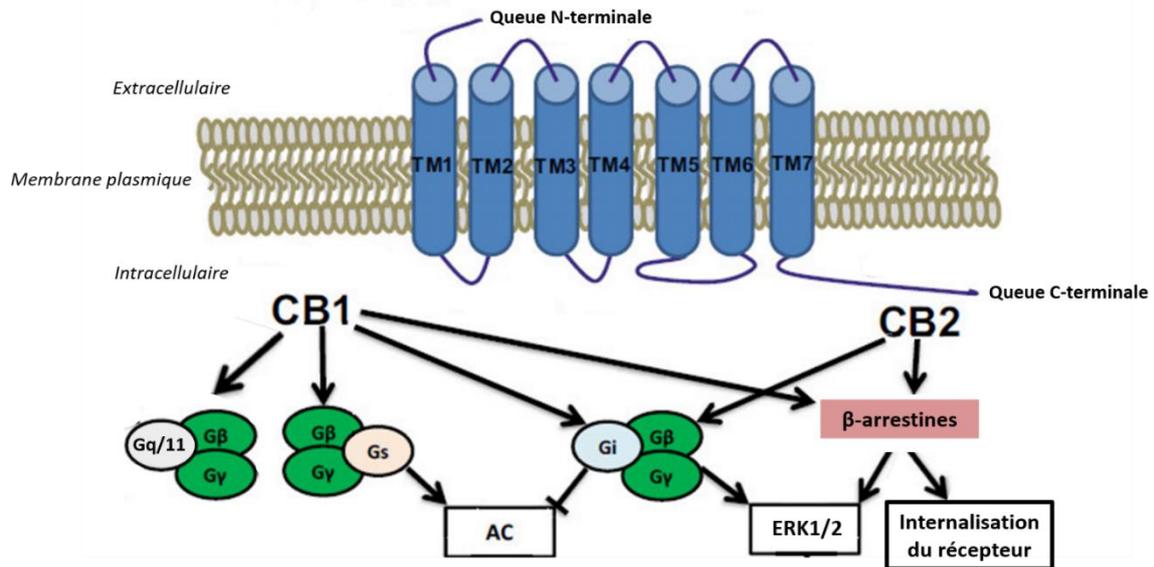


Figure 23 : Schéma des deux récepteurs spécifiques aux cannabinoïdes : *Cannabinoid receptor 1* (CB1) et 2 (CB2) et des principales voies de signalisation activées (modifié à partir de Ye et al., 2019).

Cannabinoid receptor 1 (CB1) et 2 (CB2) sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), composés d'une queue N-terminale située dans l'espace extracellulaire, de 7 domaines transmembranaires (TM) et d'une queue C-terminale intracellulaire. CB1 et CB2 se lient majoritairement avec des protéines Gi (composées d'une sous-unité α_i et de sous-unités $\beta\gamma$), qui inhibent l'*adenylate cyclase* (AC). Il a été montré dans certains cas que CB1 peut se coupler avec des protéines G de type Gs, qui activent l'AC, et avec des protéines G de type Gq/11 qui déclenchent d'autres voies de signalisation. CB1 et CB2 se lie aux β -arrestines, entraînant leur internalisation mais aussi le déclenchement d'autres voies de signalisation dont la voie *extracellular signal regulated kinase-1* et 2 (ERK1/2)

La fixation d'un agoniste (partiel ou non) sur un RCPG entraîne un changement de conformation particulier du récepteur, permettant son couplage avec une protéine G qui va stimuler (ou inhiber) des protéines diverses (kinases, canaux ioniques, facteurs de transcription, etc. ...) et ainsi déclencher des voies de signalisation. Les protéines G sont constituées de 3 sous-unités, α , β et γ . Il existe plusieurs types de sous-unités α , qui vont déterminer les voies de signalisation déclenchées à l'activation du récepteur. CB1 et CB2 sont des RCPG qui se couplent en grande majorité avec des protéines G dont la sous-unité α est de type inhibitrice (G_i/o) (Howlett, 2002; Howlett and Abood, 2017; Ye et al., 2019) **(Figure 23)**. La fixation d'un agoniste sur CB1 et CB2 entraîne ainsi l'inhibition de l'*Adenylate cyclase* (AC), stimule la voie des *Mitogen-activated proteins kinases* (MAPK) et l'ouverture de différents canaux ioniques (Howlett, 2005). Il a été montré que dans certaines conditions, CB1 peut se coupler à des protéines G de type activatrices (G_s) et stimuler l'activité de l'AC (Glass and Felder, 1997; Bonhaus et al., 1998; Calandra et al., 1999; Chen et al., 2010) ainsi qu'avec des protéines G de type $q/11$, activant la $PLC\beta$ et entraînant l'augmentation intracellulaire de calcium (Lauckner et al., 2005). CB2 pourrait également se fixer aux protéines G_s mais cette hypothèse reste à être étudiée plus amplement (Zheng et al., 2013). Les voies de signalisation médiées par CB1 et CB2 sont multiples et modulent divers effets cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose, la survie, la différenciation et le métabolisme cellulaire.

De façon classique pour les RCPG, le changement de conformation du récepteur déclenché par la fixation de l'agoniste entraîne non seulement l'activation de voies de signalisation dépendantes des protéines G mais entraîne également une phosphorylation du récepteur par des *G protein receptor kinases* (GRK), motif reconnu par les β -arrestines. Ces protéines sont responsables de la désensibilisation de la cellule par l'endocytose des récepteurs (Schmid and Bohn, 2009). Il a été montré que CB1 (Breivogel et al., 2013) et CB2 (Chen et al., 2015) recrutent les β -arrestines ce qui entraîne non seulement leur internalisation mais déclenche également d'autres voies de signalisation, comme la stimulation de la voie *Extracellular signal regulated kinase-1 et 2* (ERK 1/2) (Nogueras-Ortiz and Yudowski, 2016).

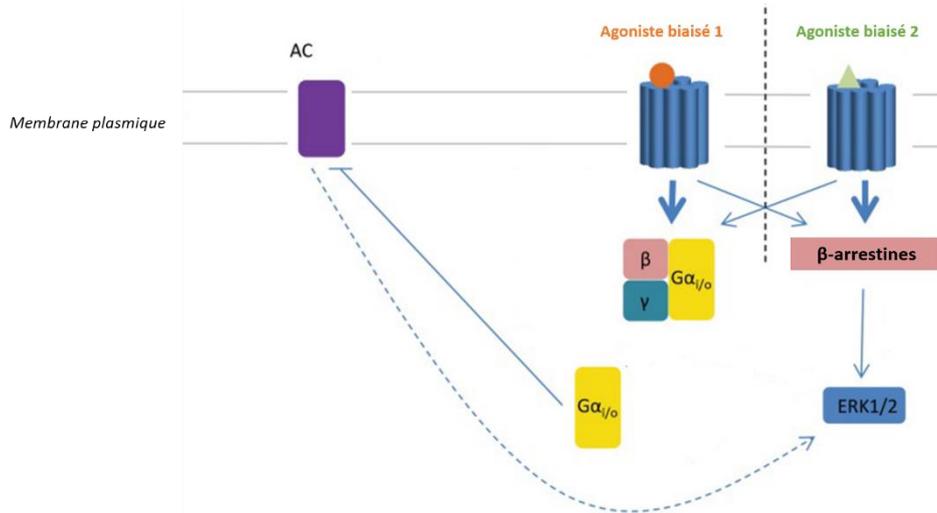


Figure 24 : Illustration du concept « d’agonisme biaisé » (modifié à partir de Ibsen et al., 2017).

Selon le ligand qui se fixe à un récepteur couplé aux protéines G, le changement de conformation du récepteur induit sera différent, favorisant une voie (ou des voies) de signalisation parmi d’autres. Ici l’agoniste biaisé 1 favorise le couplage à la protéine Gi/o, ce qui déclenche la voie de signalisation dépendante de l’adénylate cyclase (AC) et de façon moins importante la voie *Extracellular signal regulated kinase-1 et 2* (ERK1/2). L’agoniste biaisé 2 favorise au contraire le recrutement de la β-arrestines, entraînant l’internalisation du récepteur et l’activation de la voie ERK1/2.

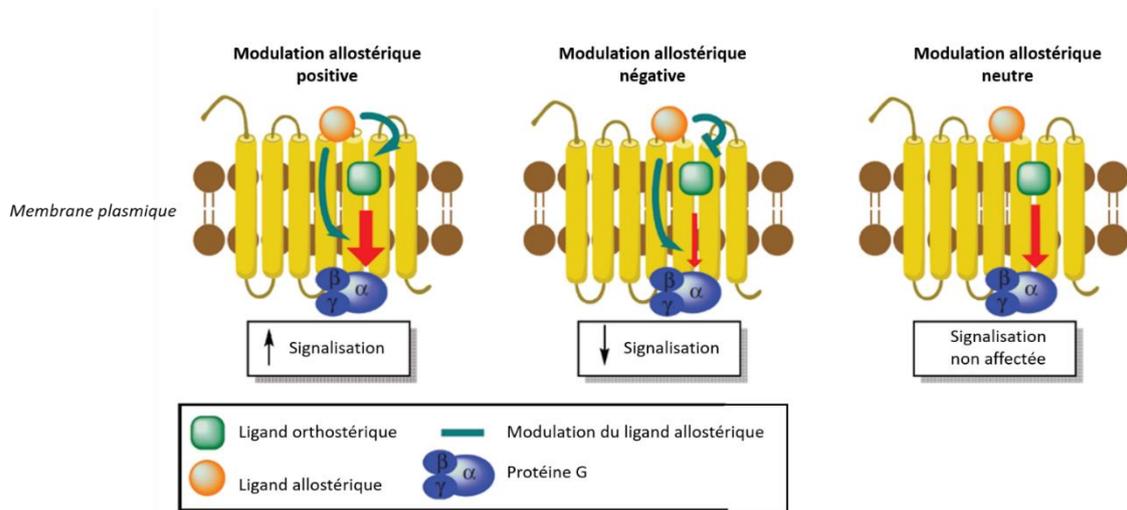


Figure 25 : Illustration du concept de modulation allostérique de récepteurs couplés aux protéines G (modifié à partir de Gado et al., 2019).

La fixation d’un ligand allostérique sur un site secondaire du récepteur, peut modifier la conformation du récepteur et donc modifier la (ou les) voie(s) de signalisation déclenchée(s) par le ligand orthostérique (qui se fixe sur le site actif du récepteur). On distingue 3 types de ligands allostériques, suivant s’ils ont un effet positif, négatif ou neutre sur la signalisation déclenchée par le ligand orthostérique.

Il a été montré que selon les ligands se fixant sur un récepteur RCPG, ce dernier adopte des conformations différentes, ces dernières sélectionnant les effecteurs secondaires intracellulaires avec lesquels il se couple (Kenakin, 2009; Michel and Charlton, 2018; Wootten et al., 2018; Kenakin, 2019). Ainsi, selon les ligands, les voies de signalisation déclenchées et donc les effets biologiques, peuvent varier drastiquement (Ibsen et al., 2017, 2019) et ce pour CB1 (Khajehali et al., 2015) et CB2 (Atwood et al., 2012; Dhopeswarkar and Mackie, 2016) (**Figure 24**). Ce phénomène, appelé « sélectivité fonctionnelle des récepteurs » (aussi trouvé sous le nom « d'agonisme biaisé » dans la littérature) souligne l'importance de l'environnement moléculaire autour des RCPG dans le déclenchement des réponses cellulaires. Ce phénomène a été observé sur CB1 et CB2, et ce avec les endo- et les phytocannabinoïdes. Par exemple, le 2-AG favoriserait le recrutement des β -arrestines quand il se fixe à CB2.

De plus, CB1 et CB2 interagissent avec diverses protéines qui régulent leurs fonctions. Parmi ces dernières, on trouve des ligands se fixant sur un site secondaire de liaison du récepteur (dits « allostériques »). La fixation de ces derniers peut modifier la conformation du récepteur, pouvant moduler l'interaction du ligand orthostérique avec le récepteur les voies de signalisation déclenchées (Keov et al., 2011; Christopoulos et al., 2014; Gado et al., 2019) (**Figure 25**). Il existe 3 types de modulations allostériques :

- la modulation allostérique positive : la fixation du ligand allostérique favorise la signalisation déclenchée par le ligand orthostérique,
- la modulation allostérique négative : la fixation du ligand allostérique inhibe la signalisation déclenchée par le ligand orthostérique,
- la modulation allostérique neutre : la fixation du ligand allostérique ne modifie pas la signalisation déclenchée par le ligand orthostérique.

D'autres types de protéines peuvent affecter l'activité de CB1 et CB2. Parmi elles, on peut citer *Cannabinoid receptor interacting protein 1a* (CRIP1a) (Niehaus et al., 2007; Booth et al., 2019), *SH3GL interacting endocytic adaptor 1* (SGIP1) (Hájková et al., 2016) et *G protein-coupled receptor associated sorting protein 1* (GASP1, également trouvé comme GRASP1 dans la littérature) (Martini et al., 2007). CRIP1a (Smith et al., 2015 ; Blume et al., 2017) et SGIP1 (Hájková et al., 2016) peuvent se fixer de manière compétitive sur le site de liaison des β -arrestines des récepteurs CB1, diminuant leur désensibilisation et leur

internalisation, tandis que GASP1 est impliqué dans la « down-régulation » des récepteurs CB1 lors d'une exposition chronique aux cannabinoïdes (Tappe-Theodor et al., 2007)

Enfin, CB1 et CB2 ont la capacité de former des homo- et des hétérodimères voire même des multimères avec des RCPG spécifiques d'autres ligands (Wager-Miller et al., 2002; Mackie, 2005; Callén et al., 2012). Suivant les structures formées et les ligands qui s'y fixent, les voies de signalisation préférentiellement activées ne sont pas les mêmes (Navarro et al., 2018, 2020).

Les interactions des principaux endo- et phytocannabinoïdes avec CB1 et CB2 sont décrites de telle sorte :

- le Δ^9 -THC est l'agoniste partiel de CB1 et CB2 et présente une forte affinité pour ces deux récepteurs (Pertwee, 2008).
- le CBD présente une faible affinité pour CB1 et pour CB2. Le CBD agit comme un modulateur allostérique négatif de CB1 (Laprairie et al., 2015; Jakowiecki et al., 2021). Il a de plus été montré qu'il avait ce rôle quand CB1 était activé par le Δ^9 -THC, entraînant l'inhibition de certaines voies de signalisation et en potentialisant d'autres. La capacité du CBD à moduler la signalisation du Δ^9 -THC a également été observée chez la souris (Varvel et al., 2006). Dans les deux espèces, un grand nombre de paramètres comme les doses utilisées, la voie d'exposition, la fréquence d'utilisation, entre autres, modifient la modulation allostérique du CBD sur CB1. Le CBD est un agoniste inverse de CB2 (Ligresti et al., 2016). Il a récemment été suggéré que le CBD pourrait également constituer un modulateur allostérique de CB2 (Soethoudt et al., 2017).
- l'AEA est un agoniste partiel de CB1 et de CB2, avec une plus grande efficacité pour CB1 que pour CB2, et présente une affinité modérée pour les deux récepteurs (Hillard, 2000).
- le 2-AG agit comme un agoniste de forte efficacité sur CB1 et CB2, et possède une plus forte affinité pour CB1 que pour CB2 (Hillard, 2000).

(2) Les récepteurs alternatifs

D'autres récepteurs ont été mis en évidence comme pouvant fixer les endo et/ou les phytocannabinoïdes. Cependant, il est difficile dans certains cas de conclure sur l'existence réelle d'une activation physiologique *in vivo* d'un récepteur par un ligand. En effet, il existe une variété de tests biochimiques pour tester une interaction (par exemple : déplacement de liaison, liaison du RCPG à une protéine G, mesure de la concentration d'un effecteur secondaire, etc...), souvent réalisés sur des modèles divers (par exemple des fragments de membranes cellulaires ou des lignées cellulaires) avec des concentrations testées différentes, alors qu'elles peuvent faire varier drastiquement les voies de signalisation activées. De plus, les tests peuvent ne pas être capables de prendre en compte les effets de l'existence de plusieurs molécules sur le même récepteur. Enfin, des tests réalisés chez le rongeur pourraient ne pas s'appliquer chez l'homme, et une interaction vérifiée dans un type cellulaire pourrait ne pas être valable dans un autre. Cela explique que le potentiel de plusieurs ligands à activer certains récepteurs n'en sont encore qu'au stade d'hypothèses au moment où est écrit ce manuscrit.

Parmi les récepteurs dits « alternatifs », identifiés comme pouvant fixer et/ou être activés par les endo- et les phytocannabinoïdes, les mieux décrits appartiennent à trois grandes familles : les RCPG et les *Transient receptor potential* (TRP), tous deux exprimés sur la membrane plasmique, et les *Proliferator-activated receptor* (PPAR), qui sont des récepteurs nucléaires (pour revue : Pertwee et al., 2010).

Il a été montré que plusieurs RCPG pourraient être activés par les endo- et phytocannabinoïdes, les mieux décrits étant *G protein-coupled receptor 18* (GPR18), *G protein-coupled receptor 55* (GPR55) et *G protein-coupled receptor 119* (GPR119) (Irving et al., 2017; Morales and Reggio, 2017). GPR118 est exprimé dans des cellules des organes immunitaires, dans l'intestin et il est fortement exprimé dans le testicule (Gantz et al., 1997; Kohno et al., 2006). GPR55 est exprimé dans les cellules immunitaires, les glandes surrénales, l'intestin et le cerveau (Ryberg et al., 2007) tandis que GPR119 serait principalement exprimé dans le pancréas, le muscle et le foie. Il a été montré que l'activation de ces récepteurs entraîne l'activation de voies de signalisation diverses comme la voie ERK 1/2 et la régulation de canaux ioniques. Il a été montré que GPR55 pouvait former des

hétérodimères avec CB2, modifiant les voies de signalisation activées (Balenga et al., 2014; Moreno et al., 2014).

Les principaux endo- et les phytocannabinoïdes peuvent interagir avec certains de ces RCPG. Ainsi :

- le Δ^9 -THC est un agoniste fort de GPR18 (McHugh et al., 2012). L'activation de GPR55 par le Δ^9 -THC est plus controversée, certaines études observant son activation (Ryberg et al., 2007; Lauckner et al., 2008) contrairement à d'autres (Oka et al., 2007; Yin et al., 2009).
- le CBD est un agoniste partiel de GPR18 (McHugh et al., 2012) et serait un antagoniste de GPR55 (Ryberg et al., 2007; Whyte et al., 2009).
- l'AEA peut activer GPR18 (McHugh et al., 2012) ainsi que GPR55 (Baker et al., 2006; Ryberg et al., 2007).
- parmi ces ligands, seul le 2-AG serait un agoniste de GPR119 (Hansen et al., 2011).

Les TRP sont des récepteurs membranaires, répondant à divers stimuli comme la température, les variations osmotiques et mécaniques, la charge électrique, les stimuli olfactifs, et les lipides (Ramsey et al., 2006; Venkatachalam and Montell, 2007; Gees et al., 2012). Ce sont des récepteurs canaux, régulant l'entrée de cations dans la cellule quand ils sont activés. Leur activation déclenche des voies de signalisation régulant plusieurs processus cellulaires dont la migration et la prolifération. Dans la famille des TRP, il a été montré que les endo- et les phytocannabinoïdes pouvaient agir principalement avec des récepteurs de la sous-famille des TRP *vanilloïd* (TRPV), tels que TRPV1 et TRPV2, les deux récepteurs les plus caractérisés.

De la même façon, les endo- et phytocannabinoïdes principaux interagissent avec les TRPV.

Ainsi :

- le $\Delta 9$ -THC active TRPV1 et TRPV2 (De Petrocellis et al., 2011; Landucci et al., 2022) mais d'une manière générale, le $\Delta 9$ -THC serait moins efficace que le CBD pour moduler les canaux TRP.
- le CBD active TRPV1 (Bisogno et al., 2001) et TRPV2 (Nabissi et al., 2013; Qin et al., 2008; Landucci et al., 2022).
- l'AEA est un fort agoniste de TRPV1 (Melck et al., 1999; Zygmunt et al., 1999; Smart et al., 2000; van der Stelt et al., 2005; Tóth et al., 2009),
- mais pas le 2-AG (Starowicz et al., 2007).

De façon intéressante, il a été montré que TRPV1 co-localisait avec CB1 et CB2 dans certains neurones (Price et al., 2004; Anand et al., 2008), suggérant un dialogue intracellulaire et une modulation des voies de signalisation déclenchées si ces deux récepteurs sont activés par un même ligand (Pertwee et al., 2010). Les endo- et les phytocannabinoïdes interagiraient aussi avec TRPV3 et TRPV4 ainsi qu'avec des récepteurs de la sous-famille des TRP *melastin* (TRPM), comme TRPM8 et de la sous-famille des TRP *ankyrin* (TRPA) tel que TRPA1 mais ces interactions sont beaucoup moins décrites.

Enfin, les endo- et phytocannabinoïdes peuvent interagir avec des récepteurs nucléaires. Les PPAR sont des récepteurs nucléaires impliqués dans plusieurs processus comme la différenciation cellulaire, le métabolisme et les fonctions immunitaires via la régulation de la transcription de gènes (Christofides et al., 2021; Montaigne et al., 2021). Il existe 3 sous-types : PPAR α , PPAR β (aussi connu sous le nom de PPAR δ) et PPAR γ . Les PPAR répondent à un grand nombre de ligands, classiquement les acides gras et leurs dérivés, et sont exprimés dans une multitude de types cellulaires. De manière spécifique aux ligands et aux types cellulaires, les PPAR contrôlent la transcription d'un très grand nombre de gènes.

Ainsi, il a été montré que :

- le $\Delta 9$ -THC et le CBD peuvent activer PPAR γ , ainsi que le 2-AG et l'AEA (O'Sullivan, 2007; Sun and Bennett, 2007; O'Sullivan and Kendall, 2010; Iannotti and Vitale, 2021).
- l'AEA peut activer PPAR α (Sun and Bennett, 2007).

Cependant la puissance d'interaction des cannabinoïdes pour les PPAR est généralement 2 fois plus faible que pour les récepteurs classiques CB1 et CB2 (Pertwee et al., 2010). A noter, les métabolites issus de la dégradation des endocannabinoïdes peuvent aussi constituer des ligands pour les PPAR (Fang et al., 2006). Il a de plus été montré dans plusieurs types cellulaires *in vitro* qu'il existe un dialogue étroit entre les PPAR et le système des ECB, les PPAR étant capables de moduler l'expression d'enzymes de métabolisation et de récepteurs du système des ECB (Iannotti and Vitale, 2021).

Le système des endocannabinoïdes est un système complexe, dont l'activité et la quantité de ses composants sont finement régulés. Ainsi, la concentration des endocannabinoïdes est étroitement liée à la quantité et à l'activité des enzymes de synthèse et de métabolisation. De plus, comme il a été vu plus haut, les récepteurs aux cannabinoïdes du système des ECB sont sensibles à différents ligands, qui déclenchent des voies de signalisation très diverses. La sensibilité d'une cellule aux cannabinoïdes dépend du nombre et de la nature des différents récepteurs présents à sa surface.

L'ensemble des données précédemment citées illustrent le fait que l'interaction de composants exogènes, comme les phytocannabinoïdes, avec ce système endogène peut entraîner des modifications drastiques de son équilibre. Elles illustrent également la complexité de la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à une exposition aux phytocannabinoïdes.

c) Modulation du système des endocannabinoïdes

(1) Par les phytocannabinoïdes

Comme il a été vu plus haut, le Δ^9 -THC et le CBD ont de multiples actions sur les récepteurs du système des ECB, pouvant agir, selon les récepteurs comme des agonistes, des agonistes inverses, des antagonistes ou des modulateurs allostériques.

Ces phytocannabinoïdes peuvent moduler d'autant plus le système des ECB par d'autres processus (pour revue : Di Marzo and Piscitelli, 2015; Jacobson et al., 2019; Maccarrone, 2020).

Tout d'abord, il a été montré que le CBD peut agir comme un agoniste indirect de CB1 et CB2 en augmentant la quantité du 2-AG et de l'AEA, via l'inhibition de l'enzyme FAAH (Bisogno et al., 2001; de filippis et al., 2008; De Petrocellis et al., 2011; Banerjee et al., 2011a; Leweke et al., 2012) ou via l'inhibition du transport intracellulaire des endocannabinoïdes vers l'enzyme FAAH (Deutsch, 2016)

De plus, certains cannabinoïdes, sous leur forme acide, pourraient inhiber la métabolisation du 2-AG par l'enzyme MAGL ainsi que la synthèse de ce même ligand par l'enzyme DAGL α (De Petrocellis et al., 2011).

En outre, selon les modèles et les doses utilisées, le Δ 9-THC pourrait se comporter comme un antagoniste de l'AEA et du 2-AG sur CB1 et CB2, car il possède une grande affinité mais une plus faible efficacité pour ces récepteurs que les ligands endogènes.

Le CBD serait capable d'inhiber la réabsorption d'AEA intracellulaire, prolongeant son action sur les récepteurs membranaires (Carvalho et al., 2018a).

Enfin, il a été montré qu'une exposition chronique ou récente au cannabis entraîne une diminution de la présence de CB1 à la membrane des cellules dans plusieurs régions du cerveau (Jacobson et al., 2019).

(2) Par des composés synthétiques

Peu de temps après la découverte du système des ECB, plusieurs groupes de recherche, dans un intérêt de recherche ou dans un but thérapeutique, se sont intéressés à trouver des moyens de le moduler. Ainsi de molécules synthétiques ciblant différents composants du système ont été développées. Parmi les plus utilisées, on peut citer des agonistes et des antagonistes des récepteurs CB, ainsi que des activateurs ou des inhibiteurs des enzymes de synthèse ou de dégradation des ligands endogènes (Pertwee, 2010; Mechoulam et al., 2014; Wiley et al., 2016; Di Marzo, 2018).

Ainsi :

- le WIN55,21-2, le CP55940 et le HU210 sont utilisés comme agonistes à la fois de CB1 et de CB2,
- le *methanandamide*, le *arachidonyl-2'-chloroethylamide* (ACEA), le *arachidonylcyclopropylamide* (ACPA) et le *2-arachidonyl glyceryl ether* (aussi appelé noladin ether) activent sélectivement CB1
- le JHW-133, le HU-308, le JHW-015 et le AM1241 sont des activateurs sélectifs de CB2
- l'AM251, l'AM281, le diarylpyrazole et le rimonabant (SR141716) sont utilisés comme antagonistes compétitifs de CB1. Il n'est cependant pas encore clair s'ils agissent comme des antagonistes ou des agonistes inverses (dont les fonctionnements sont décrits plus haut). De plus, il n'est pas encore clair s'ils agissent sur d'autres récepteurs
- l'AM630 et le SR144528 sont utilisés comme antagonistes compétitifs de CB2, mais agiraient plutôt comme des agonistes inverses.

A noter, des cannabinoïdes synthétiques sont également développés dans des laboratoires clandestins dans un but commercial. Les plus connus sont appelés « Spice » et « K2 » et possèdent des effets physiologiques et psychoactifs plus intenses que ceux induits par le cannabis (Castaneto et al., 2014)

Le système des ECB est un système conservé au cours de l'évolution, présent chez tous les mammifères et chez certains invertébrés (McPartland and Glass, 2003; McPartland et al., 2006), soulignant son importance dans la physiologie de plusieurs tissus.

Le système des ECB est impliqué dans la régulation de divers paramètres. Au niveau central, il a été montré qu'il régulait plusieurs processus cognitifs et psychologiques, dont la plasticité synaptique, l'humeur, la mémoire, le système de récompense, l'appétit et la douleur (Ligresti et al., 2016). Le système des ECB intervient aussi dans la régulation de l'activité de plusieurs tissus périphériques, tels que les muscles, le foie, le pancréas, le système immunitaire, les os mais aussi la fonction testiculaire.

2. Rôles du système des ECB dans la fonction reproductive chez l'homme adulte

Comme chez la femme (Brents, 2016), le système des ECB est impliqué dans la régulation de la fonction de reproduction chez l'homme, à la fois au niveau central et au niveau gonadique (pour revue : Bari, 2011; Fasano et al., 2009; Wang et al., 2006; Cacciola et al., 2008; Battista et al., 2008, 2012; Bovolín et al., 2014; du Plessis et al., 2015; Battista et al., 2015; Maccarrone, 2020; Sayed et al., 2021)

a) Axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire

Des travaux pionniers chez différents mammifères modèles, en particulier les rongeurs, ont permis de montrer que le système des ECB est présent à tous les niveaux de l'axe HHT (pour revue : Gorzalka and Dang, 2012; Bovolín et al., 2014; Hillard et al., 2016).

Chez le rat, les deux endocannabinoïdes majoritaires, l'AEA et le 2-AG sont retrouvés dans l'hypothalamus et dans l'hypophyse, suggérant leur synthèse locale (González et al., 1999). De très faibles quantités d'AEA sont détectées, au contraire du 2-AG dont les quantités sont plus importantes. Il a été également montré la présence d'AEA et de 2-AG dans une lignée murine de neurones à GnRH (Gammon et al., 2005) et chez l'homme (Wenger and Moldrich, 2002).

CB1 est le récepteur dont l'implication dans la régulation centrale de la fonction de reproduction est la mieux décrite. De manière cohérente avec la présence des ligands endogènes, CB1 est exprimé dans l'hypothalamus (Herkenham et al., 1991; Matsuda et al., 1993; Fernández-Ruiz et al., 1997; González et al., 1999) et dans les cellules hypophysaires gonadotropes sécrétrices de LH (González et al., 1999; Wenger et al., 1999) chez le rat. De même, CB1 est exprimé dans l'hypothalamus murin (Herkenham et al., 1990; Wittmann et al., 2007) et dans l'hypophyse (González et al., 1999; Wenger et al., 2001). De la même façon, chez l'homme, CB1 est exprimé dans l'hypothalamus (Herkenham et al., 1990) et dans les cellules hypophysaires gonadotropes (Pagotto et al., 2001).

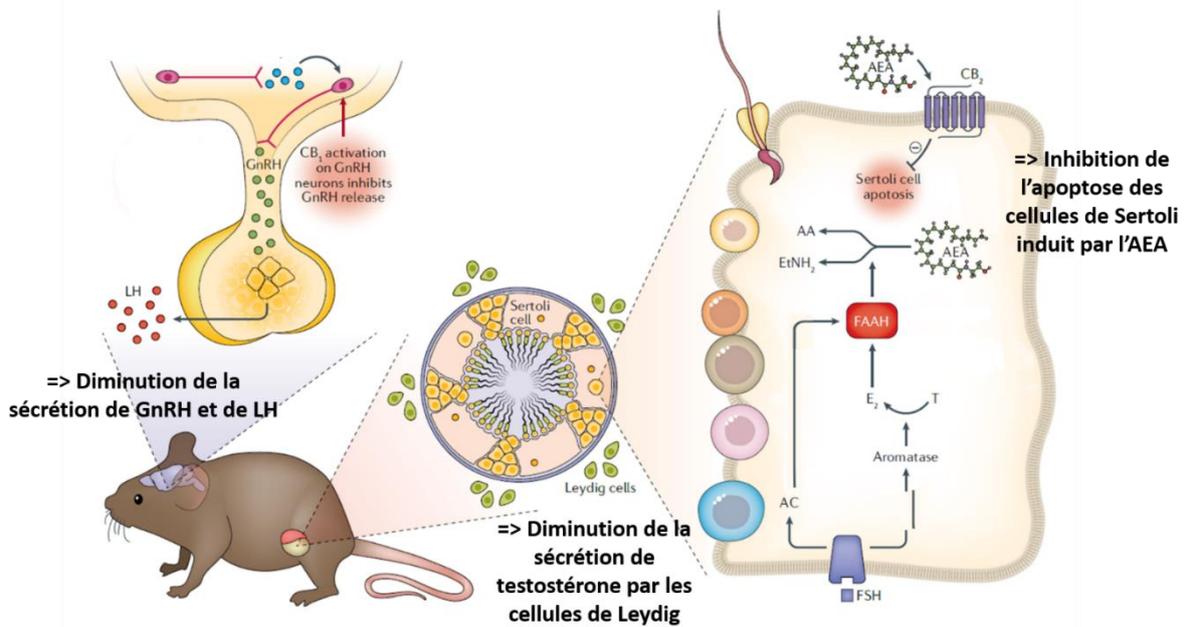


Figure 26 : Rôles connus du système des endocannabinoïdes sur la fonction de reproduction (modifié à partir de Maccarrone, 2020).

Au niveau hypothalamique, l'activation du *Cannabinoid receptor 1* (CB1) sur les neurones à GnRH ou sur des neurones régulateurs entraîne l'inhibition de la libération de la *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH). Ce phénomène mène à l'inhibition de la sécrétion de *Luteinizing hormone* (LH) hypophysaire et par conséquent de la testostérone par les cellules de Leydig. De plus, l'activation du récepteur de la *Follicle-stimulating hormone* (FSH) inhibe l'apoptose induite via l'activation du *Cannabinoid receptor 2* (CB2) par l'anandamide (AEA), en stimulant la transcription de l'enzyme *Fatty acid amide hydrolase* (FAAH), qui dégrade l'AEA en acide arachidonique (AA) et une éthanolamine (EtNH₂). La fixation de la FSH entraîne la transcription de la FAAH par la voie de signalisation de l'adénylate cyclase (AC) et en stimulant l'activité de l'aromatase, qui transforme la testostérone (T) en œstradiol (E₂), ce dernier activant la transcription de la FAAH.

De plus, il a été montré que TRPV1 est exprimé dans l'hypothalamus chez la souris (Cristino et al., 2006), et chez le rat et l'homme (Mezey et al., 2000). Dans l'hypothalamus murin, TRPV1 est co-localisé avec CB1, suggérant son implication dans la signalisation des ECB (Cristino et al., 2006). Il a de plus été montré chez la souris que les neurones à GnRH expriment également CB2.

Chez les rongeurs et chez l'homme, la signalisation des ECB est inhibitrice de la sécrétion de GnRH et de LH, conduisant à une diminution de la libération de testostérone (Herkenham et al., 1991; T. Wenger et al., 1999) (**Figure 26**). Chez le rat, le traitement de cellules hypothalamiques *in vitro* avec de l'AEA entraîne la diminution de leur sécrétion de GnRH (Scorticati et al., 2004) et le traitement *in vitro* de cellules hypophysaires avec de l'AEA n'affecte pas leur libération de FSH mais entraîne une diminution de la sécrétion de LH, effet médié par le récepteur CB1 (Wenger et al., 2000). De façon cohérente, l'administration *in vivo* d'AEA conduit à une diminution de la LH sérique, mais n'a pas d'effet sur la FSH (Wenger et al., 1999). Chez la souris, le traitement *in vitro* d'une lignée de neurones à GnRH avec du 2-AG et de l'AEA entraîne une diminution de la sécrétion de GnRH (Gammon et al., 2005). Dans la même espèce, un traitement d'AEA et de 2-AG *in vivo* entraîne la diminution de la libération de LH via l'activation de CB1 (Wenger et al., 2001; Oláh et al., 2008). Il a été observé que l'AEA produisait un effet plus fort que le 2-AG, pouvant découler du fait que l'effet inhibiteur sur la sécrétion de LH par l'AEA passe également par l'activation de TRPV1 (Oláh et al., 2008).

Les études disponibles à ce jour tendent à montrer que la majorité des effets inhibiteurs du système des ECB sur libération des hormones de l'axe HHT passent majoritairement par l'inhibition de la GnRH hypothalamique, induisant une inhibition de la libération de LH hypophysaire. A noter qu'il est encore peu clair si la majorité des effets inhibiteurs hypothalamiques des ECB passent directement via les neurones à GnRH ou s'ils sont médiés par des neurones régulateurs de l'activité des neurones à GnRH (**Figure 26**). De même, il est jusqu'à présent admis que la majorité de cette régulation se fait via la signalisation de l'AEA sur CB1.

GERM CELLS:		Sp-gonia	Spermatocytes		Spermatids		
			Early	Late	Round	Elongated	
ECS Components	Synthesis	(AEA ↑) NAPE-PLD	-	-	-	+ (?)	-
		(2-AG ↑) DAGLA/B	+*	-	+*	+*	-
	Receptors	CNR1 (with isoforms)	-	-	+*	+*	-
		CNR2 (with isoforms)	+ (?)	-	+	+	+
	Catabolism	(2-AG ↓) ABHD2	+	+	++	++	+
		(AEA ↓) FAAH	-	-	++	++	++
		(2-AG ↓) MGLL	-	-	-	+/- (?)	+ (?)

SOMATIC CELLS:		Leydig cells	Peritubular cells	Sertoli cells	
ECS Components	Synthesis	(AEA ↑) NAPE-PLD	+	+	+
		(2-AG ↑) DAGLA/B	+	+	+
	Receptors	CNR1 (with isoforms)	+	-	-
		CNR2 (with isoforms)	+	+	-
	Catabolism	(2-AG ↓) ABHD2	+ (?)	-	- (?)
		(AEA ↓) FAAH	+	-	-
		(2-AG ↓) MGLL	-/+	-/+	+/-

Figure 27 : Expression du système des endocannabinoïdes dans le testicule humain (tiré de Nielsen et al., 2019).

Les cellules testiculaires germinales et somatiques expriment les composants du système des endocannabinoïdes : les récepteurs CNR1 et CNR2 (gènes codant pour CB1 et CB2) et les enzymes de synthèse (↑) et de dégradation (↓) principales des ligands endogènes anandamide (AEA) et 2-arachidonoylglycerol (2-AG). L'expression incertaine de certains facteurs à cause d'une opposition entre les données transcriptomiques et protéiques est notée par un « ? ». L'astérisque (*) marque une observation nucléaire des récepteurs, dont la pertinence physiologique n'est pas encore connue.

Les effets d'autres récepteurs aux cannabinoïdes comme CB2 ou des récepteurs alternatifs dans la régulation des sécrétions hormonales de l'axe HHT sont pour l'instant peu connus.

Une étude sur des souris ayant subi une orchidectomie a montré une diminution de la quantité d'ARNm de CB1 au niveau hypophysaire, suggérant que la testostérone est impliquée dans l'expression de CB1 dans ce tissu (González et al., 2000). Le résultat de cette étude suggère une boucle de rétrocontrôle entre le système des endocannabinoïdes et les sécrétions endocrines de l'axe HHT : l'activation de CB1 (et de TRPV1 potentiellement) par l'AEA (et le 2-AG possiblement) inhibent la sécrétion de GnRH hypothalamique et la sécrétion de LH hypophysaire (directement ou via la régulation de la sécrétion de GnRH), ce qui entraîne une diminution de la sécrétion de testostérone, signal régulant l'expression de CB1 au niveau central.

b) Au niveau testiculaire

Si plusieurs groupes avaient déjà montré l'expression d'un ou plusieurs composants du système des ECB dans le testicule adulte humain, une étude récente a permis de révéler dans la présence des composants du système des ECB au niveau transcriptomique et protéique selon chaque type cellulaire (Nielsen et al., 2019a). Cette étude a montré que les cellules germinales expriment les récepteurs CB1 et CB2 ainsi que certaines enzymes de synthèse et de métabolisation de l'AEA et du 2-AG, avec une expression différentielle selon le stade de leur différenciation spermatogénique (**Figure 27**). Les cellules de Leydig expriment également les enzymes de synthèse et de métabolisation de l'AEA et du 2-AG tandis que les cellules de Sertoli et les cellules péricubulaires n'exprimeraient que les enzymes de synthèse. Les cellules de Leydig expriment CB1 et CB2, et les cellules péricubulaires expriment CB2. De façon cohérente avec l'observation des enzymes de synthèse et des récepteurs, le 2-AG a été dosé dans le testicule humain adulte. Cependant, dans cette même étude, les techniques utilisées n'ont pas permis de détecter l'AEA.

Comme il a été vu plus haut, le système des ECB et particulièrement la signalisation de CB1, a un effet inhibiteur sur les sécrétions de l'axe HHT, résultant en une diminution de

la sécrétion de testostérone par le testicule (Wenger et al., 2001) (**Figure 26**). Les récepteurs aux endocannabinoïdes étant exprimés par les cellules de Leydig, il n'est pas exclu que les endocannabinoïdes puissent avoir un effet direct dans ces cellules.

Il a également été montré que la FSH inhibe le signal pro-apoptotique de la fixation de l'AEA sur le récepteur TRPV1 dans les cellules de Sertoli en stimulant l'expression de FAAH, l'enzyme de dégradation de ce ligand. La FSH peut agir à deux niveaux dans les cellules de Sertoli : elle stimule directement la transcription de la FAAH via la voie de signalisation de l'AC, mais elle stimule également l'activité de l'aromatase, entraînant une augmentation des taux d'œstrogènes qui sont également activateurs de l'expression de la FAAH (Maccarrone et al., 2003; Rossi et al., 2007; Grimaldi et al., 2009b) (**Figure 26**). Le récepteur CB2 serait également impliqué dans la protection de l'apoptose des cellules de Sertoli AEA-dépendante (Rossi et al., 2007).

Chez l'homme et chez le rongeur, les constituants du système des ECB sont impliqués dans la spermatogenèse et leur expression est modulée dans les cellules germinales au cours de la différenciation spermatogénique (Grimaldi et al., 2013). Chez les rongeurs, le couple 2-AG/CB2 serait lié aux stades mitotiques et méiotiques de la spermatogenèse tandis que le couple AEA/CB1 serait impliqué dans la régulation des spermatogonies ainsi que dans l'étape de spermiogenèse (Migliaccio et al., 2018).

Ainsi, des études *in vitro* et *in vivo* chez la souris ont montré que l'activation autocrine du récepteur CB2 par le 2-AG régule l'entrée en méiose des spermatogonies en induisant l'expression de gènes méiotiques (Grimaldi et al., 2009a; Di Giacomo et al., 2016; Dumont et al., 2021). De façon cohérente, il a été noté chez la souris de fortes quantités de 2-AG dans les spermatogonies et les spermatocytes, qui diminuent drastiquement dans les cellules post-méiotiques (spermatides rondes, spermatides allongées et spermatozoïdes), parallèlement à l'augmentation de l'expression des enzymes de métabolisation de ce ligand (Grimaldi et al., 2009a). De la même façon, l'expression de FAAH augmente pendant la méiose (Grimaldi et al., 2009a), faisant diminuer les niveaux d'AEA ce qui suggère une implication négative de ce dernier dans la méiose. Chez la souris, comme CB1 et CB2, l'expression de TRPV1 est augmentée dans les cellules méiotiques (Grimaldi et al., 2009a). Son activation par AEA jouerait un rôle dans la survie des cellules germinales au cours de la spermatogenèse, les protégeant du stress thermique (Mizrak and van Dissel-Emiliani, 2008).

De plus, la signalisation de CB1 chez la souris intervient dans le remodelage de la chromatine dans les spermatides (Cacciola et al., 2013) et les spermatozoïdes (Chioccarelli et al., 2010, 2020).

Chez le rat, il a été mis en évidence un dialogue entre l'AEA et le 2-AG (Migliaccio et al., 2018). L'activation du récepteur CB2 par l'AEA stimule l'expression de CB1 qui en retour inhibe l'expression de MAGL, entraînant une augmentation de la quantité de 2-AG. Ce processus pourrait être impliqué dans la régulation de l'entrée en méiose des spermatocytes par d'autres cellules germinales dans cette espèce.

Chez l'homme, l'implication précise du système des ECB au cours de la spermatogenèse est encore peu connue. Les connaissances actuelles sont largement basées sur des études *in vivo* et *in vitro* qui utilisent un traitement de phytocannabinoïdes, ne reflétant pas la réalité physiologique. Il a été observé que la transition spermatogonies à spermatocytes primaires est associée avec une expression relativement éteinte des récepteurs et des enzymes de synthèse et de métabolisation (Nielsen et al., 2019a) (**Figure 27**). Dans cette même étude, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression de CB2 (et de CB1) ainsi que des enzymes de dégradation de l'AEA et du 2-AG dans les cellules méiotiques, comme chez la souris.

Le système des ECS serait également impliqué dans la régulation de la fonction des spermatozoïdes à partir de leur transit dans l'épididyme, et ce jusqu'à la fécondation. C'est dans l'épididyme que les spermatozoïdes acquièrent leur capacité de motilité et leur capacité à féconder l'ovocyte, grâce à d'importantes modifications au niveau de leur membrane. Les spermatozoïdes humains expriment les constituants du système des ECB, notamment les enzymes de synthèse et de dégradation de l'AEA et du 2-AG, comme NAPE-PLD et FAAH (Francavilla et al., 2009), DAGL et MAGL (S. E. M. Lewis et al., 2012), ABHD2 (Miller et al., 2016) ainsi que les récepteurs CB1 (Rossato et al., 2005; Francavilla et al., 2009), CB2 (Francavilla et al., 2009; Agirregoitia et al., 2010) et TRPV1 (Francavilla et al., 2009). A noter, ces facteurs sont exprimés différemment selon la région du spermatozoïde. De façon cohérente, l'AEA et le 2-AG sont retrouvés dans les spermatozoïdes murins (Catanzaro et al., 2011) et le fluide séminal (Schuel et al., 2002a).

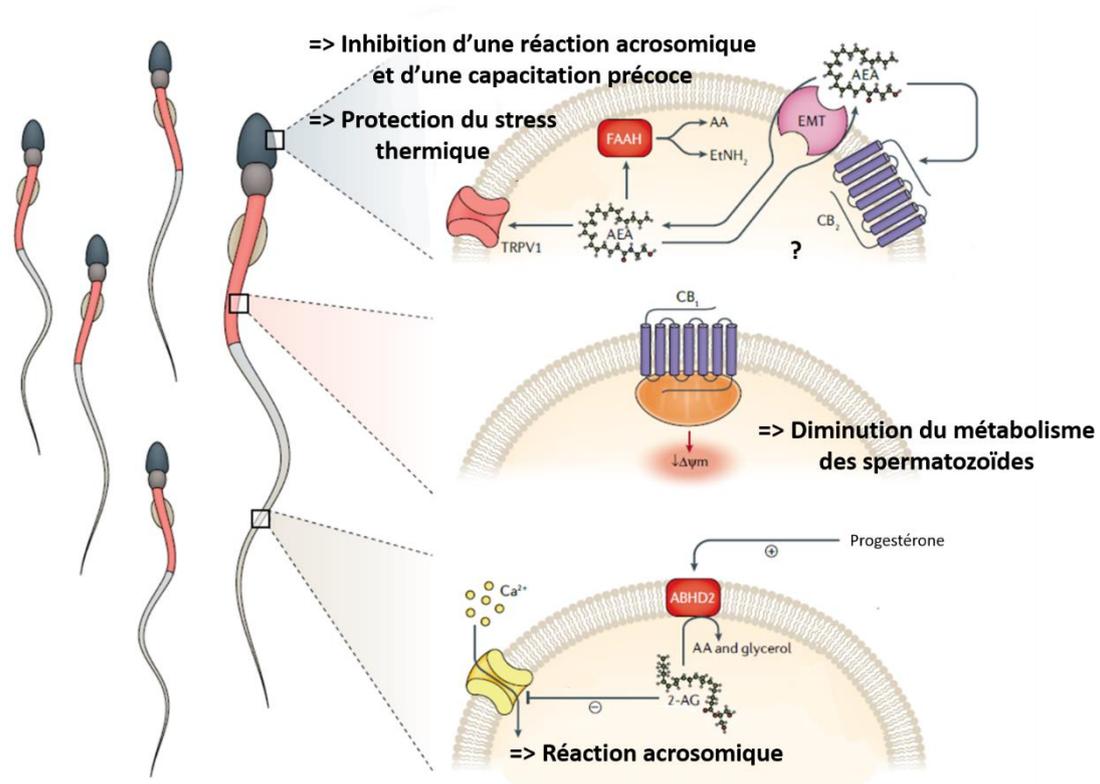


Figure 28 : régulation de l'activité des spermatozoïdes par le système des endocannabinoïdes (modifié à partir de Maccarrone, 2020)

Plusieurs composants du système des endocannabinoïdes sont exprimés par les spermatozoïdes, de façon différentielle selon la région de la cellule. L'activation du *Transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) (et du *Cannabinoid receptor 1*, CB1) par l'anandamide (AEA) prévient d'une réaction acrosomique (et d'une capacitation) précoce. TRPV1 joue un rôle dans la protection du stress thermique des spermatozoïdes, favorisant leur survie. L'activation du récepteur CB1 (par le *2-arachidonoylglycerol*, 2-AG) entraîne la diminution du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), faisant diminuer le métabolisme énergétique nécessaire à la motilité des spermatozoïdes. L'activation du *Cannabinoid receptor 2* (CB2) possiblement par l'AEA pourrait également être impliquée dans la régulation de la motilité des spermatozoïdes. Enfin, la dégradation du 2-AG par l'enzyme *α/β-hydrolase domain containing 2* (ABHD2), dont l'activité est stimulée par la progestérone d'origine ovocytaire, permet l'ouverture des canaux calciques, ce qui déclenche la réaction acrosomique.

Plusieurs études *in vitro* ont rapporté que le système des ECB affecte négativement la motilité des spermatozoïdes (Rossato et al., 2005; Ricci et al., 2007; Aquila et al., 2009; Badawy et al., 2009; Aquila et al., 2010; Amoako et al., 2013; Francou et al., 2017) via l'activation de CB1 (Rossato et al., 2005; Ricci et al., 2007; Aquila et al., 2009, 2010; Amoako et al., 2013). Effectivement, le traitement chronique (2 semaines) de rat avec un agoniste de CB1 et CB2, le HU210, entraîne une altération de la motilité des spermatozoïdes (S. E. Lewis et al., 2012). Chez l'homme, CB1 agirait sur le potentiel membranaire mitochondrial, altérant le métabolisme énergétique nécessaire à la motilité des spermatozoïdes (Barbonetti et al., 2010) (**Figure 28**). Il a été montré chez la souris qu'un gradient décroissant de 2-AG dans l'épididyme, induisant une diminution progressive de l'activation de CB1, est nécessaire pour l'acquisition progressive de la capacité de motilité des spermatozoïdes (Cobellis et al., 2010). Ce processus pourrait être le même chez l'homme (Rossato et al., 2005). Des études chez l'homme ont montré que CB2 serait également impliqué dans l'inhibition de la motilité des spermatozoïdes (Agirregoitia et al., 2010).

Dans le tractus génital femelle, les spermatozoïdes vont subir une étape de maturation supplémentaire, la capacitation, au cours de laquelle des modifications protéiques et lipidiques de leur membrane plasmique vont leur permettre la fécondation de l'ovocyte (Baldi, 2000; Guraya, 2000). L'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte est ensuite permise par la réaction acrosomique, au cours de laquelle une libération des enzymes permet d'hydrolyser la zone pellucide de l'ovocyte au point d'entrée. Cette réaction acrosomique est déclenchée par un influx de calcium dans le spermatozoïde. Il a été montré chez la souris et chez l'homme que le système des ECB régule la capacitation, la réaction acrosomique et la fécondation de l'ovocyte.

Ainsi, la signalisation de l'AEA sur TRPV1 (et sur CB1) est essentielle pour prévenir d'une capacitation et d'une réaction acrosomique spontanée précoce des spermatozoïdes humains (Schuel et al., 2002b; Rossato et al., 2005; Francavilla et al., 2009; Bernabò et al., 2012) (**Figure 28**). De façon cohérente, la concentration d'endocannabinoïdes est décroissante dans le tractus génital féminin (Schuel et al., 2002a), permettant l'induction progressive de la capacitation et de la réaction acrosomique. Il a cependant été montré qu'au moment même de la capacitation, une réduction de l'expression de FAAH entraîne l'augmentation des taux d'AEA intracellulaires, signal autocrine qui serait essentiel à la capacitation via l'activation de

TRPV1 et de CB1 (Bernabò et al., 2012; Martínez-León et al., 2019). De la même manière, au moment de la réaction acrosomique, l'activation de TRPV1 est essentielle à l'influx de calcium, signal nécessaire au déclenchement de la réaction acrosomique (Bernabò et al., 2012). Ces effets opposés de l'AEA seraient permis par ses différentes concentrations au cours de l'avancée des spermatozoïdes, entraînant l'activation différentielle de voies de signalisation (Schuel et al., 2002b; Martínez-León et al., 2019).

Chez l'homme il a été décrit un rôle double du 2-AG dans la réaction acrosomique. La dégradation du 2-AG par l'enzyme ABHD2 dans les spermatozoïdes serait essentielle au déclenchement de la réaction acrosomique (Miller et al., 2016). A l'approche du gamète femelle, la progestérone, sécrétée par l'ovocyte, stimule l'activité d'ABHD2 en se fixant dessus. Le 2-AG étant un inhibiteur de l'entrée du calcium intracellulaire, sa dégradation entraîne un influx de calcium dans le spermatozoïde, déclenchant la réaction acrosomique (Miller et al., 2016) **(Figure 28)**. Une autre étude a cependant mis en évidence au contraire qu'un traitement des spermatozoïdes humains avec du 2-AG entraîne une réaction acrosomique précoce (Francou et al., 2017). Cette observation illustre l'importance d'une régulation fine de la chronologie et des doses d'endocannabinoïdes sur ces processus physiologiques.

TRPV1 jouerait aussi un rôle dans la protection des spermatozoïdes face à des stress thermiques, typiquement lors de leur passage dans les voies génitales femelles (De Toni et al., 2016) **(Figure 28)**.

La dérégulation du système des ECB est corrélée avec des anomalies spermatiques chez l'homme. Dans une étude comparant le sperme d'hommes fertiles et infertiles (présentant une azoospermie), il a été mis en évidence une diminution de l'expression des récepteurs CB1 et CB2, une inhibition totale de l'activité du récepteur TRPV1, de plus faibles quantités d'AEA et de 2-AG et une diminution de l'expression et de l'activité d'enzymes de synthèse et de métabolisation des endocannabinoïdes dans le sperme d'hommes infertiles (S. E. M. Lewis et al., 2012). De même, une autre étude a observé une diminution de l'AEA et une diminution de l'expression de CB1 dans le sperme d'hommes infertiles (Amoako et al., 2013). Enfin, il a été observé une association entre les concentrations de plusieurs endocannabinoïdes, dont l'AEA, avec la qualité du sperme (Zufferey et al., 2020). Vu les rôles de l'AEA, du 2-AG et de TRPV1 précédemment décrits, une altération de la signalisation du

système des ECB pourrait expliquer en partie l'infertilité des individus (mort cellulaire des cellules germinales au cours de la spermatogenèse, induisant un faible compte spermatique, mauvaise acquisition de leur motilité, capacitation et/ou réaction acrosomique précoce, etc.). Il a été proposé que le dosage des endocannabinoïdes dans le sperme puisse servir de biomarqueurs pour des troubles de la fertilité (Rapino et al., 2014).

De façon cohérente, le traitement chronique d'un modèle rongeur avec un agoniste de CB1 et CB2 a causé une dérégulation du système des ECB, entraînant une réduction du compte spermatique (S. E. Lewis et al., 2012). Une autre étude a montré que le traitement de rat avec un agoniste de CB2 induit une réduction du nombre de spermatozoïdes produits, et entraîne des effets néfastes chez la descendance via des modifications épigénétiques du génome des spermatozoïdes (Innocenzi et al., 2019). Enfin, l'étude de souris dont le récepteur CB1 est invalidé a révélé des défauts de l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes ainsi que des altérations épigénétiques et de compaction de la chromatine (Cacciola et al., 2013).

Comme vu dans ce paragraphe, le système des ECB intervient dans la régulation de processus majeurs de la fonction reproductive tels que la fonction endocrine et la spermatogenèse. Il a également été montré que le système jouait un rôle dans le développement embryonnaire, dès la fécondation, puis module l'organogenèse de différents tissus, dont le testicule.

3. Rôles du système des ECB au cours du développement

Chez les mammifères, il a été montré qu'un système des ECB fonctionnel est nécessaire dans plusieurs étapes du développement précoce.

Ainsi, le système des ECB joue un rôle dans le développement de l'embryon pré-implantatoire, de sa migration à travers l'oviducte jusqu'à l'utérus ainsi qu'au cours de l'implantation et du développement placentaire (pour revue : Fride, 2008; Bambang et al.,

2010; Taylor et al., 2010; Chan et al., 2013; Correa et al., 2016a; Bukiya, 2019; Ezechukwu et al., 2020).

Chez le rongeur et la femme, le système des ECB est exprimé dans le tissu ovarien (El-Talatini et al., 2009), l'oviducte (Wang et al., 2004; H. Wang et al., 2006) et l'utérus (Das et al., 1995; Scotchie et al., 2015). Dans l'embryon murin, les enzymes de synthèse et de dégradation de l'AEA, NAPE-PLD et FAAH, sont détectées dès le stade embryonnaire deux cellules. CB2 est détecté dès le stade de cellule œuf tandis que CB1 apparaît au stade 4 cellules (Paria et al., 1995). Dans les tissus embryonnaires et maternels, les niveaux d'endocannabinoïdes sont finement et localement régulés par l'expression et l'activité de leurs enzymes de synthèse et de dégradation.

La signalisation la plus étudiée est celle de l'AEA (et du 2-AG) sur CB1. Le rôle de CB2 dans la grossesse est moins connu. A noter, une partie de la régulation des différentes étapes du développement embryonnaire précoce du système des ECB passe par une régulation du système immunitaire (Bambang et al., 2012).

Il a été montré que de trop hauts niveaux d'AEA (Schmid et al., 1997; Paria et al., 1998; Guo et al., 2005; H. Wang et al., 2006) et de 2-AG (Paria et al., 1998) sont délétères au bon développement embryonnaire précoce murin, dès le stade deux cellules. De même, des faibles niveaux d'AEA sont nécessaires à la migration du blastocyste (un stade de développement embryonnaire plus avancé) de l'oviducte jusque dans l'utérus (Wang et al., 2004; H. Wang et al., 2006; Xie et al., 2012). La modulation du système des ECB est également indispensable à la synchronisation du développement embryonnaire avec la réceptivité utérine pour l'implantation. Ainsi, il a été montré que de faibles niveaux d'AEA (Paria et al., 1996; Guo et al., 2005; Wang et al., 2007) ainsi que de faibles niveaux de 2-AG (Wang et al., 2007; Fonseca et al., 2010) au site d'implantation et que de faibles niveaux d'AEA et de CB1 dans le blastocyste (Paria et al., 2001) sont nécessaires à cette implantation. Le système des ECB est également modulé lors de l'invasion du blastocyste dans l'endomètre chez l'homme (Habayeb et al., 2004) et chez le rongeur (Fonseca et al., 2010, 2009; Habayeb et al., 2004, p. 201). Des faibles taux d'AEA sont également nécessaires au bon déroulement de ce processus (Fonseca et al., 2009, 2013).

Chez la femme, les niveaux d'AEA sont relativement bas au cours de la grossesse (Lam et al., 2008). Une hausse de ces niveaux dans le plasma est associée avec des défauts gestationnels (Maccarrone et al., 2000, 2001; Maccarrone, 2002; Habayeb et al., 2004, 2008a, 2008b; Horne et al., 2008; Trabucco et al., 2009; Taylor et al., 2011; Gebeh et al., 2013). Néanmoins, cette observation n'a pas été vérifiée dans toutes les études (Tong et al., 2012). Il a cependant été montré qu'une dérégulation du système des ECB est associée avec l'apparition de pathologies placentaires chez la femme comme l'endométriose, les grossesses ectopiques, les fausses-couches et la pré-éclampsie (Maia et al., 2020).

Plus tard au cours de la gestation, le système des ECB est primordial à l'ontogenèse du système nerveux (Fernández-Ruiz et al., 1999; Galve-Roperh et al., 2009). Le 2-AG et l'AEA ainsi que le récepteur CB1 sont détectés dans le cerveau de rat fœtal (Buckley et al., 1997; Berrendero et al., 1999). Le système des ECB est également impliqué dans la modulation de processus régulant l'établissement et l'activité du placenta (prolifération cellulaire, différenciation, métabolisme cellulaire, etc.) (Costa, 2016; Maia et al., 2020). Enfin, le système des ECB est modulé au moment de la parturition/l'accouchement et il a été montré qu'il jouait un rôle sur le déclenchement de ce dernier (Accialini et al., 2020; Kozakiewicz et al., 2021).

4. Rôles du système des ECB au cours du développement testiculaire

Il a été montré chez des modèles de rongeur que le système des ECB joue un rôle dans l'ontogenèse testiculaire.

Chez le rat, le système des ECB était impliqué dans la différenciation des ALC et est négativement corrélé avec la division cellulaire dans ces cellules (Cacciola et al., 2008). Ces résultats sont cohérents avec des études où des modèles murins, dont le récepteur CB1 est invalidé, présentent des taux de testostérone plus faibles, du fait de l'altération de la différenciation des ALC (Wenger et al., 2001).

Comme vu plus haut, l'AEA a un rôle pro-apoptotique sur les cellules de Sertoli chez la souris, et ce en particulier pendant la période post-natale (Maccarrone et al., 2003). Un

dérèglement de cette signalisation peut avoir un effet négatif sur le nombre des cellules de Sertoli et donc par conséquent sur le nombre des cellules germinales supportées chez adulte (Orth et al., 1988).

Chez la souris, l'expression de CB1 et de CB2 est détectée dans le testicule fœtal dès E11,5, presque exclusivement dans les gonocytes (De Domenico et al., 2017a). Si l'expression de CB1 reste constante et à relativement faible niveau au cours du reste du développement embryonnaire et après la naissance, l'expression de CB2 augmente constamment jusqu'à la naissance. Il a été montré que l'activation du récepteur CB2 *in vitro* par une exposition avec un agoniste, le JWH133, entraîne l'induction de la méiose des cellules germinales fœtales chez le mâle (De Domenico et al., 2017a).

Ces quelques études chez le modèle rongeur montrant l'implication du système des ECB dans l'ontogenèse testiculaire laisse suggérer qu'il intervient dans ce processus chez l'homme. Cependant, très peu d'études à l'heure actuelle se sont intéressées à l'implication du système des ECB dans le développement du testicule humain.

Nous avons vu au cours de ces paragraphes que le système des ECB est impliqué dans la régulation d'un grand nombre de fonctions physiologiques, dont celle de la reproduction. La modulation de ce système, par la consommation de produits contenant des ligands exogènes, comme le cannabis, ou par l'exposition à des molécules régulatrices des récepteurs ou des enzymes, peut entraîner des effets drastiques. Ainsi, depuis des siècles, le cannabis est utilisé à la fois de manière récréationnelle mais aussi de manière thérapeutique dans le soulagement de plusieurs symptômes.

C) Consommation récréationnelle et thérapeutique du cannabis

1. Pharmacocinétique et pharmacodynamique du cannabis

Il existe plusieurs routes d'administration du cannabis, les principales étant (Russell et al., 2018) :

- l'inhalation, en fumant des cigarettes de cannabis mélangé ou non à du tabac (communément appelées « joints »), ou par d'autres méthodes impliquant également de la combustion (bang, pipe..),
- l'inhalation par vaporisation,
- en le mangeant/buvant (aussi appelée consommation « orale »),
- l'injection intraveineuse,
- l'absorption par la peau ou les muqueuses via des crèmes, des patchs, des sprays (aussi appelée « administration oromucosale ou sublinguale ») ou des suppositoires.

La route d'administration du cannabis modifie les effets, ainsi que leur rapidité d'apparition, leur intensité et leur durée.

Les caractéristiques pharmacologiques les plus décrites sont celle du CBD et du Δ^9 -THC. Les prochains paragraphes sont concentrés sur la pharmacocinétique (caractérisant l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion d'un composé) et la pharmacodynamique (caractérisant l'effet d'un composé sur l'organisme) de ces deux phytocannabinoïdes (pour revue : Grotenhermen, 2003; Huestis, 2005, 2007; Lucas et al., 2018).

Echantillon	Dose	Administration	Cmax plasmatique	Référence
5 hommes consommateurs de cannabis (réguliers et occasionnels)	20 mg de CBD	Joint	$3,5 \times 10^{-7}M$	(Ohlsson et al., 1986)
		Injection intraveineuse	$2,2 \times 10^{-6}M$	
9 hommes et 1 femme	18,2 mg de $\Delta 9$ -THC	Joint	$1,5 \times 10^{-7}M$	(Kauert et al., 2007)
	36,5 mg de $\Delta 9$ -THC		$2,5 \times 10^{-7}M$	
11 hommes consommateurs de cannabis (réguliers et occasionnels)	13 mg de $\Delta 9$ -THC	Joint	$2,5 \times 10^{-7}M$	(Ohlsson et al., 1980)
	5 mg de $\Delta 9$ -THC	Injection intraveineuse	$7 \times 10^{-7}M$	
	20 mg de $\Delta 9$ -THC	Cookie	Entre $1,4 \times 10^{-8}M$ et $4,5 \times 10^{-8}M$	
24 hommes consommateurs de cannabis (entre 2 et 9 fois/mois)	29,3 mg de $\Delta 9$ -THC	Joint	$4,3 \times 10^{-7}M$	(Hunault et al., 2008)
	49,1 mg de $\Delta 9$ -THC		$6,5 \times 10^{-7}M$	
9 consommateurs « occasionnels » de cannabis (> 2 fois/mois et < 3 fois/semaine)	50,6 mg de $\Delta 9$ -THC + 1,5 mg de CBD	Joint	$2,66 \times 10^{-6}M$ ($\Delta 9$ -THC) $2,97 \times 10^{-7}M$ (CBD)	(Swortwood et al., 2017)
		Vaporisé	$1,73 \times 10^{-6}M$ ($\Delta 9$ -THC) $2,33 \times 10^{-7}M$ (CBD)	
		Cannabis broyé dans un brownie	$6,42 \times 10^{-7}M$ ($\Delta 9$ -THC) $1,88 \times 10^{-8}M$ (CBD)	
11 consommateurs « réguliers » de cannabis (≥ 5 fois/semaine)		Joint	$8,87 \times 10^{-6}M$ ($\Delta 9$ -THC) $1,77 \times 10^{-7}M$ (CBD)	
		Vaporisé	$5,96 \times 10^{-6}M$ ($\Delta 9$ -THC) $8,97 \times 10^{-8}M$ (CBD)	
		Cannabis broyé dans un brownie	$9,44 \times 10^{-7}M$ ($\Delta 9$ -THC) $2,54 \times 10^{-8}M$ (CBD)	
8 hommes et 1 femme consommateurs « occasionnels » de cannabis (1 fois/mois environ)	19 mg de $\Delta 9$ -THC	Joint	$9,1 \times 10^{-7}M$	(Lindgren et al., 1981)
	5 mg de $\Delta 9$ -THC	Injection intraveineuse	$9,1 \times 10^{-7}M$	
8 hommes et 1 femme consommateurs « réguliers » de cannabis (≥ 1 fois/jour)		Joint	$9,6 \times 10^{-7}M$	
		Injection intraveineuse	$9,6 \times 10^{-7}M$	

Table 1 : Concentrations maximales (Cmax) plasmatiques du $\Delta 9$ -THC et du CBD chez l'homme selon la fréquence de consommation, la dose et le mode d'administration.

a) Pharmacocinétique du CBD et du $\Delta 9$ -THC

(1) Absorption et distribution du CBD et du $\Delta 9$ -THC

La consommation par inhalation du cannabis entraîne une biodisponibilité (définie comme la proportion d'un principe actif atteignant la circulation sanguine) du $\Delta 9$ -THC et du CBD hautement variable. Elle dépend des individus étudiés, de la méthode de préparation qualitative et quantitative du cannabis, de la méthode d'inhalation employée (le cannabis est fumé ou vaporisé) et des caractéristiques de l'inhalation (nombre, durée, volume inhalé, intervalle entre les inhalations, apnée, etc.) (Heishman et al., 1989; Perez-Reyes, 1990; Azorlosa et al., 1992).

La méthode de consommation la plus fréquente de cannabis est la consommation de joints (Russell et al., 2018). Cette consommation entraîne une biodisponibilité du $\Delta 9$ -THC qui varie de 2 à 56% (Aguirell et al., 1981; Ohlsson et al., 1982; Aguirell et al., 1986), tandis que celle du CBD est d'environ 35% (Grotenhermen, 2003). Une partie des phytocannabinoïdes est perdue par la pyrolyse et par le filtre au bout du joint (Grotenhermen, 2003).

Après la consommation d'un joint, les concentrations maximales (C_{max}) plasmatiques de $\Delta 9$ -THC et de CBD sont atteintes rapidement (en 3 à 10 minutes) puis diminuent pour disparaître au maximum après 3,5 heures. Les C_{max} plasmatiques du $\Delta 9$ -THC et du CBD obtenus selon les doses, les modes et la fréquence de consommation sont résumés dans la **Table 1**.

Chez 5 hommes consommateurs de cannabis (fréquents et occasionnels, sans distinction), la consommation d'un joint contenant 20 mg de CBD a entraîné une C_{max} plasmatique du CBD égale à $3,5 \times 10^{-7}M$ (Ohlsson et al., 1986). Dans d'autres études, la consommation d'un joint par des hommes (et une femme dans l'étude de Kauert et al., 2007) ayant une fréquence de consommation majoritairement occasionnelle, contenant 18,2 mg (Kauert et al., 2007), 13 mg (Ohlsson et al., 1980), 29,3 mg (Hunault et al., 2008), 36,5 mg (Kauert et al., 2007), 49,1 mg et 69,4 mg (Hunault et al., 2008) de $\Delta 9$ -THC, entraîne une C_{max} plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $1,5 \times 10^{-7}M$, $2,5 \times 10^{-7}M$, $4,3 \times 10^{-7}M$, $2,5 \times 10^{-7}M$, $6,5 \times 10^{-7}M$ et $7,3 \times 10^{-7}M$ respectivement.

9 hommes et 1 femme consommateurs de cannabis (≥ 2 fois/mois)	54 mg de Δ9-THC	Joint	2,42 x 10 ⁻⁷ M (Δ9-THC)	(Schwope et al., 2011)
25 hommes consommateurs « occasionnels » de cannabis (≥ 1 fois/mois et (≤ 1 fois/semaine)	43 mg de Δ9-THC	Joint	2,38 x 10 ⁻⁷ M	(Fabritius et al., 2013)
23 hommes consommateurs de cannabis « réguliers » (≥ 2,3 fois/semaine)			2,77 x 10 ⁻⁷ M	
8 hommes et 4 femmes consommateurs « occasionnels » de cannabis (≤ 1 fois/semaine)	22,5 à 47,5 mg de Δ9-THC (selon le poids corporel)	Joint	1,7 x 10 ⁻⁷ M	(Toennes et al., 2008)
9 hommes et 3 femmes consommateurs « réguliers » de cannabis (≥ 4 fois/semaine)			7,2 x 10 ⁻⁷ M	
8 hommes et 3 femmes consommateurs « occasionnels » de cannabis (< 2 fois/semaine)	54 mg de Δ9-THC	Joint	8 x 10 ⁻⁸ M	(Desrosiers et al., 2014)
10 hommes et 4 femmes consommateurs « réguliers » de cannabis (≥ 10 fois/mois)			1,1 x 10 ⁻⁷ M	
14 hommes consommateurs « occasionnels » de cannabis (≥ 1 fois/mois, ≤ 1 fois/semaine)	20 mg de Δ9-THC	Joint	8,2 x 10 ⁻⁸ M (de 5,1 x 10 ⁻⁹ M à 5,1 x 10 ⁻⁷ M)	(Marsot et al., 2016)
18 consommateurs de cannabis (médiane de 5-6 joints dans les 30 derniers jours)	1,7 % de Δ9-THC	Vaporisation	2,19 x 10 ⁻⁷ M	(Abrams et al., 2007)
	3,4 % de Δ9-THC		3,57 x 10 ⁻⁷ M	
	6,8 % de Δ9-THC		5,95 x 10 ⁻⁷ M	
9 consommateurs « occasionnels » de cannabis (≥ 2 fois/mois et ≤ 3 fois/semaine)	50,6 mg de Δ9-THC	Joint	1,64 x 10 ⁻⁷ M	(Newmeyer et al., 2016)
		Vaporisation	1,52 x 10 ⁻⁷ M	
		Cannabis broyé dans un brownie	3,28 x 10 ⁻⁸ M	
11 consommateurs « fréquents » de cannabis (≥ 5 fois/semaine)		Joint	4,80 x 10 ⁻⁷ M	
		Vaporisation	2,69 x 10 ⁻⁷ M	
		Cannabis broyé dans un brownie	17,7 x 10 ⁻⁸ M	

Une autre étude a observé que la consommation d'un joint contenant environ 1,5 mg de CBD par 9 consommateurs définis dans cette étude comme « occasionnels » (consommant plus de 2 fois par mois mais moins de 3 fois par semaine) et 11 consommateurs définis comme « réguliers » (consommant au moins 5 fois par semaine), entraîne une C_{max} plasmatique du CBD égale à $1,87 \times 10^{-8}M$ et $2,54 \times 10^{-8}M$ respectivement, qui ne sont pas statistiquement différentes (Swortwood et al., 2017). Une étude a mis en évidence que la consommation d'un joint contenant 19 mg de $\Delta 9$ -THC par 9 consommateurs de cannabis (8 hommes et 1 femme) définis comme « occasionnels » (consommant 1 fois par mois environ) et 9 consommateurs de cannabis (8 hommes et 1 femme) définis comme « réguliers » (consommant au moins 1 fois par jour), entraîne une C_{max} plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $9,1 \times 10^{-7}M$ et $9,6 \times 10^{-7}M$ respectivement, qui ne sont pas statistiquement différentes (Lindgren et al., 1981). Dans une autre étude, la consommation d'un joint contenant 54 mg de $\Delta 9$ -THC par 10 individus (9 hommes et 1 femme) consommateurs de cannabis (consommant au moins 2 fois par mois) entraîne une C_{max} plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $2,42 \times 10^{-7}M$ (Schwope et al., 2011). Enfin, il a été observé dans une étude que la consommation d'un joint contenant 43 mg de $\Delta 9$ -THC par 25 hommes consommateurs de cannabis définis comme « occasionnels » (consommant minimum 1 fois par mois et maximum 1 fois par semaine) et 23 hommes consommateurs de cannabis définis comme « réguliers » (consommant minimum 2,3 fois par semaine), entraîne une C_{max} plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $2,38 \times 10^{-7}M$ et $2,77 \times 10^{-7} M$ respectivement, qui ne sont pas statistiquement différentes (Fabritius et al., 2013).

En revanche, il a été observé dans certaines études que, pour une même dose de $\Delta 9$ -THC administrées, les C_{max} plasmatiques du $\Delta 9$ -THC des consommateurs réguliers sont significativement plus hautes que celles de consommateurs occasionnels (Toennes et al., 2008; Desrosiers et al., 2014; Swortwood et al., 2017). Ainsi, dans une étude, la consommation d'un joint contenant de 22,5 à 47,5 mg de $\Delta 9$ -THC (selon le poids corporel) par 12 consommateurs de cannabis (8 hommes et 4 femmes) définis comme « occasionnels » (consommant au maximum 1 fois par semaine) et 12 consommateurs de cannabis (9 hommes et 3 femmes) définis comme « réguliers » (consommant au moins 4 fois par semaine), entraîne une C_{max} plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $1,7 \times 10^{-7}M$ et $7,2 \times 10^{-7}M$ respectivement (Toennes et al., 2008). Dans une autre étude, il a été décrit que la

9 hommes et 8 femmes ayant déjà consommé du cannabis, mais pas au cours du dernier mois	10 mg de Δ9-THC	Pipe	1,2 x 10 ⁻⁸ M	(Spindle et al., 2019)
	25 mg de Δ9-THC	Vaporisation	2,4 x 10 ⁻⁸ M	
	10 mg de Δ9-THC	Pipe	3,3 x 10 ⁻⁸ M	
	25 mg de Δ9-THC	Vaporisation	4,6 x 10 ⁻⁸ M	
24 volontaires	10 mg de Δ9-THC	Capsule orale	2,5 x 10 ⁻⁸ M	(Nadulski et al., 2005)
	2,5 mg de Δ9-THC		1 x 10 ⁻⁸ M	
	2,5 mg de Δ9-THC + 1,5 mg de CBD		1,3 x 10 ⁻⁸ M	
4 hommes non expérimentateurs de cannabis	20 mg de Δ9-THC	Résine de cannabis mélangée dans un sandwich	2,2 x 10 ⁻⁸ M	(Law et al., 1984)
6 hommes consommateurs « réguliers » de cannabis (≥ 1/jour)	20 mg de Δ9-THC	Capsule orale	5,2 x 10 ⁻⁸ M	(Schwilke et al., 2009)
9 hommes	10 mg de Δ9-THC	Brownie	3,18 x 10 ⁻¹⁰ M	(Spindle et al., 2020)
	25 mg de Δ9-THC		8,27 x 10 ⁻⁹ M	
	50 mg de Δ9-THC		8,27 x 10 ⁻⁹ M	
6 hommes ayant déjà consommé du cannabis	7,5 mg de Δ9-THC	Capsule orale	3,5 x 10 ⁻⁹ M	(Goodwin et al., 2006)
	14,8 mg de Δ9-THC	Huile de chanvre	3,82 x 10 ⁻⁹ M	
14 hommes et 8 femmes ayant déjà consommé du cannabis	2,5 mg de Δ9-THC	Injection intraveineuse	2,6 x 10 ⁻⁹ M	(D'Souza et al., 2004)
	5 mg de Δ9-THC		3,8 x 10 ⁻⁹ M	
4 hommes et 4 femmes n'ayant jamais consommé de cannabis	0,053 mg/kg de Δ9-THC	Injection intraveineuse	de 2,59 x 10 ⁻⁷ M à 2,04 x 10 ⁻⁶ M	(Naef et al., 2004)
2 hommes atteints de spasticités	2,5 mg de Δ9-THC	Administration rectale	5,7 x 10 ⁻⁹ M	(Brenneisen et al., 1996)
	5 mg de Δ9-THC		1 x 10 ⁻⁸ M	
12 hommes ayant déjà consommé du cannabis	20 mg de Δ9-THC	Cookie	1,59 x 10 ⁻⁸ M (Δ9-THC)	(Aguirell et al., 1981)
	20 mg de Δ9-THC + 40 mg de CBD		similaire	
5 hommes et 3 femmes « consommateurs » de cannabis (≤ 1 fois/jour et ≥ 1 fois/mois)	5 mg de Δ9-THC	Voie orale	1,49 x 10 ⁻⁸ M (Δ9-THC)	(Erin L Karschner et al., 2011a, 2011c)
	5,4 mg de Δ9-THC + 5 mg de CBD	Voie oromucosale	1,62 x 10 ⁻⁸ M (Δ9-THC) 5,09 x 10 ⁻⁹ M (CBD)	
	15 mg de Δ9-THC	Voie orale	4,55 x 10 ⁻⁸ M (Δ9-THC)	
	16,2 mg de Δ9-THC + 15 mg de CBD	Voie oromucosale	4,87 x 10 ⁻⁸ M (Δ9-THC) 2,13 x 10 ⁻⁸ M (CBD)	

consommation d'un joint contenant 54 mg de Δ 9-THC par 11 consommateurs de cannabis (8 hommes et 3 femmes) définis comme « occasionnels » (consommant moins de 2 fois par semaine) et 14 consommateurs de cannabis (10 hommes et 4 femmes) définis comme « réguliers » (consommant au moins 4 fois par semaine), entraîne une Cmax plasmatique du Δ 9-THC égale à $3,8 \times 10^{-8}M$ et $1,1 \times 10^{-7}M$ respectivement (Desrosiers et al., 2014). Enfin, une étude a mis en évidence que la consommation d'un joint contenant environ 50,6 mg de Δ 9-THC par 9 consommateurs définis comme « occasionnels » (consommant plus de 2 fois par mois mais moins de 3 fois par semaine) et de 11 consommateurs définis comme « réguliers » (consommant au moins 5 fois par semaine) entraîne une Cmax plasmatique du Δ 9-THC égale à $2,66 \times 10^{-6}M$ et $8,87 \times 10^{-6}M$ respectivement (Swortwood et al., 2017). Dans deux études précédemment citées, les Cmax plasmatiques du CBD n'étaient pas différentes entre les deux groupes d'individus (Desrosiers et al., 2014; Swortwood et al., 2017).

Des études ont également observé une augmentation et une prolongation temporelle des Cmax plasmatiques de deux métabolites du Δ 9-THC, le 11-OH- Δ 9-THC et le 11-COOH- Δ 9-THC, chez des consommateurs réguliers par rapport à des consommateurs occasionnels (Toennes et al., 2008; Desrosiers et al., 2014; Newmeyer et al., 2016; Swortwood et al., 2017).

Dans tous les travaux cités plus haut, il a été mis en évidence une très grande variabilité inter-individuelle des Cmax atteintes pour la consommation théorique d'une même dose de Δ 9-THC et/ou de CBD et ce, chez des individus ayant la même fréquence de consommation. Par exemple, chez 14 hommes consommateurs dits « occasionnels » (consommant au maximum 1 fois par semaine et au minimum 1 fois par mois), la consommation d'un joint contenant 20 mg de Δ 9-THC a entraîné une Cmax plasmatique du Δ 9-THC médiane égale à $8,20 \times 10^{-8}M$ mais pouvant varier de $5,1 \times 10^{-9}M$ à $5,1 \times 10^{-7}M$ selon les individus (Marsot et al., 2016).

Une méthode d'administration du cannabis relativement récente est la vaporisation (Gieringer, 2001; Gieringer et al., 2004). Elle permet de s'affranchir des effets néfastes des produits de combustion mais n'est pas exempt d'effets négatifs sur la santé (Meehan-Atrash and Rahman, 2021). Elle entraîne une biodisponibilité du CBD et du Δ 9-THC relativement

20 femmes atteintes de fibromyalgie causant des douleurs chroniques	22,4 mg de Δ9-THC + < 1 mg de CBD	Vaporisation	2,6 x 10 ⁻⁷ M (Δ9-THC)	(van de Donk et al., 2019a)
	13,4 mg de Δ9-THC + 17,8 mg de CBD		2,4 x 10 ⁻⁷ M(Δ9-THC)	
	< 1 mg de Δ9-THC + 18,4 mg de CBD		4,1 x 10 ⁻⁸ M(Δ9-THC)	
11 hommes et 3 femmes consommateurs « occasionnels » de cannabis (≥ 10 fois au cours de la vie, < 2 fois/semaine)	125 mg de Δ9-THC	Vaporisation	1 x 10 ⁻⁷ M	(Arkell et al., 2019)
	125 mg de Δ9-THC + 125 mg de CBD		1,33 x 10 ⁻⁷ M	

haute, pouvant dépasser celles obtenues après la consommation d'un joint (Solowij et al., 2014; Liu et al., 2020) Selon les études, la pharmacocinétique du $\Delta 9$ -THC et du CBD selon si le cannabis est consommé fumé (impliquant une combustion) ou vaporisé est comparable (Abrams et al., 2007; Newmeyer et al., 2016; Swortwood et al., 2017) mais une étude a trouvé que les Cmax plasmatiques du $\Delta 9$ -THC (et de ses métabolites) induites après une consommation de cannabis par vaporisation étaient significativement plus hautes comparé à une consommation par combustion. Dans cette étude, la consommation de 10 mg de $\Delta 9$ -THC ou de 25 mg de $\Delta 9$ -THC par combustion (via l'utilisation d'une pipe) par 17 individus (9 hommes et 8 femmes) ayant déjà consommé du cannabis mais n'en n'ayant pas consommé au cours du dernier mois, a entraîné une Cmax plasmatique égale à $1,2 \times 10^{-8}M$ et $3,3 \times 10^{-8}M$ du $\Delta 9$ -THC respectivement. Les mêmes quantités de $\Delta 9$ -THC administrées par vaporisation ont entraîné une Cmax plasmatique égale à $2,4 \times 10^{-8}M$ et $4,6 \times 10^{-8}M$ du $\Delta 9$ -THC respectivement (Spindle et al., 2019).

Certaines études ont également mis en évidence une augmentation statistique des Cmax plasmatiques du $\Delta 9$ -THC, mais pas du CBD, chez des consommateurs réguliers par rapport aux consommateurs occasionnels quand il est consommé par vaporisation (Newmeyer et al., 2016; Swortwood et al., 2017).

La consommation orale de cannabis résulte en une biodisponibilité faible du CBD et du $\Delta 9$ -THC (de 4 à 20%) (Wall et al., 1983; Agurell et al., 1981; Ohlsson et al., 1980; Gaston and Friedman, 2017). Plusieurs raisons expliquent cette observation :

- une partie des phytocannabinoïdes est détruite dans l'estomac
- il existe une faible absorption gastro-intestinale de ces composés très lipophiles. Ce paramètre peut être amélioré en ingérant des corps gras de façon concomitante aux phytocannabinoïdes (Stott et al., 2013)
- les phytocannabinoïdes passent dans le foie où ils sont métabolisés.

Le métabolisme hépatique des composants du cannabis résulte également en une faible Cmax de $\Delta 9$ -THC et un retard temporel pour l'atteindre (entre 1 à 3 heures) comparé à la consommation d'un joint.

Une étude a observé que l'ingestion orale d'une capsule contenant 10 mg de $\Delta 9$ -THC entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $2,5 \times 10^{-8} \text{M}$ chez 24 volontaires (Nadulski et al., 2005). Dans d'autres études, l'ingestion orale de 20 mg de $\Delta 9$ -THC par différentes méthodes entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $2,2 \times 10^{-8} \text{M}$ chez 4 hommes n'ayant jamais expérimenté le cannabis (Law et al., 1984), entre $1,4 \times 10^{-8} \text{M}$ et $4,5 \times 10^{-8} \text{M}$ chez 11 hommes consommateurs de cannabis (occasionnels et réguliers, sans distinction) (Ohlsson et al., 1980) et égale à $5,2 \times 10^{-8} \text{M}$ chez 6 hommes consommateurs définis comme « réguliers » de cannabis (consommant au moins une fois par jour) (Schwilke et al., 2009). Une étude a observé que l'administration d'un brownie contenant 50,6 mg de $\Delta 9$ -THC chez 9 consommateurs définis comme « occasionnels » (consommant plus de 2 fois par mois mais moins de 3 fois par semaine) et 11 consommateurs définis comme « réguliers » (consommant au moins 5 fois par semaine), entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $3,28 \times 10^{-8} \text{M}$ et $17,7 \times 10^{-8} \text{M}$ respectivement, qui ne sont pas statistiquement différentes (Newmeyer et al., 2016). L'administration d'un brownie contenant 1,5 mg de CBD à des consommateurs « occasionnels » ou « réguliers », définis de la même manière que l'étude précédente, entraîne une Cmax plasmatique du CBD égale à $1,88 \times 10^{-8} \text{M}$ et $2,54 \times 10^{-8} \text{M}$ respectivement, qui ne sont pas statistiquement différentes (Swortwood et al., 2017). L'administration d'un brownie contenant 10, 25 ou 50 mg de $\Delta 9$ -THC à 9 hommes entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $3,18 \times 10^{-10} \text{M}$, $8,27 \times 10^{-9} \text{M}$ et $8,27 \times 10^{-9} \text{M}$ respectivement (Spindle et al., 2020). Dans une autre étude, l'administration d'un brownie contenant 10, 25 ou 50 mg de $\Delta 9$ -THC à 6 individus dans chaque groupe ayant déjà consommé du cannabis induit une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $3,18 \times 10^{-9} \text{M}$, $1,11 \times 10^{-8} \text{M}$ et $1,04 \times 10^{-8} \text{M}$ respectivement (Vandrey et al., 2017) Enfin, une étude a comparé les Cmax du $\Delta 9$ -THC après une administration orale de $\Delta 9$ -THC à différentes doses selon plusieurs modes d'administration (Goodwin et al., 2006). Il a été administré à 6 individus ayant déjà expérimenté le cannabis, de l'huile de chanvre contenant 0,39 mg ou 14,8 mg de $\Delta 9$ -THC, de l'huile de chanvre contenant 0,47 mg de $\Delta 9$ -THC mis dans une capsule ou une capsule contenant 7,5 mg de $\Delta 9$ -THC. Pour les doses de 0,39 mg et de 0,47 mg de $\Delta 9$ -THC, le $\Delta 9$ -THC n'est pas détectable dans le sérum des individus. L'administration de 7,5 mg ou de 14,8 mg de $\Delta 9$ -THC entraîne des Cmax similaires ($3,5 \times 10^{-9} \text{M}$ et $3,82 \times 10^{-9} \text{M}$

Cette dernière étude a d'ailleurs mis en évidence une augmentation statistique de la Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC, mais pas celle du CBD, chez des consommateurs réguliers par rapport aux consommateurs occasionnels (Swortwood et al., 2017).

Par définition, l'injection intraveineuse de phytocannabinoïdes entraîne une biodisponibilité maximale de ces derniers. Administrés par intraveineuse, le $\Delta 9$ -THC et le CBD atteignent leur Cmax en quelques minutes. Ces dernières diminuent ensuite progressivement pour disparaître après quelques heures. Cette méthode d'administration entraîne des Cmax du $\Delta 9$ -THC et du CBD majoritairement plus hautes que celles atteintes après avoir consommé un joint.

Ainsi, l'injection intraveineuse de 5 mg de $\Delta 9$ -THC chez 9 consommateurs de cannabis (8 hommes et 1 femme) définis comme « occasionnels » (1 fois par mois environ) et 9 consommateurs de cannabis (8 hommes et 1 femme) définis comme « réguliers » (consommant au moins 1 fois par jour), entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $9,1 \times 10^{-7}M$ et $9,6 \times 10^{-7}M$ respectivement, qui ne sont pas significativement différentes (Lindgren et al., 1981). Dans d'autres études, l'injection intraveineuse de 5 mg de $\Delta 9$ -THC chez 11 hommes consommateurs de cannabis (occasionnels et réguliers, sans distinction) entraîne une Cmax plasmatique moyenne du $\Delta 9$ -THC égale à $7 \times 10^{-7}M$ (Ohlsson et al., 1980) et une injection de 2,5 mg et 5 mg de $\Delta 9$ -THC chez 22 individus (14 hommes et 8 femmes) ayant déjà consommé du cannabis au cours de la vie résulte en une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $2,6 \times 10^{-9}M$ et $3,8 \times 10^{-9}M$ respectivement (D'Souza et al., 2004). Une étude a mis en évidence que l'administration chez 8 individus (4 hommes, 4 femmes) n'ayant jamais consommé de cannabis par intraveineuse de 0,053 mg/kg de $\Delta 9$ -THC entraîne ces Cmax plasmatiques du $\Delta 9$ -THC allant de $2,59 \times 10^{-7}M$ à $2,04 \times 10^{-6}M$ (Naef et al., 2004). Enfin, une injection de 20 mg de CBD chez 5 hommes consommateurs de cannabis (occasionnels et réguliers, sans distinction) entraîne une Cmax plasmatique moyenne du CBD égale à $2,2 \times 10^{-6}M$ (Ohlsson et al., 1986).

Les préparations oromucosales produisent une Cmax des phytocannabinoïdes plus forte que l'administration orale mais plus faible que la consommation de joints.

L'administration transdermale du cannabis n'en n'est qu'à un stade de développement précoce chez l'homme à la date où est écrit ce manuscrit. Ce mode d'administration permet d'éviter le métabolisme hépatique mais la diffusion des cannabinoïdes à travers la peau est limitée due à leur nature hautement hydrophobe (Scheuplein, 1967; Challapalli and Stinchcomb, 2002; Lodzki et al., 2003; Stinchcomb et al., 2010). Une étude utilisant un patch transdermique chez le cochon d'Inde a montré que la concentration d'un phytocannabinoïde, le Δ^8 -THC, atteignait la Cmax plasmatique en 1,4 heures et était maintenue pendant moins de 48 heures (Valiveti et al., 2004). Cette méthode d'administration dépend de la perméabilité cutanée ainsi que du flux sanguin local et pourrait être hautement variable selon le poids des patients.

Enfin, une étude a trouvé que l'administration rectale permet une biodisponibilité du Δ^9 -THC deux fois plus importante qu'après une administration orale, grâce à une meilleure absorption et un métabolisme hépatique moins important (Brenneisen et al., 1996). Dans cette étude, l'administration d'un suppositoire chez deux hommes atteints de spasticités (des contractions musculaires involontaires), a entraîné une Cmax plasmatique du Δ^9 -THC égale à 1×10^{-8} M pour un patient traité avec 5 mg de Δ^9 -THC et une Cmax plasmatique du Δ^9 -THC égale à $5,7 \times 10^{-9}$ M pour un autre patient traité avec 2,5 mg de Δ^9 -THC.

En conclusion, de multiples paramètres tels que le mode d'administration, la dose et la fréquence de consommation des individus, sont impliqués dans la modulation de la pharmacocinétique du Δ^9 -THC et du CBD, en particulier les valeurs de Cmax plasmatiques que ces molécules atteignent.

Après administration, les phytocannabinoïdes atteignent la circulation sanguine et sont distribués rapidement vers les organes hautement vascularisés comme le poumon, le cœur, le cerveau et le foie. Cette distribution dépend de la corpulence des sujets et de leur état de santé, pouvant affecter la perméabilité des différentes barrières hémato-tissulaires.

Plusieurs tissus, majoritairement le foie, métabolisent les phytocannabinoïdes et participent à leur élimination.

(2) Métabolisme et élimination du CBD et du Δ 9-THC

Le métabolisme des phytocannabinoïdes est principalement hépatique (pour revue : Dinis-Oliveira, 2016).

Plus de 100 métabolites du Δ 9-THC ont été identifiés, dont le 8 α -hydroxy- Δ 9-THC (8 α -OH- Δ 9-THC) et le 8 β -hydroxy- Δ 9-THC (8 β -OH- Δ 9-THC) par exemple (Huestis, 2007).

Le principal métabolite du Δ 9-THC est le 11-hydroxy- Δ 9-THC (11-OH- Δ 9-THC) qui résulte de l'hydroxylation du Δ 9-THC. Cette réaction est assurée par des enzymes CYP450 spécifiques, les isoenzymes (des enzymes catalysant la même réaction chimique mais ayant des structures différentes) *CYP450, family 2, subfamily C, member 9* (CYP2C9), *CYP450, family 2, subfamily C, member 19* (CYP2C19) et *CYP450, family 3, subfamily A, member 4* (CYP3A4) (Matsunaga et al., 1995; Iribarne et al., 1996). Une étude a détecté le pic de 11-OH- Δ 9-THC 13 minutes après le début d'une administration de cannabis fumé (Huestis et al., 1992). Comme le Δ 9-THC, le 11-OH- Δ 9-THC possède un effet psychoactif et serait même pharmacologiquement plus actif que le Δ 9-THC (Christensen et al., 1971; Lemberger et al., 1972, 1973). L'oxydation du 11-OH- Δ 9-THC entraîne la formation du 11-carboxy- Δ 9-THC (11-COOH- Δ 9-THC), un métabolite inactif (Lemberger et al., 1970; Mechoulam et al., 1973). Il est détecté 30 à 45 minutes après le début de la consommation de cannabis fumé.

Les métabolites du Δ 9-THC subiront ensuite une glucuronidation par l'enzyme *Uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase* (UGT), donnant des cannabinoïdes glucuronidés, excrétés dans les urines (environ 20%) et les selles (plus de 75%) (Wall et al., 1983). Le 11-COOH- Δ 9-THC et son conjugué glucuronidé sont les produits majeurs de la métabolisation du Δ 9-THC dans la plupart des espèces étudiées, dont l'homme (Halldin et al., 1982).

Il a été montré que selon le mode d'administration, la formation des métabolites du Δ 9-THC et la pharmacocinétique de ces derniers n'est pas exactement la même (Huestis, 2007). De plus, le métabolisme du Δ 9-THC a déjà été observé dans des tissus extra-hépatiques possédant des enzymes CYP450 comme le petit intestin, le poumon, le cerveau ainsi que le placenta (Greene and Saunders, 1974; Widman et al., 1974; Watanabe et al., 1988; Krishna and Klotz, 1994; Mazur et al., 2009; Kumar et al., 2022). La détection de ces métabolites dans le sang ou les urines pourrait être un marqueur d'une utilisation récente ou fréquente (Schwope et al., 2011; Newmeyer et al., 2016; Huestis et al., 2020).

Plus de 30 métabolites du CBD ont été identifiés (Aguirell et al., 1986; Harvey and Mechoulam, 1990). Le métabolisme du CBD est également principalement assuré par les isoenzymes CYP2C19 et CYP3A4 et de façon additionnelle par CYP2C9 ainsi que par *CYP450, family 1, subfamily 1, member 1* (CYP1A1), *CYP450, family 1, subfamily A, member 2* (CYP1A2), et *CYP450, family 2, subfamily D, member 6* (CYP2D6). Le principal métabolite du CBD est le 7-hydroxy-cannabidiol (7-OH-CBD), qui résulte de son hydroxylation, ensuite oxydé, donnant le 7-carboxy-cannabidiol (7-COOH-CBD). Il subit ensuite d'autres étapes de métabolisation, et ses métabolites sont excrétés dans les selles et les urines.

Le temps d'élimination des phytocannabinoïdes est variable, la demi-vie du $\Delta 9$ -THC étant de 6 minutes à 22 heures et celle du CBD de 24 à 31 heures (Ohlsson et al., 1986). Le $\Delta 9$ -THC disparaît de la circulation sanguine entre 12 à 36 heures (Hunt and Jones, 1980; Wall et al., 1983) et en cinq jours, 80 à 90% est excrété (Halldin et al., 1982).

L'usage chronique et fréquent de cannabis peut entraîner la modification des propriétés pharmacocinétiques du $\Delta 9$ -THC et du CBD. Il a été montré que des consommateurs réguliers de cannabis peuvent présenter une augmentation de la C_{max} plasmatique et de la demi-vie du $\Delta 9$ -THC et de ses métabolites (Johansson et al., 1988; Skopp and Potsch, 2008; Toennes et al., 2008). Dans une autre étude, l'administration de 30 mg de $\Delta 9$ -THC par voie orale toutes les quatre heures pendant 10 à 12 jours chez cinq individus a entraîné une augmentation de la vitesse de formation des métabolites mais une diminution de leur élimination (Hunt and Jones, 1980). Une augmentation de la demi-vie du CBD a également été décrite chez des hommes après une exposition prolongée (Consroe et al., 1991). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer les changements pharmacocinétiques du $\Delta 9$ -THC et du CBD observés chez les hommes exposés de façon chronique à du cannabis. Il a été proposé que les métabolites du $\Delta 9$ -THC puissent se fixer à des protéines plasmatiques, ralentissant leur élimination par les reins (Hunt and Jones, 1980). Il a de plus été montré que le THC peut s'accumuler dans les tissus adipeux et être redistribué progressivement dans la circulation générale (Johansson et al., 1989). Enfin, il a été décrit que le $\Delta 9$ -THC et le CBD peuvent altérer l'expression et l'activité des enzymes hépatiques CYP450 chez l'humain, ce qui peut perturber leur propre métabolisation (Nasrin et al., 2021)

b) Pharmacodynamique du CBD et du $\Delta 9$ -THC

Les récepteurs aux cannabinoïdes étant exprimés dans de nombreux tissus, la consommation de cannabis entraîne de nombreux effets dans tout le corps. Il a ainsi été montré dans des études cliniques, dans des études *in vitro* et *in vivo* que la consommation de $\Delta 9$ -THC peut avoir des effets sur (Grotenhermen, 2003) :

- la psyché et la perception de son environnement, pouvant entraîner une euphorie, une fatigue, une perception sensorielle augmentée, des hallucinations, des symptômes de psychose (une pathologie où le sujet perd contact avec la réalité) et une altération de la perception temporelle. Il a également été noté une diminution de l'anxiété à faible dose et une augmentation de l'anxiété à haute dose
- les performances cognitives et psychomotrices, pouvant entraîner une augmentation de la créativité, une altération de la mémoire et de la capacité de langage, et la détérioration des capacités de coordination motrice,
- le système nerveux, pouvant entraîner de l'analgésie, la stimulation de l'appétit et des effets antiémétiques (anti-vomitifs),
- la température corporelle, pouvant entraîner sa diminution,
- le système cardiovasculaire, pouvant entraîner une tachycardie, une augmentation de l'activité cardiaque, une vasodilatation, une hypertension,
- les yeux, pouvant entraîner une conjonctivite,
- le système respiratoire, pouvant entraîner une bronchodilatation,
- le tractus gastro-intestinal, pouvant entraîner une hyposalivation et un ralentissement de la digestion,
- le système hormonal, pouvant influencer la libération de plusieurs hormones,
- le système immunitaire, pouvant altérer la stimulation immunitaire et l'inflammation,
- et la fonction de reproduction (dont les effets seront détaillés dans le chapitre III).

Ces effets sont hautement variables selon les sujets, leur état de santé général et au moment de la consommation de cannabis, mais aussi selon la fréquence de leur consommation, les doses utilisées et la méthode de consommation.

N'induisant pas plusieurs effets caractéristiques du $\Delta 9$ -THC comme l'euphorie par exemple, le CBD est couramment décrit comme non psychoactif. Néanmoins, le CBD peut entraîner des effets sur certains processus cognitifs et psychologiques, faisant de lui un composé psychoactif au sens strict. De façon extrêmement variable, il peut induire la somnolence (Zuardi et al., 1993), entraîner des changements d'humeur (Leweke et al., 2000; Solowij et al., 2019) et réduire l'anxiété (Zuardi et al., 1993; Crippa et al., 2011; Hundal et al., 2018). Le CBD possède également des propriétés neuroprotectrices (Hampson et al., 1998; Beale et al., 2018; Solowij et al., 2018), analgésiques (Karst et al., 2003), anti-spasmodiques (Baker et al., 2000), anti-épileptiques (Cunha et al., 1980; Lattanzi et al., 2018), anti-inflammatoires (Malfait et al., 2000) ainsi que des propriétés sédatives, anti-émétiques, anxiolytiques (Fusar-Poli et al., 2009) et anti-psychotiques, (Zuardi et al., 2006; Izzo et al., 2009; Hallak et al., 2010; McGuire et al., 2018).

La co-administration du CBD avec du $\Delta 9$ -THC peut modifier certains effets associés à ce dernier (Russo and Guy, 2006; McPartland and Russo, 2014; Boggs et al., 2018; A. M. Freeman et al., 2019). Il a ainsi été observé chez l'homme que le CBD peut :

- réduire l'inflammation des voies respiratoires associée à l'inhalation de $\Delta 9$ -THC pure (Tashkin et al., 1977),
- réduire la tachycardie associée à l'administration de $\Delta 9$ -THC (Karniol et al., 1974; Lemberger et al., 1976),
- fluidifier les membranes cellulaires (Howlett et al., 1989), augmentant la pénétration du $\Delta 9$ -THC dans les cellules musculaires et l'effet musculo-relaxant de ce dernier (Wagner, 2004),
- réduire les altérations du tissu cérébral entraînées par une consommation chronique fréquente du $\Delta 9$ -THC (Yücel et al., 2016),
- réduire certains effets psychologiques et cognitifs du $\Delta 9$ -THC comme l'anxiété (Karniol et al., 1974; Zuardi et al., 1982a; Iseger and Bossong, 2015), l'euphorie (Hollister and Gillespie, 1975; Dalton et al., 1976), la perte de mémoire (Nicholson et al., 2004; Demirakca et al., 2010; C. J. A. Morgan et al., 2012; Englund et al., 2013; Morgan et al., 2018), les symptômes de psychose (Wade et al., 2003; Nicholson et al., 2004; Morgan and Curran, 2008; Bhattacharyya et al., 2010; Schubart et al., 2011; C.

J. A. Morgan et al., 2012; Englund et al., 2013) ainsi que les défauts d'attention et l'appétit (C. J. Morgan et al., 2010; C. J. A. Morgan et al., 2010).

Au contraire, d'autres études chez l'homme n'ont pas mis en évidence d'effets significatifs d'une administration de CBD sur les effets cardiovasculaires (Hollister and Gillespie, 1975; Dalton et al., 1976; Bird et al., 1980; Guy and Robson, 2004; Haney et al., 2016; Freeman et al., 2018; Zuardi et al., 1982b), psychomimétiques (Morgan et al., 2018), anxieux (E L Karschner et al., 2011) et de l'altération de la mémoire (Morgan et al., 2018) induits par le $\Delta 9$ -THC.

Chez le modèle rongeur, le CBD peut à la fois potentialiser et réduire les effets hypothermiques, hypolocomoteurs, anti-nociceptifs, les effets anxieux, et les altérations cognitives induits par le $\Delta 9$ -THC (Boggs et al., 2018).

Chez la souris, comme chez l'homme, les effets induits par la co-administration de CBD et de $\Delta 9$ -THC dépendent étroitement de la dose de $\Delta 9$ -THC et de CBD utilisée (le ratio CBD/ $\Delta 9$ -THC) (Hayakawa et al., 2008; Solowij et al., 2019) mais aussi de la méthode d'administration des deux phytocannabinoïdes, la temporalité des administrations (par exemple si le CBD est pré-administré avant la consommation de $\Delta 9$ -THC), ainsi que du paramètre physiologique étudié.

L'action potentialisatrice ou inhibitrice du CBD sur certains effets du $\Delta 9$ -THC est en partie expliquée par l'action du CBD sur les récepteurs des cannabinoïdes (comme il a été décrit plus haut dans le paragraphe consacré au système des ECB) : il peut en effet moduler l'accessibilité du $\Delta 9$ -THC aux récepteurs et impacter les voies de signalisations déclenchées. De plus, il a été trouvé *in vitro* que le CBD était capable d'inhiber l'action de plusieurs enzymes CYP450 hépatiques dont celles métabolisant le $\Delta 9$ -THC (Paton and Pertwee, 1972), en particulier celles impliquées dans la formation du 11-OH- $\Delta 9$ -THC (Bornheim et al., 1995; Bornheim and Grillo, 1998; Nadulski et al., 2005; Bansal et al., 2020; Nasrin et al., 2021). Chez le modèle rongeur, il a effectivement été observé des modifications de la pharmacocinétique du $\Delta 9$ -THC quand il est co-administré avec du CBD : le CBD peut entraîner une diminution du métabolisme du $\Delta 9$ -THC, faisant augmenter ses niveaux dans le cerveau et le plasma (Bornheim et al., 1995; Klein et al., 2011; Hložek et al., 2017; Nidadavolu et al., 2021) et donc potentiellement accentuant et prolongeant ses effets.

Chez l'homme, certaines études n'ont pas observé d'influence significative du CBD sur la pharmacocinétique du $\Delta 9$ -THC. Une étude a ainsi observé que l'administration orale de CBD avec une administration intraveineuse de $\Delta 9$ -THC n'altère pas le métabolisme hépatique du $\Delta 9$ -THC, ni sa demi-vie (Hunt et al., 1981). D'autres études n'ont pas observé de modifications de la Cmax plasmatique atteinte par le $\Delta 9$ -THC quand il est co-administré avec du CBD (Aguirell et al., 1981; Erin L Karschner et al., 2011a, 2011c).

Au contraire, trois études ont montré que la co-administration de CBD et $\Delta 9$ -THC chez l'homme entraîne une augmentation significative de la Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC (Nadulski et al., 2005; van de Donk et al., 2019b; Arkell et al., 2019). Ainsi l'administration d'une capsule contenant 2,5 mg de $\Delta 9$ -THC à 24 individus entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $1 \times 10^{-8}M$, alors qu'elle est égale à $1,3 \times 10^{-8}M$ quand les 2,5 mg de $\Delta 9$ -THC sont administrés avec 1,5 mg de CBD (Nadulski et al., 2005). Une autre étude a comparé la pharmacocinétique du $\Delta 9$ -THC après l'exposition de 20 femmes atteintes de fibromyalgie causant des douleurs chroniques à 4 variétés de cannabis contenant des quantités différentes de $\Delta 9$ -THC et de CBD (van de Donk et al., 2019a). Dans cette étude, l'administration par vaporisation de 22,4 mg de $\Delta 9$ -THC et de moins d'1 mg de CBD entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $2,6 \times 10^{-7}M$. L'administration de 13,4 mg de $\Delta 9$ -THC et de 17,8 mg de CBD entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $2,4 \times 10^{-7}M$ et l'administration de moins d'1 mg de $\Delta 9$ -THC et de 18,4 mg de CBD entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale $4,1 \times 10^{-8}M$, des valeurs au moins au moins 50% supérieures de celles auxquelles les auteurs s'attendaient. Enfin, l'administration à 14 individus (11 hommes, 3 femmes) consommateurs de cannabis définis comme « occasionnels » (consommant moins de 2 fois par semaine les 3 derniers mois et plus de 10 fois au cours de la vie) de 125 mg de $\Delta 9$ -THC ou de 125 mg de $\Delta 9$ -THC et de 125 mg de CBD par vaporisation, entraîne une Cmax plasmatique du $\Delta 9$ -THC égale à $1 \times 10^{-7}M$ et $1,33 \times 10^{-7}M$ respectivement (Arkell et al., 2019). Ces résultats suggèrent que le CBD peut modifier des caractéristiques pharmacocinétiques du $\Delta 9$ -THC mais ce, de façon extrêmement variable.

L'ensemble de ces données illustrent l'implication d'une multitude de facteurs dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du CBD et du $\Delta 9$ -THC, qui peuvent entraîner des variations inter-individuelles drastiques pour des mêmes doses consommées.

Il existe deux types de consommation du cannabis chez l'homme : récréationnelle et thérapeutique.

2. Consommation récréationnelle du cannabis

a) Chez l'homme adulte

(1) L'incidence de la consommation de cannabis dans le monde

Le cannabis est la substance illicite la plus cultivée, commercialisée et consommée dans le monde. Selon un rapport des Nations Unies, approximativement 4% de la population générale âgée de 15 à 64 ans, soit approximativement 284 millions de personnes, ont consommé du cannabis en 2020 (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022).

En France, l'Observatoire Français des drogues et des tendances addictives (OFDT) a estimé qu'il y avait en 2020 18 millions d'expérimentateurs parmi les 18-75 ans (qui représentent 51 millions de personnes au total), dont 5 millions d'usagers dans l'année et 1,3 millions d'usagers réguliers (OFDT Drogues et addictions, Chiffres clés 2022). Par ailleurs, toujours selon l'OFDT, de la consommation annuelle à la consommation quotidienne, les usages de cannabis sont majoritairement le fait des jeunes générations. Ainsi, l'usage dans l'année concerne 25,8% des 18-25 ans et 18,4% de 26-34 ans contre 1,9% des 55-64 ans (Le Nézet et al., 2021).

Si le pourcentage d'adolescents consommant du cannabis est en baisse ces 10 dernières années, la France présente un des pourcentages les plus hauts d'Europe. En 2019, 23% des adolescents français de 16 ans ont expérimenté le cannabis, contre 6% en Islande par exemple (Spilka et al., 2021).

Depuis 2010, la prévalence de la consommation du cannabis est globalement en augmentation (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022). La pandémie de *Coronavirus Disease 19* (COVID19), causée par le virus *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-COV-2), a par ailleurs entraîné des modifications dans les modalités de consommation de cannabis dans le monde. Il a ainsi été globalement observé une

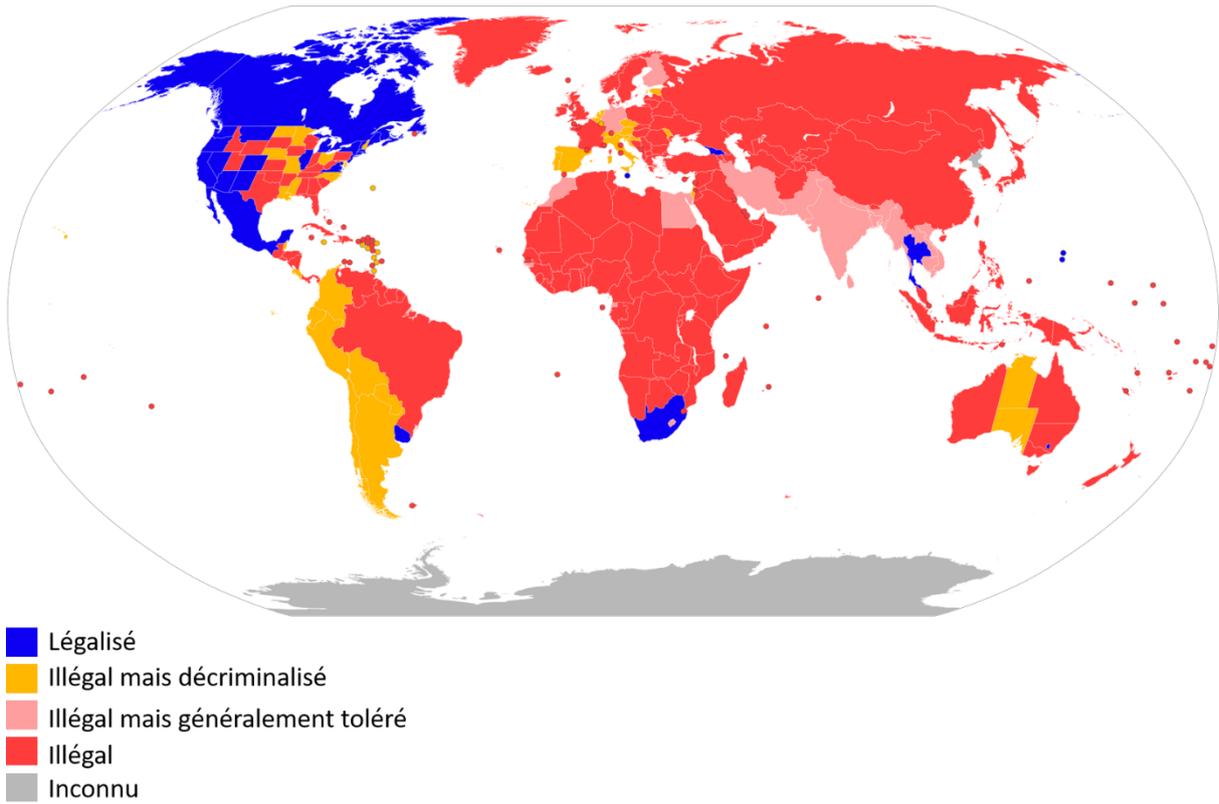


Figure 29 : Statut légal de la consommation récréationnelle de cannabis dans le monde (issu de Wikipedia.org : Legality of cannabis in 2018).

augmentation de la consommation chez les utilisateurs réguliers de cannabis et au contraire une réduction, voire un arrêt de la consommation chez les utilisateurs occasionnels (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022).

La plupart des usagers du cannabis sont des hommes (environ 2/3 des consommateurs). Cependant il a été observé une augmentation de la prévalence de la consommation de cannabis chez les femmes ces dernières années, limitant l'écart dû au genre (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022).

La consommation récréationnelle du cannabis est légalisée dans plusieurs pays dans le monde (**Figure 29**) : au Canada, en Géorgie, à Malte, au Mexique, en Afrique du Sud, en Thaïlande, en Uruguay ainsi que dans 19 états des Etats-Unis d'Amérique et un territoire en Australie. Dans 3 de ces pays, le commerce est régulé par l'Etat : au Canada, en Thaïlande et en Uruguay. En Allemagne, la légalisation de la consommation récréationnelle de cannabis est au programme du nouveau gouvernement, avec pour objectif d'adopter un projet de loi avant fin 2022. En Espagne, au Portugal, en République Tchèque, en Afrique du Sud, au Mexique et prochainement au Luxembourg, s'appliquent des politiques de dépénalisation. Dans la pratique, la consommation récréationnelle de cannabis est tolérée dans plusieurs pays, comme aux Pays-Bas, dans les « coffee shops » possédant une autorisation.

Entre 2016 et 2020, la France était le pays européen le plus consommateur parmi les 15-34 ans (Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies, 2021). Dans le même temps, la législation française concernant le cannabis est l'une des plus restrictives d'Europe. Le cannabis est un produit classé stupéfiant et son usage est interdit, conformément à la loi du 31 décembre 1970. Ainsi, en acheter, en consommer, en détenir, en transporter et en cultiver constituent des infractions. Dans cette définition, le « cannabis » se réfère aux sous-espèces de *Cannabis sativa L.* contenant du Δ 9-THC. En revanche, la culture, l'importation, l'exportation et l'utilisation industrielle et commerciale de variétés de *Cannabis sativa L.* contenant une teneur en Δ 9-THC inférieure à 0,3% sont légales en France (<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000044793213>). Ainsi, récemment en France mais également dans d'autres pays, un engouement s'est fait connaître pour les boutiques commercialisant des produits à base de CBD sous plusieurs formes. Depuis les premières boutiques ouvertes en France en 2018, la France comptait près de 1700 points de vente dédiés au CBD en 2021 d'après l'Union des Professionnels du CBD.

(2) Les effets d'une consommation de cannabis chez l'adulte

Traditionnellement, les utilisateurs de cannabis récréationnel consomment des souches à dominance $\Delta 9$ -THC, ce dernier via la fixation au récepteur CB1 délivrant l'effet psychoactif de relaxation et d'euphorie généralement recherché par les consommateurs (« high » en anglais).

La consommation de cannabis n'est pas exempte d'effets néfastes sur la santé mentale et physique. On peut citer plusieurs effets, qui sont largement dépendants des individus, de la fréquence et de la méthode de consommation ainsi que des doses employées (Sachs et al., 2015; Russell et al., 2018) :

- altération de la perception, de l'attention et de la mémoire immédiate,
- intoxication aiguë (connue sous le nom de « bad trip »), caractérisée par des hallucinations, des vomissements et de la panique,
- troubles relationnels, scolaires ou professionnels,
- révélation ou aggravation des troubles mentaux (chez les personnes pré-disposées),
- risque de dépendance,
- perturbations broncho-pulmonaires liées à la présence de tabac dans les joints.

De plus, il a récemment été mis en évidence que la consommation de cannabis était lié à des troubles de la santé reproductive (dont les effets seront détaillés dans le chapitre III).

b) Le cas de la consommation chez la femme enceinte

(1) Incidence de la consommation de cannabis chez la femme enceinte

Bien qu'il n'existe aucune donnée précise sur l'incidence de la consommation du cannabis chez la femme enceinte, le cannabis représente la substance illicite la plus souvent consommée chez les femmes en âge de procréer.

Des études réalisées aux Etats-Unis d'Amérique (United States of America, USA) ces 20 dernières années a rapporté une incidence de la consommation de cannabis entre 2,1% et

22%, la moyenne se situant entre 4 et 7% (Ko et al., 2015; Brown et al., 2017; Young-Wolff et al., 2017; Oga et al., 2018; Alshaarawy and Anthony, 2019; Young-Wolff et al., 2019).

En France, les études rapportent une prévalence entre 1 et 3% (Dumas et al., 2014). Une étude récente menée grâce à des questionnaires dans six maternités du département d'Ille et Vilaine par une étudiante sage-femme sous la direction d'Aurore Gely-Pernot en 2021 a montré une prévalence de 2,65% de femmes enceintes consommatrices sur le territoire breton (données non publiées).

Ces chiffres pourraient cependant être sous-estimés. Plusieurs études ont ainsi rapporté une différence entre l'incidence de la consommation de cannabis quand elle est rapportée par les femmes (par questionnaires ou par entretien) par rapport à divers tests toxicologiques. Une étude espagnole a observé par dosage du méconium (les premières selles du nouveau-né) que l'exposition au cannabis était détectée dans 5,3% des nouveau-nés, contre 1,7% des femmes qui avaient rapporté l'utilisation de cannabis (Lozano et al., 2007). Dans deux études américaines, les femmes testées positives à la consommation de cannabis représentaient environ le double des femmes ayant rapporté une consommation pendant la grossesse (Klawans et al., 2019; Young-Wolff et al., 2020b). Enfin, dans une autre étude américaine, 6% des participantes ont rapporté une consommation pendant la grossesse dans les questionnaires mais seulement 2,6% au cours d'entretien avec le personnel médical. Finalement, chez 22,4% des femmes, le dosage d'un métabolite du Δ^9 -THC dans le sang de cordon s'est avéré positif (Metz et al., 2019). Les mêmes écarts entre les données récoltées après des questionnaires et après des tests toxicologiques sont retrouvés dans les études concernant la consommation de tabac (Swamy et al., 2011) et d'alcool (Lange et al., 2014) pendant la grossesse. Les femmes seraient réticentes à divulguer une consommation de cannabis par peur de conséquences punitives et de la stigmatisation (Skelton et al., 2022)

L'incidence de la consommation de cannabis la plus élevée est située chez les femmes jeunes, ayant une expérience antérieure de consommation de cannabis et les femmes consommatrices de tabac, d'alcool, et d'autres drogues illicites. Les modes d'administration du cannabis principaux sont les joints, suivi d'une consommation orale, puis des lotions (Young-Wolff et al., 2020a).

Chez les femmes ayant rapporté une consommation de cannabis, si certaines le consomment de façon récréationnelle, d'autres le consomment dans un but médical afin de soulager certains symptômes associés à la grossesse, comme les nausées et l'insomnie, ainsi que des symptômes associés à des pathologies chroniques (Chang et al., 2019; Vanstone et al., 2021; Satti et al., 2022). Une étude canadienne a rapporté que chez les femmes enceintes consommant du cannabis afin de soulager les nausées et les vomissements, 92% ont trouvé cette consommation efficace (Westfall et al., 2006). Pour certain.e.s, le cannabis est perçu comme une alternative « naturelle » et « sans danger », comparé à d'autres substances (comme l'alcool ou le tabac) et aux médicaments prescrits par le corps médical (Jarlenski et al., 2017; Chang et al., 2019; Vanstone et al., 2022).

L'augmentation de la consommation de cannabis dans le monde ces dernières décennies s'est accompagnée d'une augmentation de la consommation par les femmes en âge de procréer, y compris avant, pendant et après la grossesse (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022), une observation qui pourrait être due en partie à la légalisation de cette consommation dans plusieurs pays. De plus, une augmentation de la consommation de cannabis chez la femme enceinte a été corrélée avec la période de la pandémie de COVID-19, les raisons étant un arrêt de l'activité professionnelle et le stress lié à la pandémie (Young-Wolff et al., 2021; Minkoff and Ecker, 2022).

(2) Le passage materno-embryonnaire des phytocannabinoïdes

La majorité des groupes de recherche ayant étudié le passage materno-embryonnaire des phytocannabinoïdes se sont concentrés sur le Δ 9-THC.

De nombreuses études ont mis en évidence dans plusieurs espèces modèles que le Δ 9-THC (Idänpään-Heikkilä et al., 1969; Harbison and Mantilla-Plata, 1972; Kennedy and Waddell, 1972; Freudenthal et al., 1972; Vardaris et al., 1976; Martin et al., 1977a; Abrams et al., 1985; Bailey, 1987) et le CBD (Ochiai et al., 2021) peuvent traverser le placenta et atteindre le fœtus. Il a été montré chez le singe que le Δ 9-THC était retrouvé dans le plasma, la rate, le poumon, le cerveau, le rein, le foie, les glandes surrénales, le thymus et le testicule du fœtus, 3 heures après une administration maternelle de 0,3 mg/kg de Δ 9-THC par intraveineuse (Bailey, 1987).

Chez la souris (Freudenthal et al., 1972) et le rat (Baglot et al., 2022), les métabolites du $\Delta 9$ -THC atteignent le compartiment fœtal. Chez la souris, il a été suggéré que des tissus fœtaux soit capables de métaboliser le $\Delta 9$ -THC (Freudenthal et al., 1972). Chez le chien, il a cependant été montré que si deux métabolites du $\Delta 9$ -THC, le 11-OH- $\Delta 9$ -THC et le 11-COOH- $\Delta 9$ -THC sont également capables traverser la barrière placentaire, leur passage est considérablement moins efficace que le $\Delta 9$ -THC (Martin et al., 1977b). Chez le singe, une étude a montré qu'après l'administration maternelle par injection intraveineuse de $\Delta 9$ -THC, le métabolite 11-COOH- $\Delta 9$ -THC n'est détecté dans aucun tissu fœtaux ni dans le plasma fœtal (Bailey, 1987). Les auteurs ont suggéré d'une part une absence du passage placentaire du $\Delta 9$ -THC vers le fœtus mais également une absence de métabolisation du $\Delta 9$ -THC par le placenta ou les tissus fœtaux. Le passage des métabolites du $\Delta 9$ -THC ainsi que la métabolisation du $\Delta 9$ -THC par le placenta et/ou les tissus fœtaux semble donc être extrêmement espèce-dépendant.

Chez les modèles animaux, les concentrations de $\Delta 9$ -THC retrouvées dans le sang et les tissus fœtaux sont majoritairement plus faibles que celles chez la mère. Ainsi, chez la chienne, 33% des concentrations de $\Delta 9$ -THC détectées dans le cerveau maternel sont retrouvées dans les cerveaux fœtaux 30 minutes après l'administration intraveineuse de la mère avec 0,5 mg/kg de $\Delta 9$ -THC (Martin et al., 1977b). Chez des rattes chroniquement exposées à 15 mg/kg ou 50 mg/kg de $\Delta 9$ -THC par voie orale tout au long de la gestation, les concentrations de $\Delta 9$ -THC détectées dans le sang fœtal atteignent de 9 à 13% de celles retrouvées dans le sang maternel, et suivent un profil dose-dépendante (Hutchings et al., 1989). Une autre étude a montré que chez des brebis ayant inhalé un joint contenant 3,2% de $\Delta 9$ -THC, la Cmax plasmatique de $\Delta 9$ -THC était atteinte en 90 minutes chez les fœtus contre 10 minutes chez les mères, et elle restait moins forte que chez la mère à tous les temps étudiés (Abrams et al., 1985). Chez le singe, après une administration intraveineuse de 0,3 mg/kg de $\Delta 9$ -THC, la Cmax plasmatique fœtale est atteinte en 15 minutes contre 3 minutes chez la mère, et elle représente 28% de la Cmax plasmatique maternelle à tous les temps de prélèvements (Bailey, 1987). Dans cette même étude, il a été observé une demi-vie plus longue du $\Delta 9$ -THC dans le compartiment fœtal, supposant une élimination plus lente du $\Delta 9$ -THC par rapport au compartiment maternel. Une étude récente sur des rattes a observé que l'exposition répétée de vapeur de $\Delta 9$ -THC entraînait une accumulation de 30%

de la concentration sérique maternelle de $\Delta 9$ -THC dans le cerveau fœtal (Baglot et al., 2022). Une étude a récemment décrit le passage materno-fœtal du CBD chez la souris. Dans cette étude, 15 minutes après une injection intraveineuse de 10 mg/kg de CBD, environ 70% du CBD est retrouvé dans les tissus fœtaux (Ochiai et al., 2021).

Une étude a mis en évidence qu'après l'administration du $\Delta 9$ -THC à la mère par injection sous-cutanée, les concentrations de $\Delta 9$ -THC atteintes dans le cerveau fœtal sont équivalentes à celles observées dans le sang maternel, soulignant l'importance de la méthode d'administration dans les études (Baglot et al., 2022). De même, une étude a trouvé chez la souris que deux heures après une injection intraveineuse de $\Delta 9$ -THC, les concentrations de $\Delta 9$ -THC et de ses métabolites dans les tissus fœtaux étaient les mêmes que celles dans le foie maternel (Freudenthal et al., 1972). Dans la même étude, deux heures après une administration orale, les concentrations de $\Delta 9$ -THC et de ses métabolites étaient même légèrement plus hautes dans les tissus fœtaux par rapport au foie maternel.

Chez la femme également, certains phytocannabinoïdes sont capables de passer la barrière placentaire, d'atteindre le sang de cordon, les tissus fœtaux et de s'accumuler dans le méconium (les premières selles du nouveau-né) et les cheveux du nouveau-né (Monfort et al., 2022). Il apparaît chez la femme que le transfert du $\Delta 9$ -THC au fœtus soit plus important au début de la grossesse (Blackard and Tennes, 1984). De façon intéressante, il a été observé que chez des jumeaux dizygotes, le passage materno-fœtal du $\Delta 9$ -THC peut se faire chez un fœtus et pas chez l'autre, à exposition maternelle constante, ce qui met en évidence l'importance du placenta (et peut être des tissus fœtaux) dans le contrôle de l'exposition au $\Delta 9$ -THC (Boskovic et al., 2001).

Chez l'humain, la présence des métabolites du $\Delta 9$ -THC dans les tissus fœtaux n'est pas observée systématiquement. Un groupe ayant étudié des femmes consommant régulièrement du cannabis au cours de leur grossesse a relevé la présence du 11-COOH- $\Delta 9$ -THC dans l'ensemble des sangs de cordon étudiés, avec des concentrations dépassant celles du $\Delta 9$ -THC (Blackard and Tennes, 1984). Au contraire, dans une autre étude où le $\Delta 9$ -THC et le 11-COOH- $\Delta 9$ -THC ont été détectés dans les cheveux des femmes consommatrices de cannabis pendant la grossesse, le 11-COOH- $\Delta 9$ -THC n'a été détecté que dans un fœtus sur les 10 dont la présence de $\Delta 9$ -THC a été observée et n'a été détecté dans aucun placenta (Falcon et al., 2012).

Comme chez les animaux, il semble chez la femme que les concentrations de $\Delta 9$ -THC atteignant le fœtus soient plus faibles que celles retrouvées dans les tissus maternels. Ainsi, une étude a trouvé que la quantité de $\Delta 9$ -THC présente dans le sang de cordon ombilical était 3 à 6 fois moins importante que celle dans le sang maternel (Blackard and Tennes, 1984). Un groupe a montré chez des femmes consommatrices de cannabis pendant la grossesse ayant subi une IVG au cours de la 12^{ème} SD que la quantité de $\Delta 9$ -THC présente dans le placenta ($196 \pm 110,1$ ng/g) était plus importante que dans les tissus fœtaux ($118,5 \pm 97,9$ ng/g) mais plus faible que dans les cheveux maternels ($2,7 \pm 3,4$ ng/mg) (Falcon et al., 2012). Si les données actuelles ne permettent pas encore d'établir une relation quantitative précise du transfert materno-fœtal des phytocannabinoïdes, elles suggèrent néanmoins un transport actif du placenta, permettant de limiter relativement l'exposition du fœtus. Les résultats des études décrites plus haut mettent particulièrement en lumière la haute variabilité de la pharmacocinétique des phytocannabinoïdes dans le transfert materno-fœtal, suivant les molécules considérées, la fenêtre d'exposition, les doses administrées, la méthode d'administration, les matrices utilisées pour le dosage et les espèces étudiées.

Chez la femme, certains composés du cannabis peuvent affecter l'activité et le remodelage du placenta (Fisher et al., 1987; Alves et al., 2020). Une étude a montré que le CBD pouvait augmenter la perméabilité du placenta, et donc l'exposition fœtale, à différentes substances (Feinshtein et al., 2013). D'autres études ont observé qu'une exposition au cannabis prénatal était associée avec une diminution du flux sanguin irriguant le placenta (El Marroun et al., 2010; Carter et al., 2016).

Enfin, il a également été montré qu'à partir du plasma maternel, le $\Delta 9$ -THC s'accumule dans le lait maternel grâce à son caractère lipophile et peut atteindre le nouveau-né (Perez-Reyes and Wall, 1982; Atkinson et al., 1988; Baker et al., 2018).

Espèce	Traitement	Exposition	Effets	Référence
Souris	16 mg/kg/jour de résine de cannabis par ip	E6	Retard de croissance fœtal	(Persaud and Ellington, 1967)
Souris	6,25 mg/kg/jour de Δ9-THC par sc	E1 à E6	Résorption fœtale totale	(Jones, 1976)
		E7 à E11	Malformations fœtales	
		E10		
		E9		
Souris	40 mg/kg/jour de Δ9-THC par ip	E6 à E15	Résorptions fœtales	(Mantilla-Plata et al., 1975)
		E8 à E10		
		25 mg/kg/jour de Δ9-THC par ip	E10 à E14	
		75 mg/kg/jour de Δ9-THC par ip	E8, E10, E12, E14 ou E16	
Souris	0,2g de cannabis par inhalation de fumée 5 minutes/jour	E5,5 à E17,5	Diminution du poids de naissance fœtal	(Benevenuto et al., 2017)
Souris	5 mg/kg/jour de Δ9-THC par ip	E5,5 à E18,5	Diminution du poids maternel, diminution du poids embryonnaire et placentaire à E19,5, diminution de la taille de la portée	(Chang et al., 2017)
Rat	4,2 mg/kg/jour d'extrait de cannabis par ip	E1 à E6	Résorptions fœtales, malformations fœtales	(Persaud and Ellington, 1968)
Rat	50 mg/kg/jour d'extrait de cannabis par po	E1 à la parturition	Résorptions fœtales, diminution du poids de naissance fœtal, malformations fœtales, mortalité post-natale	(Singh et al., 1981)
Rat	10 mg/kg/jour ou 150 mg/kg/jour d'extrait de cannabis par po	E3 à la parturition	Diminution du poids de naissance fœtal, mortalité post-natale, diminution du poids post-natal	(Abel et al., 1980)
Rat	15 mg/kg/jour de Δ9-THC par po	E8 à la parturition	Mortalité fœtale	(Hutchings et al., 1987)
Rat	250 mg/kg/jour CBD par po	E6 à E17	Mortalité fœtale	(US FDA Report, 2018; Huestis et al., 2019a)
Singe	2,5 mg/kg/jour de Δ9-THC par iv	1 ^{er} tiers de la gestation	Mortalité fœtale	(Asch and Smith, 1986)

Table 2 : Effets néfastes d'une exposition gestationnelle au cannabis ou à des phytocannabinoïdes sur les fœtus chez des animaux modèles.

Ce tableau résume les résultats obtenus d'études ayant observé des effets néfastes sur les fœtus suite à une exposition maternelle *in vivo* à de l'extrait de cannabis, du Δ9-THC ou du CBD au cours de la gestation. La mortalité fœtale inclut les résorptions fœtales au cours du développement ainsi que la mortalité à la naissance. Chez le rat et la souris, le jour embryonnaire est noté E. La parturition chez le rat se déroule entre E21 et E23. Ip pour injection intrapéritonéale, sc pour injection sous-cutanée, po pour gavage et iv pour injection intraveineuse.

(3) Effets d'une consommation gestationnelle de cannabis

Chez le modèle rongeur, il a été montré qu'une exposition à certains composés du cannabis au cours de la gestation peut entraîner un retard de croissance, une réduction du poids de naissance, des malformations (dus à des effets tératogènes) et une mortalité fœtale (qui comprend les résorptions fœtales au cours de la gestation et la mortalité à la parturition). Dans les prochains paragraphes sont présentés les résultats d'études *in vivo* chez le rongeur d'une exposition à certains composés du cannabis sur des paramètres fœtaux. Les résultats obtenus dans des études ayant observé des effets significatifs d'une exposition gestationnelle au cannabis ou à différents phytocannabinoïdes sur les paramètres fœtaux sont résumés dans la **Table 2**.

Un groupe a ainsi observé qu'une injection intrapéritonéale unique de souris gestantes à E6 avec 16 mg/kg de résine de cannabis entraîne un retard de croissance des fœtus (Persaud and Ellington, 1967). Dans la même étude, des injections intrapéritonéales avec le même traitement de E1 à E6 entraîne une résorption de tous les fœtus. Dans la même espèce, l'administration par injection sous-cutanée de 6,25 mg/kg/jour de Δ^9 -THC entre E7 et E11 et l'administration par gavage (également retrouvé sous le nom d'intubation gastrique) de 200 mg/kg de Δ^9 -THC à E10 et de 400 mg/kg de Δ^9 -THC à E9 entraînent des effets tératogènes chez les fœtus (Joneja, 1976). L'administration par injection intrapéritonéale chez des souris gestantes de 40 mg/kg de Δ^9 -THC entre E6 et E15, de 25 mg/kg de Δ^9 -THC entre E8 E10 et de 75 mg/kg de Δ^9 -THC entre E12 et E14 entraîne une augmentation significative des morts fœtales, pouvant aller jusqu'à près de 60% de résorptions fœtales (Mantilla-Plata et al., 1975). Ces données illustrent l'importance de la période d'exposition, les fœtus étant moins sensibles aux effets tératogènes du Δ^9 -THC plus le développement avance. Dans la même étude, une dose de 300 mg/kg de Δ^9 -THC à E8 ou E16 entraîne 77% et 78% de résorptions fœtales respectivement et a réduit le poids des fœtus survivants. Une étude récente a observé que 5 minutes d'exposition quotidienne de E5,5 à E17,5 à la fumée de joint contenant 0,2g de cannabis, ce qui est considéré comme une faible dose, entraîne une réduction du poids de naissance chez les petits et une réduction du gain de poids maternel au cours de la gestation (Benevenuto et al., 2017). Il a également été montré qu'un cannabinoïde synthétique, le CP-55,840 est également inducteur d'effets

tératogènes puissants chez les fœtus murins (Gilbert et al., 2016). Enfin, le traitement quotidien de souris de E5,5 à E18,5 avec 5 mg/kg de Δ 9-THC entraîne une diminution du poids maternel de souris à E19,5 une diminution de la taille de la portée et une diminution des poids embryonnaires et placentaires (Chang et al., 2017). Ces effets seraient entraînés par l'induction d'une mortalité fœtale et d'une restriction de la croissance intra-utérine par le Δ 9-THC.

Chez le rat, l'administration de 4,2 mg/kg de résine de cannabis chez des rattes gestantes de E1 à E6 induit 86% de fœtus anormaux, dont 29% de résorptions fœtales (contre 10% dans le groupe témoin) et 57% de malformations fœtales (contre 0% dans le groupe témoin) (Persaud and Ellington, 1968). Une étude chez le rat albinos a montré que l'administration de 50 mg/kg de résine de cannabis pendant toute la période de gestation (de E1 à entre E21 et E23) entraîne une résorption fœtale, une réduction du poids de corps à la naissance, des malformations et une mortalité post-natale (Singh et al., 1981). Une autre étude a observé que l'administration par gavage de 10 ou 150 mg/kg d'extrait de cannabis de E3 à la parturition entraîne une réduction dose-dépendante du gain de poids maternel (due à une réduction de la consommation d'eau et de nourriture) causant une réduction du poids de naissance fœtal (Abel et al., 1980). Dans la même étude, une augmentation de la mortalité post-natale et une diminution dose-dépendante du poids néonatal ont été observées. Toujours chez le rat, l'administration de 15 mg/kg ou de 50 mg/kg de Δ 9-THC tous les jours de E8 à la parturition entraîne l'augmentation de la mortalité fœtale (Hutchings et al., 1987). Enfin, chez le rat, l'administration de 250 mg/kg par jour de CBD pendant l'organogenèse a induit une mortalité embryonnaire totale chez 2 femelles sur 20 (US FDA Report, 2018; Huestis et al., 2019b).

En outre, un groupe a observé que l'administration chez des souris gestantes d'une faible dose (0,3%) de Δ 9-THC par inhalation d'une fumée de cigarette tous les jours de E5,5 à E17,5 entraîne une modification du sex-ratio (nombre de mâles/nombre de femelles), augmentant le nombre de petits mâles (Benevenuto et al., 2017). Deux autres études avaient également observé la corrélation entre une exposition au cannabis et l'augmentation du nombre de petits mâles (Fried and Charlebois, 1979a; Hutchings et al., 1987). Les auteurs ont émis l'hypothèse d'une foeto-toxicité plus spécifique sur les fœtus femelles.

Les résultats observés dans les études décrites plus haut sont très dépendants de la période d'exposition, de la chronicité de l'administration, des doses employées et de la méthode d'administration. Les effets tératogéniques ou foeto-toxiques du $\Delta 9$ -THC dans les modèles rongeurs ne sont cependant pas retrouvés systématiquement dans les études (Banerjee et al., 1975; Borgen et al., 1971; Fleischman et al., 1975; Pace et al., 1971).

Il est important de noter que dans la majorité des études précédemment citées, les doses employées sont très élevées et ne permettent pas de modéliser une consommation actuelle de cannabis récréationnel ou thérapeutique chez l'homme. Ainsi, une étude chez le rat utilisant une dose de $\Delta 9$ -THC se rapprochant, pour les auteurs, d'une exposition modérée chez l'humain (5 mg/kg) a observé qu'une administration orale par gavage quotidienne périnatale (de E15 jusqu'à 9 jpn) n'entraîne pas d'effets sur le gain de poids maternel, la durée de la gestation, le nombre de petits, leur poids de naissance et la mortalité post-natale (Campolongo et al., 2007). Au contraire, une étude chez le singe a montré une augmentation de la mortalité foetale après des injections intraveineuses quotidiennes avec 2,5 mg/kg de $\Delta 9$ -THC, avec des effets d'autant plus graves que l'administration était précoce au cours de la gestation (Asch and Smith, 1986), montrant l'importance de l'espèce étudiée et de la période d'exposition.

Dans certaines études chez la femme, la consommation de cannabis pendant la grossesse a été associée avec des effets néfastes sur la grossesse et le fœtus en développement (pour revue : Metz and Stickrath, 2015; Gunn et al., 2016; Conner et al., 2016; Grant et al., 2018; Metz and Borgelt, 2018; Thompson et al., 2019; Grant et al., 2020; Reece and Hulse, 2020a; Martínez-Peña et al., 2021; Shi et al., 2021; Ryan et al., 2021; Marchand et al., 2022) comme :

- des anémies gestationnelles (Witter and Niebyl, 1990),
- des naissances prématurées (Fried et al., 1984a; Dekker et al., 2012; Hayatbakhsh et al., 2012; Saurel-Cubizolles et al., 2014; Leemaqz et al., 2016; Baer et al., 2019; Corsi et al., 2019),
- des fausses couches et des individus mort-nés (Varner et al., 2014; Metz et al., 2017),
- des retards de croissance intra-utérins et des petits poids à la naissance (Zuckerman et al., 1989; Witter and Niebyl, 1990; Chasnoff et al., 1992; English et al., 1997;

Quinlivan and Evans, 2002; El Marroun et al., 2009; Hayatbakhsh et al., 2012; Bonello et al., 2014; Sturrock et al., 2020),

- une plus forte incidence des admissions aux urgences pédiatriques (Hayatbakhsh et al., 2012; Saleh Gargari et al., 2012; Warshak et al., 2015; Bonello et al., 2014; Corsi et al., 2019),
- des anomalies congénitales telles que des anomalies cardiovasculaires ou gastro-intestinales (Williams et al., 2004; Lam and Torfs, 2006; Forrester and Merz, 2006; Weinsheimer and Yanchar, 2008; van Gelder et al., 2014; Reece and Hulse, 2019a, 2019b, 2020b, 2020c),
- de potentiels effets tératogènes (Hecht et al., 1968; Carakushansky et al., 1969; Qazi et al., 1982; Hurd et al., 2005),
- des conséquences neuro-développementales chez les enfants (Greenland et al., 1982; Fried et al., 1984b; Hatch and Bracken, 1986; Day et al., 1994; Goldschmidt et al., 2000; Richardson, 2002; Varner et al., 2014),
- des altérations métaboliques (Lee and Hardy, 2021),
- des altérations reproductives (qui seront détaillées dans le chapitre III)

Plusieurs de ces pathologies seraient dues à l'altération des fonctions placentaires. En effet, comme il a été mentionné plus haut, le système des endocannabinoïdes est un régulateur important de l'activité, de la différenciation et de la prolifération placentaire. Il a ainsi été rapporté dans des études *in vitro* et *in vivo* que la dérégulation de la physiologie placentaire après une exposition à des phytocannabinoïdes peut être à l'origine des complications gestationnelles citées (Maia et al., 2020; Martínez-Peña et al., 2021).

De plus, il a été montré qu'une exposition au cannabis au cours de la gestation serait capable d'entraîner des altérations durables de certains processus cognitifs (comme la mémoire et les capacités d'attention) et neurocomportementaux (impulsivité et agressivité) chez l'enfant et l'adolescent (pour revue : Grant et al., 2018; Scheyer et al., 2019; Thompson et al., 2019; Roncero et al., 2020; De Genna et al., 2022; Ikeda et al., 2022). Les données actuelles ne permettent cependant pas d'établir des corrélations avec certitude.

A noter, certaines études chez la femme n'ont pas observé d'effets néfastes de la consommation de cannabis sur la grossesse, le fœtus et l'individu enfant puis adolescent. La

conflictualité qui existent encore entre les différentes études est en partie due à des facteurs confondants tels que :

- certains paramètres physiologiques (comme la nutrition) et socio-démographiques des femmes étudiées,
- l'usage multiple de substances,
- la composition du cannabis consommé,
- la méthode de consommation,
- la fréquence et la durée d'utilisation,
- les petits échantillons de certaines études
- la réticence à rapporter la consommation pour certaines femmes, faussant les études basées sur des questionnaires (Lozano et al., 2007; Metz et al., 2019).

Les effets puissants du cannabis observés sur de nombreuses fonctions physiologiques ont poussé des équipes de recherche à se pencher sur les intérêts thérapeutiques de ses composés.

3. Utilisation thérapeutique

Un grand nombre d'études s'est concentré sur les autres potentielles indications du cannabis à usage thérapeutique. Un certain nombre d'essais cliniques indiquent que le cannabis, associé ou non à des molécules thérapeutiques déjà existantes, pourrait être prometteur (pour revue : Borgelt et al., 2013; Whiting et al., 2015; Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez, 2018; Amin and Ali, 2019; T. P. Freeman et al., 2019; Klumpers and Thacker, 2019; Stasiłowicz et al., 2021) :

- pour réduire l'insomnie,
- pour réduire l'anxiété,
- contre l'épilepsie,
- dans le traitement de certains désordres neurologiques dont la maladie de Parkinson, le syndrome de la Tourette et la schizophrénie,
- dans le soulagement de manifestations associées avec le spectre autistique (Carreira et al., 2022),
- pour soulager certains symptômes associés à la sclérose en plaque, dont la spasticité,
- pour soulager les douleurs chroniques, particulièrement les douleurs neuropathiques (associées à un dommage du système nerveux),
- pour soulager certains symptômes associés aux soins palliatifs,
- contre les glaucomes,
- contre les pathologies rhumatismales,
- pour réduire l'inflammation,
- contre certains désordres gastro-intestinaux,
- pour réduire la nausée et les vomissements,
- pour stimuler la faim,
- contre certains cancers, en inhibant la croissance cellulaire, le cycle cellulaire, la migration et par un effet pro-apoptotique,
- en réduisant l'inflammation et certains symptômes associés avec une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), entraînant le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA),
- comme agent antimicrobien,

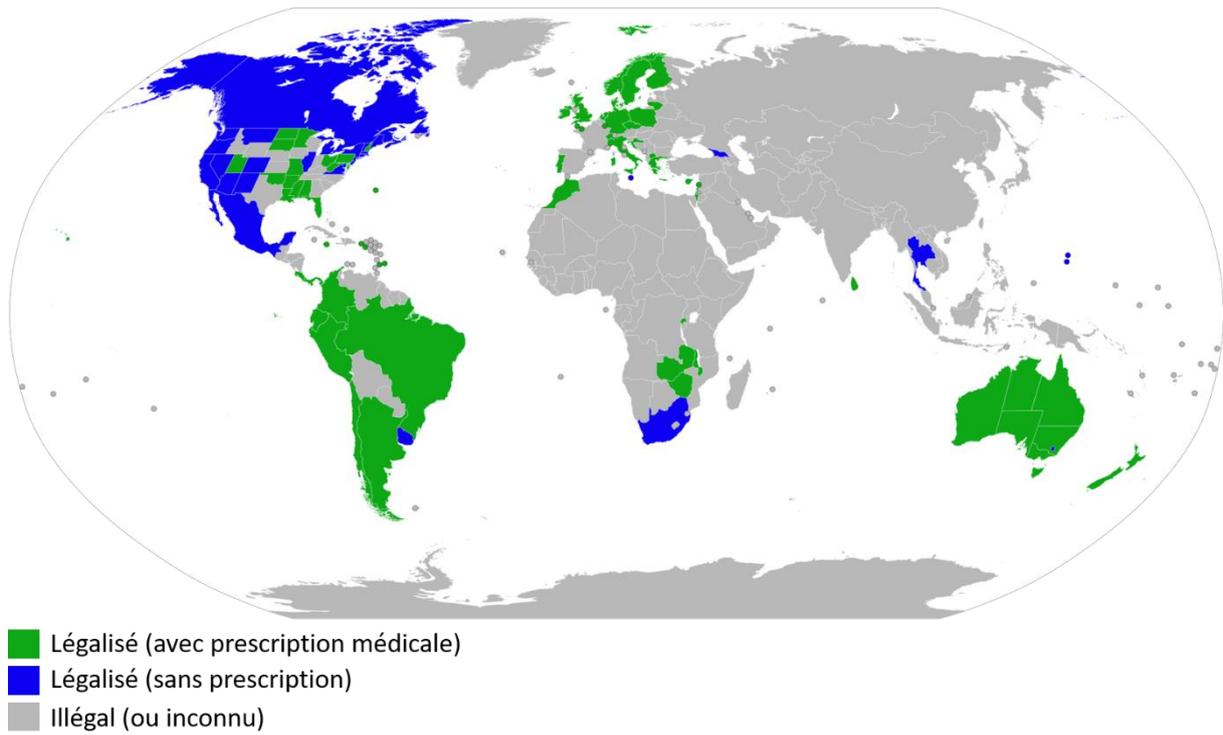


Figure 30 : Statut légal de la consommation thérapeutique de la plante entière de cannabis dans le monde
(issu de Wikipedia.org : Legality of cannabis in 2018)

- et même récemment contre le SARS-COV-2, en inhibant l'entrée cellulaire du virus mais aussi en diminuant l'inflammation entraînée par l'infection (Esposito et al., 2020; Mamber et al., 2020; Ragia and Manolopoulos, 2020; Khalid et al., 2021; Paland et al., 2021; Shover et al., 2022; van Breemen et al., 2022).

Si le cannabis a un potentiel thérapeutique pour un grand nombre d'indications, il est important de noter qu'un grand nombre de ces usages thérapeutiques n'en sont qu'à un stade précoce de développement.

Comme il a été évoqué plus haut, le CBD est capable de réduire certains effets néfastes du $\Delta 9$ -THC et est très bien toléré, même à hautes doses (Taylor et al., 2018), ce qui permet d'augmenter les doses de $\Delta 9$ -THC administrées. L'association du CBD avec le $\Delta 9$ -THC contribue donc à la sécurité du médicament, tout en assurant son efficacité clinique. De plus, de nombreuses équipes ont mis en lumière que le CBD seul a de nombreuses potentielles indications thérapeutiques (pour revue : Crippa et al., 2018; Noreen et al., 2018; White, 2019; Sholler et al., 2020).

De nombreux pays ont légalisé l'usage médical du cannabis : l'Afrique du Sud, l'Argentine, l'Australie, la Barbade, le Brésil, le Canada, le Chili, la Colombie, le Costa Rica, la Croatie, Chypre, la République Tchèque, le Danemark, l'Equateur, la Finlande, la Géorgie, l'Allemagne, la Grèce, l'Irlande, Israël, l'Italie, la Jamaïque, le Liban, la Lituanie, le Luxembourg, le Malawi, Malte, le Mexique, les Pays-Bas, la Nouvelle-Zélande, la Macédoine du Nord, la Norvège, le Panama, le Pérou, la Pologne, le Portugal, le Royaume Uni, le Rwanda, Saint-Vincent et les Grenadines, San Marino, le Sri Lanka, la Suisse, la Thaïlande, l'Uruguay, le Vanuatu, la Zambie, le Zimbabwe et 37 états des USA (**Figure 30**).

Dans plusieurs pays de l'Union Européenne, dont la France et dans certains états des USA, l'utilisation de cannabis thérapeutique est autorisée pour trois médicaments (Abuhasira et al., 2018) :

- Le Nabiximols, produit par *GW pharmaceutical* sous le nom de Sativex[®] (Russo and Guy, 2006; Vermersch, 2011). Il est composé de CBD et de $\Delta 9$ -THC extraits de la plante de cannabis, en quantités similaires et est utilisé dans le soulagement de la spasticité et des douleurs neuropathiques associées avec la sclérose en plaque. Il est administré de façon sublinguale par un spray oromucosal à raison de 12 vaporisations par jour maximum, chaque vaporisation contenant 2,7 mg de $\Delta 9$ -THC et 2,5 mg de CBD.
- L'Epidiolex[®], produit par *GW pharmaceutical*. Il contient du CBD extrait de la plante de cannabis et est indiqué dans le traitement des crises d'épilepsie associées au syndrome de Lennox-Gastaut et au syndrome de Dravet chez les enfants de 2 ans et plus ne répondant pas aux traitements conventionnels (Sekar and Pack, 2019). Il est administré sous forme de solution buvable, à raison de 2 à 50 mg/kg/jour.
- Le Dronabinol, produit par *AbbVie Inc.* sous le nom de Marinol[®] et produit par *Insys Therapeutics Inc* sous le nom de Syndros[®]. Il contient un $\Delta 9$ -THC produit synthétiquement (non pas extrait de la plante) et est utilisé pour stimuler la faim chez les patients atteints du SIDA souffrant d'anorexie et de perte de poids et chez des patients traités contre un cancer. Il est également utilisé pour le soulagement des nausées et des vomissements induit par la chimiothérapie chez les patients traités contre un cancer ne répondant pas aux traitements conventionnels. Il est administré oralement en capsules ou en solution, à raison de 2,5 à 40 mg/jour (20mg/jour en moyenne).
- Le Nabilone (Ward and Holmes, 1985), produit par *Meda Pharmaceuticals Inc.* sous le nom de Casamet[®], et produit par AOP Orphan Pharmaceuticals AG sous le nom de Canemes[®]. Il contient un dérivé de synthèse du $\Delta 9$ -THC, plus puissant que le $\Delta 9$ -THC, et est utilisé pour le soulagement des nausées et des vomissements induit dans la chimiothérapie chez les patients traités pour un cancer ne répondant pas aux traitements conventionnels. Il est administré par capsule orale à raison de 1mg/jour.

En France, l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a délivré une autorisation de mise sur le marché (AMM) en janvier 2014 pour le Sativex[®] mais ce dernier n'est toujours pas commercialisé, en raison d'un conflit sur le prix de vente entre les autorités de santé françaises et le laboratoire distributeur du Sativex[®]. L' Epidiolex a également obtenu récemment son AMM en France mais n'est pas encore commercialisé. Ces deux médicaments sont prescrits et délivrés de manière stricte, sur une période courte. L'usage des deux autres médicaments requiert une Autorisation temporaire d'utilisation (ATU), procédure venant avec de lourdes démarches administratives pour le patient.

Acomplia[®] est un médicament contenant du rimonabant, une molécule synthétique possédant des effets antagonistes sur le récepteur CB1 (décrite plus haut, dans le chapitre II consacré au système des ECB). A l'origine prescrit dans le traitement de l'obésité du fait de ses propriétés anorexigènes, son AMM a été retirée en 2008 à causes de ses nombreux effets secondaires (https://www.has-sante.fr/jcms/c_477412/en/acomplia-rimonabant).

La stratégie de santé publique française tend ces dernières années à augmenter les utilisations thérapeutiques potentielles du cannabis sur son territoire. Ainsi, en 2018, l'ANSM créé un comité scientifique spécialisé temporaire (CSST), nommé « Evaluation de la pertinence et de la faisabilité de la mise à disposition du cannabis thérapeutique en France », ayant pour but d'étudier le potentiel intérêt thérapeutique de la consommation de plante de cannabis dans les indications suivantes (<https://ansm.sante.fr/dossiers-thematiques/cannabis-a-usage-medical/cadre-et-mise-en-oeuvre-de-lexperimentation-du-cannabis-medical#:~:text=La%20loi%20de%20financement%20de,en%20%C5%93uvre%20par%20'ANSM>) :

- les douleurs neuropathiques réfractaires aux thérapies accessibles,
- certaines formes d'épilepsies sévères et pharmaco-résistantes,
- les symptômes liés au cancer ou à son traitement,
- la spasticité liée à la sclérose en plaques
- certaines situations palliatives.

Sur les recommandations du CSST, l'ANSM lance en Octobre 2020 une expérimentation sur la mise à disposition de cannabis thérapeutique dans ces cinq indications. Cette expérimentation concerne 3000 patients et durera deux ans (de mars 2021 jusqu'à mars 2023). Ces patients utilisent le cannabis de manière thérapeutique sous la forme de fleurs séchées à vaporiser pour inhalation ou via des capsules d'huile administrées par voie orale, avec plusieurs ratios de CBD/ Δ 9-THC testés, et seront suivis pour juger de l'intérêt thérapeutique de ces administrations.

Comme il a été vu au cours de ce chapitre, les tendances françaises et mondiale de la consommation récréationnelle mais aussi thérapeutique du cannabis sont en augmentation.

Nous avons également vu que le système des ECB régule un grand nombre de processus physiologiques, dont la fonction de reproduction, à la fois chez l'adulte, mais également lors de sa mise en place au cours du développement embryonnaire.

L'équilibre du système repose sur la quantité de ligands endogènes, qui dépend de l'expression et de l'activité de leurs enzymes de synthèse et de dégradation, et repose sur l'expression des différents récepteurs. Les voies de signalisation déclenchées dépendent fortement de l'environnement moléculaire des récepteurs ainsi que des concentrations de ligands.

Une exposition à des ligands exogènes, comme dans le cas d'une consommation de cannabis, qui contient des phytocannabinoïdes capables d'interagir avec le système des ECB, déséquilibre le système. De façon cohérente aux mécanismes régulés par le système des ECB, il a effectivement été rapporté qu'une exposition au cannabis peut mener à des effets néfastes sur de nombreuses fonctions physiologiques, dont la fonction de la reproduction.

Espèce	Traitement	Exposition	Effets	Référence
Souris	50 mg/kg/jour de Δ 9-THC ou de CBN par po	E12 à E16	Diminution de la [T] foétale	(Dalterio and Bartke, 1981)
Rat	5mg/kg/jour de Δ 9-THC deux fois par jour par po	E14 à E19	Inhibition du pic de [T] à E18 , anomalies du comportement sexuel et de l'éjaculation chez l'adulte	(Murphy et al., 1995)
Souris	1 μ M de JWH133 pendant 48h sur des gonades désagrégées <i>in vitro</i>	E13.5	Entrée en méiose des gonocytes	(De Domenico et al., 2017b)
Rat	3,3 mg de Δ 9-THC par exposition à la fumée + 15 injections de 8 mg/kg de Δ 9-THC par ip	E1 à la parturition	Diminution du poids des vésicules séminales et de la prostate chez l'adulte, diminution de la fécondité chez l'adulte	(Fried and Charlebois, 1979b)
Souris	50 mg/kg de Δ 9-THC par po	E12	Diminution de la [T]p et de la [LH]p chez l'adulte	(Dalterio and deRoos, 1986a)
	50 mg/kg de CBD par po		Diminution du poids testiculaire chez l'adulte	

Table 3 : Effets néfastes d'une exposition gestationnelle à plusieurs phytocannabinoïdes sur la fonction reproductive chez des animaux modèles.

Ce tableau résume les résultats obtenus d'études ayant observé des effets néfastes sur la fonction reproductive des individus mâles suite à une exposition maternelle *in vivo* à du Δ 9-THC, du CBD ou du CBN au cours de la gestation. Une étude a testé *in vitro* l'effet d'un agoniste du récepteur CB2, le JWH133, sur des testicules foétaux murins (De Domenico et al., 2017a). Chez le rat et la souris, le jour embryonnaire est noté E. La parturition chez le rat se déroule entre E21 et E23. Ip pour injection intrapéritonéale, po pour gavage, iv pour injection intraveineuse, T pour testostérone, [T]p pour testostérone plasmatique, [T]t pour concentration de testostérone testiculaire, [LH]p et [FSH]p pour concentration plasmatique de LH et de FSH respectivement.

CHAPITRE III. LES PHYTOCANNABINOÏDES ET LES PERTURBATIONS DE LA FONCTION REPRODUCTIVE MALE

A) Chez le fœtus

Comme il a été vu plus haut, une consommation maternelle de cannabis au cours de la vie fœtale a été reliée avec la perturbation de plusieurs fonctions physiologiques. Cette prochaine partie sera consacrée aux études ayant rapporté les effets néfastes d'une exposition fœtale au cannabis sur la fonction de reproduction chez le mâle.

Les résultats obtenus dans des études ayant observé des effets significatifs d'une exposition gestationnelle à différents phytocannabinoïdes sur la fonction de reproduction chez plusieurs espèces animales sont résumés dans la **Table 3**.

En particulier, le groupe de Susan Dalterio a réalisé dans les années 1980 une série d'études phares qui décrivent les effets d'une exposition gestationnelle à différents phytocannabinoïdes chez la souris et les effets induits sur la fertilité des individus mâles adultes exposés.

Ainsi, le traitement quotidien de E12 à E16 de souris femelles gestantes avec 50 mg/kg de Δ^9 -THC ou de CBN par voie orale, entraîne une diminution significative des concentrations de testostérone fœtales avec les deux traitements (Dalterio and Bartke, 1981). De même, le traitement quotidien de rattes gestantes par gavage avec 5mg/kg de Δ^9 -THC deux fois par jour de E14 à E19 inhibe le pic de testostérone normalement observé à E18 dans cette espèce, et affecte le comportement sexuel et l'éjaculation des individus adultes (Murphy et al., 1995). Plus récemment, un groupe a montré que l'exposition *in vitro* de gonocytes murins à 1 μ M de JWH133, un agoniste synthétique du récepteur CB2, pendant 48 heures, induit l'entrée en méiose des gonocytes suivi de leur dégénérescence (De Domenico et al., 2017a). Ce résultat n'a cependant pas été validé *in vivo* chez le mâle dans la même étude.

Souris			Chez l'adulte :	(Dalterio et al., 1984a)
	50 mg/kg de CBD par po	E18	- Augmentation du poids testiculaire et des vésicules séminales, augmentation non significative de la [LH]p	
			- Augmentation de la sécrétion de testostérone <i>in vitro</i> après une exposition à 12,5mIU d'hCG	
			- Augmentation de la [LH]p après injection de 20µg de T post-castration	
	50 mg/kg de Δ9-THC par po		- Augmentation de la [T]t après une administration intra-testiculaire de 10 ng de LH <i>in vivo</i> , diminution de la [T]t en condition basale <i>in vivo</i>	
			- Augmentation non significative de la sécrétion testostérone <i>in vitro</i> après une exposition à 12,5mIU d'hCG	
			- Diminution de la [T]p et de la [FSH]p après injection de 20µg de T post-castration	
	50 mg/kg de CBN par po		- Diminution du poids des vésicules séminales, diminution de la [T]t, diminution non-significative de la [T]p, diminution de la [FSH]p	
			- Augmentation de la [LH]p et de la [FSH]p post-castration	

Comme il a été mis en évidence dans une étude citée plus haut, l'exposition à des phytocannabinoïdes au cours de la vie fœtale peut entraîner des conséquences sur la fertilité de l'individu adulte (Murphy et al., 1995). Ce constat a également été fait dans d'autres études. Ainsi, des rats dont les mères ont été exposées quotidiennement à de la fumée de joint contenant 3,3 mg Δ 9-THC pendant la gestation, puis qui à l'âge adulte ont reçu 15 injections intra-péritonéales de 8 mg/kg de Δ 9-THC, ont présenté une diminution du poids des vésicules séminales et de la prostate et se sont montrés moins féconds (Fried and Charlebois, 1979b). Dans une autre étude, l'administration orale d'une dose considérée comme « forte » (50 mg/kg) de Δ 9-THC ou de CBD à E12 chez des souris gestantes a été corrélée avec une baisse de la fertilité chez les adultes mâles issus de cette gestation (Dalterio and deRoos, 1986b). En effet, chez les mâles adultes, l'exposition fœtale au Δ 9-THC a entraîné une diminution significative de niveaux plasmatiques de LH et de testostérone et l'exposition fœtale au CBD a entraîné une diminution du poids testiculaire. Dans une autre étude du même groupe, l'administration orale de souris gestantes avec 50 mg/kg de Δ 9-THC, de CBD ou de CBN à E18 a également eu des effets sur la fonction de reproduction des animaux issus de ces gestations à l'âge adulte (Dalterio et al., 1984b). Ainsi, l'exposition fœtale au CBD a entraîné, chez l'adulte, une augmentation du poids testiculaire et des vésicules séminales et une augmentation non significative des concentrations de LH plasmatiques, tandis que l'administration maternelle de CBN a entraîné, chez l'adulte, une diminution du poids des vésicules séminales, une diminution de la concentration de testostérone testiculaire, une diminution non significative de la concentration plasmatique de testostérone et une diminution des niveaux plasmatiques de FSH. L'exposition fœtale au Δ 9-THC a entraîné, chez l'adulte, une augmentation de la sécrétion de testostérone après une administration intra-testiculaire de 10 ng de LH *in vivo*, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de testostérone stimulée par 12,5 mIU d'hCG *in vitro*, mais elle a été associée avec une diminution de la sécrétion de testostérone basale *in vivo*. Enfin, des expériences de castration dans cette même étude ont montré une perturbation du rétrocontrôle testiculaire sur les sécrétions hypothalamiques et hypophysaires avec les trois traitements étudiés. Les auteurs concluent de cette étude que l'administration d'une dose unique de phytocannabinoïdes peu avant la naissance, est capable d'induire des altérations fortes et durables sur les sécrétions endocrines de l'axe HHT chez l'adulte.

Espèce	Traitement	Effets	Référence
Rat	0,1 mg/kg de Δ9-THC ou de CBN par po	Diminution de la [LH]p 60 minutes après administration	(Steger et al., 1990)
Rat	0,5 mg/kg de Δ9-THC par po	Diminution de la [LH]p 60 minutes après administration	(Murphy et al., 1990)
	0,5 mg/kg de Δ9-THC+CBN ou de Δ9-THC+CBD par po	Diminution de la [LH]p 30, 60 et 120 minutes après administration	
	0,5 mg/kg de Δ9-THC, de CBD ou de CBN par po	Diminution de l'activité de neurones à norépinephrine 30, 60 et 120 minutes après administration	
Rat	2μL de Δ9-THC à 10 ⁻⁶ M par injection dans le 3 ^{ème} ventricule cérébral	Diminution de la [LH]p 30, 60 et 120 minutes après administration, augmentation de la [GnRH]hypo	(Wenger et al., 1987a)
	Traitement <i>in vitro</i> de cellules hypophysaires 5 x10 ⁻⁹ M ou 5 x 10 ⁻⁸ M de Δ9-THC	Pas d'altération de la libération de LH basale et stimulée par la GnRH, pas d'altération du contenu intracellulaire en LH	
Souris	2mg d'extrait de cannabis par ip pendant 20 ou 30 jours	Diminution de la [LH]p et de la [FSH]p	(Mandal and Das, 2010)
Souris	50 mg/kg de Δ9-THC	Diminution de la [LH]p et de la [FSH]p	(Dalterio et al., 1978)
Rat	16 inhalations de fumée de marijuana/jour pendant 75 jours	Augmentation [FSH]p	(Huang et al., 1979)
Rat	10 ou 50 mg/kg/jour de Δ9-THC pendant 14 jours	Augmentation de la [LH]p	(Rosenkrantz and Esber, 1980)
	10 ou 50 mg/kg/jour de Δ9-THC pendant 90 ou 180 jours	Augmentation de la [FSH]p	
Singe	30, 100 ou 300 mg/kg/jour de CBD pendant 90 jours	Augmentation de la [FSH]p	
Singe	0,07 mg/kg/jour de D1 à D70, 0,14 mg/kg/jour de D71 à D140 et 0,36 mg/kg/jour de D141 à D210 par ingestion d'un cookie	Augmentation de la [LH]p et de la [FSH]p	(Hedges et al., 2022)
4 hommes, ayant déjà consommé du cannabis	1 ou 2 joints avec 2,8% de Δ9-THC	Diminution de la [LH]p 15 minutes après la consommation	(Cone et al., 1986)
10 hommes consommateurs de cannabis « chroniques » (depuis en moyenne 12,8 mois)	vs 10 hommes non consommateurs	Diminution de la [LH]p basale et stimulée par une injection iv de GnRH	(Vescovi et al., 1992a)
27 hommes consommateurs de cannabis « modérés » à « fréquents » (≥ 3 fois/semaine)	Consommation moyenne : 35 à 198 mg de Δ9-THC	Diminution de la [LH]p 3 heures après un joint Diminution de la [LH]p à partir de la 4 ^{ème} semaine	(Cohen, 1976)

D'autres études ont montré qu'une exposition péri- ou post-natale au CBD, au CBN ou au Δ^9 -THC avait également des effets néfastes sur la santé reproductive des individus à l'âge adulte (Dalterio, 1980; Dalterio et al., 1984a)

Ces études sur le modèle rongeur permettent d'avancer qu'une exposition à des phytocannabinoïdes pendant la gestation a des conséquences sur la fertilité de l'individu, dont des altérations de l'axe HHT et des fonctions testiculaires. De plus, plusieurs de ces études ont montré que l'administration d'une dose unique à la mère gestante peut avoir des effets à long terme sur la fertilité de l'individu adulte. Ces études illustrent également l'importance de la période d'exposition, des doses employées, de la méthode d'administration, de l'espèce étudiée et du moment d'observation des individus issus de l'exposition gestationnelle.

Le système des ECB est décrit chez le fœtus murin dans plusieurs types cellulaires testiculaires et au niveau central (comme il a été exposé dans le chapitre II). En revanche, il n'existe à ce jour aucune donnée sur l'expression du système des ECB dans le testicule humain fœtal.

B) Chez l'adulte

Comme chez la femme (pour revue : Castel et al., 2020; Corsi et al., 2021), la consommation de cannabis est corrélée à des perturbations de la fonction de reproduction chez l'homme. Dans la partie suivante, seront présentés les résultats d'études s'intéressant aux effets d'une exposition à différents composés du cannabis sur différents niveaux de la fonction reproductive masculine chez l'homme et les animaux modèles à l'âge adulte (pour revue : Brown and Dobs, 2002; Park et al., 2004; S. S. du Plessis et al., 2015b; Hsiao and Clavijo, 2018; Rajanahally et al., 2019; Payne et al., 2019; Belladelli et al., 2021; Fonseca and Rebelo, 2021b; Maccarrone et al., 2021; Ryan et al., 2021; Srinivasan et al., 2021; Alghobary and Mostafa, 2022).

9 hommes consommateurs de cannabis « fréquents » (≥10 fois/semaine)	vs 11 hommes consommateurs de cannabis « fréquents » (entre 4 et 9 fois/semaine)	Diminution de la [FSH]p	(Kolodny et al., 1974a)
291 hommes anciens consommateurs de cannabis, 74 hommes consommateurs actuels de cannabis (environ 2,98 fois par semaine)	vs 297 hommes non consommateurs (n'en n'ayant jamais consommé)	Diminution de la [FSH]p	(Feiby L. Nassan et al., 2019)
93 hommes consommateurs de cannabis (≥1 fois/semaine)	vs 35 hommes non consommateurs (n'en n'ayant jamais consommé)	Pas d'altération de la [FSH]p et de la [LH]p	(Block et al., 1991)
25 hommes consommateurs de cannabis (≥1 fois/semaine, environ 5 fois/semaine)	vs 13 hommes non consommateurs (n'en n'ayant jamais consommé)	Pas d'altération de la [FSH]p et de la [LH]p	(Cushman, 1975a)
16 hommes consommateurs « réguliers » (≥1 fois/semaine)	vs 23 hommes non consommateurs	Pas d'altération de la [FSH]p et de la [LH]p	(Verhaeghe et al., 2020)
Rat	Traitement <i>in vitro</i> de fragments hypothalamiques avec 10 µM de Δ9-THC	Altération de la GnRH stimulée par la dopamine ou la norépinephrine 1 heure après l'administration	(Rettori et al., 1990)
Souris	3 ou 6 mg/kg/jour d'extrait de cannabis pendant 36 jours	Diminution de l'expression du récepteur à la GnRH dans l'hypophyse	(Banerjee et al., 2011b)
Souris	50 mg/kg de Δ9-THC	Augmentation de la sécrétion de GnRH basale et stimulée par la norépinephrine 1 heure après l'administration	(Dalterio et al., 1987)
	100 mg/kg de Δ9-THC	Augmentation de la sécrétion de GnRH stimulée par la norépinephrine et par la clonidine 1 heure après l'administration	
	Traitement <i>in vitro</i> d'hypophyse avec 250 ng/mg de Δ9-THC	Augmentation de la libération de LH stimulée par la GnRH 10 minutes après l'administration	

Table 4 : Effets néfastes d'une exposition au cannabis ou à des phytocannabinoïdes sur les sécrétions hormonales hypothalamiques et hypophysaires chez des modèles animaux et chez l'homme.

Ce tableau résume les résultats obtenus d'études ayant observé des modifications significatives de la sécrétion de GnRH, de la LH et/ou de la FSH après une exposition au cannabis (extrait ou marijuana), au Δ9-THC, ou CBD ou au CBN chez des animaux mâles adultes *in vivo* et chez l'homme. Deux études ont étudié les effets du Δ9-THC *in vitro* chez le rat (Wenger et al., 1987b; Rettori et al., 1990). Ip pour injection intrapéritonéale, po pour gavage, iv pour injection intraveineuse, D pour jour, T pour testostérone, [GnRH]hypo pour concentration de GnRH dans l'hypothalamus, [LH]p et [FSH]p pour concentration plasmatique de LH et de FSH respectivement et vs pour versus.

1. Les perturbations endocrines de l'axe hypothalamo-hypophysio- testiculaire

Comme il a été vu au cours du chapitre II de ce manuscrit, le système des ECB est exprimé dans l'hypothalamus, l'hypophyse et le testicule et il est impliqué dans la régulation des sécrétions endocrines de l'axe HHT. Il a été montré que l'exposition à des ligands exogènes, comme des phytocannabinoïdes contenus dans le cannabis, perturbe certaines de ces sécrétions.

a) L'altération de la sécrétion de GnRH et des gonadotropines

Les résultats obtenus dans des études ayant observé des effets significatifs d'un traitement au cannabis ou à différents phytocannabinoïdes sur sécrétion de GnRH, de LH et/ou de FSH *in vitro* et *in vivo* chez les animaux modèles et l'homme sont résumés dans la **Table 4**.

(1) Dans les modèles animaux

Des études ont trouvé un effet négatif du $\Delta 9$ -THC, du CBD et du CBN sur la sécrétion de LH (**Table 4**). Ainsi, une étude a observé qu'un traitement par gavage à une dose dite « faible » dans cette étude (0,1 mg/kg) de $\Delta 9$ -THC ou de CBN, mais pas de CBD, entraîne chez le rat *in vivo*, une diminution de la concentration plasmatique de LH 60 minutes après l'administration, mais pas de la FSH (Steger et al., 1990). Dans une étude du même groupe, il a été montré que la co-administration *in vivo* par gavage chez le rat de 0,5 mg/kg de $\Delta 9$ -THC avec la même dose de CBN ou de CBD, intensifie cet effet du $\Delta 9$ -THC en le faisant apparaître plus tôt (dès 30 minutes) et en le faisant durer plus longtemps (jusqu'à 120 minutes) (Murphy et al., 1990). Dans une autre étude menée chez le rat, l'injection *in vivo* dans le cerveau de rats de 10^{-6} M de $\Delta 9$ -THC, dose qui se rapproche d'une exposition récréationnelle chez l'homme, entraîne une diminution de la concentration plasmatique de LH 30 minutes après l'administration et jusqu'à 120 minutes après l'administration, mais n'affecte pas celle de la FSH (Wenger et al., 1987a).

Dans d'autres études, une exposition à du cannabis ou du $\Delta 9$ -THC seul altère à la fois la sécrétion de la LH et celle de la FSH. Ainsi, dans une étude menée sur la souris, l'injection intra-péritonéale *in vivo* de doses dites « faibles » dans cette étude (2 mg) d'extrait de résine de cannabis pendant 20 ou 30 jours consécutifs, entraîne la diminution significative des concentrations plasmatiques de LH et de FSH (Mandal and Das, 2010). Par ailleurs, dans la même étude, les souris traitées pendant 40 jours consécutifs ont vu leurs concentrations de LH et de FSH plasmatiques remonter, suggérant un effet adaptatif de l'axe HHT. Le même résultat a été observé dans cette étude chez des souris traitées quotidiennement pendant 40 jours puis observées après une période de 45 jours, suggérant également une réversibilité des effets du cannabis. Cet effet adaptatif avait été proposé dans une étude plus ancienne : le traitement de souris *in vivo* avec 50 mg/kg de $\Delta 9$ -THC entraîne une diminution significative de la LH et de la FSH plasmatiques, mais elles ne sont pas affectées à une dose de 100 mg/kg de $\Delta 9$ -THC (Dalterio et al., 1978).

Au contraire des résultats énumérés ci-dessus, des études ont à l'inverse observé une augmentation des concentrations plasmatiques de LH et/ou de FSH après une exposition au cannabis, au $\Delta 9$ -THC ou au CBD. Ainsi, l'exposition *in vivo* de rats mâles adultes à de la fumée de joint pendant 75 jours consécutifs à des niveaux comparables aux doses récréationnelles chez l'humain, entraîne une augmentation des niveaux de FSH plasmatiques peu de temps après chaque exposition (Huang et al., 1979). De même, le traitement *in vivo* par gavage des rats avec 10 et 50 mg/kg de $\Delta 9$ -THC pendant 180 jours consécutifs entraîne une augmentation significative de la LH plasmatique après 14 jours de traitement, qui est ensuite revenue à un niveau comparable au témoin, suggérant pour les auteurs, l'installation d'une tolérance (Rosenkrantz and Esber, 1980). Dans cette étude, le même traitement entraîne une augmentation de la FSH plasmatique après 90 et 180 jours consécutifs d'exposition. En outre, le traitement *in vivo* de singes par gavage pendant 90 jours consécutifs avec 30, 100 ou 300 mg/kg de CBD, entraîne une augmentation des taux plasmatiques de FSH dès 30 mg/kg, qui sont restés hauts jusqu'à 30 jours après l'arrêt du traitement. Dans une autre étude, le traitement *in vivo* de singes pendant 7 mois par l'ingestion quotidienne de cookies avec des doses croissantes de $\Delta 9$ -THC (0,07 mg/kg/jour entre 1 et 70 jours, 0,14 mg/kg/jour entre 71 et 140 jours, et 0,36 mg/kg/jour entre 141 et 210 jours) a entraîné une

augmentation dose-dépendante de la LH et de la FSH plasmatiques (Hedges et al., 2022). Dans ces études précédemment citées, certains auteurs émettent l'hypothèse d'une compensation des sécrétions hormonales de l'axe HHT, qui serait secondaire à des effets négatifs du cannabis ou de certains phytocannabinoïdes sur cet axe.

(2) Chez l'homme

Certaines études ont trouvé un effet d'une consommation de cannabis sur les niveaux de LH plasmatiques chez l'homme (**Table 4**). Ainsi, un groupe a montré que la consommation d'un ou de deux joints par jour contenant 2,8% de $\Delta 9$ -THC par 4 hommes ayant déjà consommé du cannabis entraîne une diminution significative de la LH plasmatique environ 15 minutes après l'administration, sans affecter la FSH (Cone et al., 1986). De même, une étude a observé une réduction de la LH plasmatique chez 10 hommes consommateurs de cannabis définis comme « chroniques » dans cette étude (consommation depuis 12,8 mois en moyenne), comparé à 10 hommes non-consommateurs (Vescovi et al., 1992a). Dans cette étude, les niveaux de FSH n'étaient pas affectés. Une étude menée sur 27 hommes consommateurs de cannabis définis comme « modérés à fréquents » (consommant au moins 3 fois par semaine) a montré que la consommation aiguë (3 heures après un joint) et chronique (4 semaines) de cannabis était associée avec une diminution de la LH plasmatique (Cohen, 1976).

Dans d'autres études, la consommation de cannabis affecte la FSH plasmatique, sans altérer la LH. Une étude menée sur 20 hommes consommateurs de cannabis définis comme « fréquents » (consommant au moins 4 fois par semaine depuis plus de 6 mois) a mis en évidence que si tous présentaient une concentration de FSH plasmatique entrant dans les valeurs fixées comme normales. Cependant, une diminution significative de la FSH plasmatique chez les 9 hommes consommant plus de 10 joints par semaine a été observée par rapport aux 11 hommes qui en consommaient entre 4 et 10 (Kolodny et al., 1974a). Dans cette étude, les auteurs ont relevé que les valeurs plasmatiques de LH étaient normales et similaires dans tous les groupes. Dans une étude récente menée sur 662 hommes, il a également été mis en évidence que les 291 hommes ayant consommé du cannabis dans le passé et les 74 hommes en consommant encore (à une fréquence d'environ 2,98 fois par semaine), présentent des concentrations plasmatiques de FSH significativement plus faibles

que les 297 hommes n'en n'ayant jamais consommé, mais des concentrations plasmatiques de LH normales (Feiby L. Nassan et al., 2019).

Au contraire des résultats présentés ci-dessus, une étude sur 93 consommateurs de cannabis (consommant au moins 1 fois par semaine) n'a pas observé de diminution de la LH ou de la FSH plasmatique par rapport aux 35 hommes du groupe témoin, peu importe leur fréquence de consommation (Block et al., 1991). De même, la concentration de LH et de FSH plasmatique de 25 hommes consommateurs de cannabis (consommant au moins 1 fois par semaine, et environ 5 fois par semaine) n'étaient pas diminuées par rapport à 13 hommes non-consommateurs (n'en n'ayant jamais consommé) (Cushman, 1975a). Enfin, une étude française a également observé que les concentrations plasmatiques de 16 hommes consommateurs de cannabis définis comme « réguliers » (consommant au moins une fois par semaine) et 23 hommes non consommateurs n'étaient pas significativement différentes (Verhaeghe et al., 2020). Dans ce sens, une méta-analyse a récemment conclu sur l'absence d'altération de la LH et de la FSH plasmatique après une exposition au cannabis chez l'homme (Belladelli et al., 2021a).

Dans certains travaux cités précédemment, une exposition au cannabis peut avoir un effet négatif sur la sécrétion de GnRH et des gonadotropines. Comme il a été décrit dans le chapitre II, le système des ECB est présent au niveau de l'hypothalamus, de l'hypophyse et du testicule chez les rongeurs et l'homme (pour revue : Gorzalka and Dang, 2012; Bovolin et al., 2014; Hillard et al., 2016) et la signalisation de ce système module la sécrétion de GnRH et de LH (Herkenham et al., 1991; T. Wenger et al., 1999; Wenger et al., 2000, 2001; Scorticati et al., 2004; Gammon et al., 2005; Oláh et al., 2008). L'exposition à des phytocannabinoïdes contenus dans le cannabis, comme le $\Delta 9$ -THC, pourrait déréguler la signalisation du système des ECB dans l'hypothalamus et l'hypophyse, impactant la libération de GnRH et des gonadotropines. Les mécanismes d'action des phytocannabinoïdes sur l'axe HHT ne sont pas encore à ce jour élucidés, mais des hypothèses ont été émises dans plusieurs études.

Ainsi, dans une étude citée plus haut, l'injection dans le cerveau de rats *in vivo* de 10^{-6} M de $\Delta 9$ -THC, dose qui se rapproche d'une exposition récréationnelle chez l'homme, entraîne une

diminution de la LH plasmatique mais également une augmentation de la quantité de GnRH dans l'hypothalamus (Wenger et al., 1987a). Dans cette étude, le traitement *in vitro* de cellules hypophysaires avec 5×10^{-9} M ou 5×10^{-8} M de $\Delta 9$ -THC (des doses plus fortes étant toxiques pour ces cellules), n'affecte pas la libération de LH basale ou stimulée par la GnRH, ni le contenu intracellulaire en LH dans ces cellules. L'ensemble de ces résultats ont amené les auteurs à émettre l'hypothèse qu'une exposition $\Delta 9$ -THC entraîne une inhibition, non pas de la synthèse, mais de la libération de la GnRH par les neurones hypothalamiques spécialisés, conduisant à une diminution de la sécrétion de LH.

Des groupes ont par ailleurs proposé que le $\Delta 9$ -THC n'inhibe pas directement les neurones à GnRH mais plutôt les neurones régulateurs de ces derniers. Le traitement *in vitro* de fragments d'hypothalamus de rats avec 10 μ M de $\Delta 9$ -THC n'affecte pas la libération basale de GnRH mais celle stimulée par deux facteurs, la dopamine ou la norépinephrine (Rettori et al., 1990). Cette observation a été retrouvée dans une autre étude, dans laquelle le traitement *in vivo* par gavage de rats avec 0,5 mg/kg de $\Delta 9$ -THC, de CBD ou de CBN entraîne l'inhibition de l'activité des neurones sécrétant la norépinephrine, facteur régulateur de l'activité des neurones à GnRH (Murphy et al., 1990).

De plus, au contraire de l'étude citée plus haut (Wenger et al., 1987a), des groupes ont trouvé qu'une exposition au cannabis peut entraîner une diminution de la sensibilité des cellules hypophysaires à la GnRH, conduisant à une diminution de la sécrétion de la LH. Ainsi, dans une étude menée chez la souris, l'exposition quotidienne *in vivo* par gavage à 3 ou 6 mg/kg de cannabis pendant 36 jours consécutifs a entraîné de manière dose-dépendante la diminution de l'expression du récepteur à la GnRH dans l'hypophyse, suggérant une diminution de la sensibilité des cellules hypophysaires gonadotropes à répondre à une stimulation de la GnRH (Banerjee et al., 2011b). De même, 10 hommes consommateurs de cannabis définis comme « chroniques » (consommant depuis 12,8 mois en moyenne) ont présenté une réduction de la concentration plasmatique de LH basale et stimulée par l'administration intraveineuse de GnRH, comparé à 10 hommes non-consommateurs (Vescovi et al., 1992a), suggérant une altération de la capacité de réponse des cellules hypophysaires à la GnRH. Néanmoins, l'altération de la libération de la GnRH par l'hypothalamus et l'altération de la sensibilité à la GnRH de l'hypophyse suite à une exposition au $\Delta 9$ -THC ne sont pas observées dans toutes les études (Dalterio et al., 1987).

Espèce	Traitement	Effets	Référence
Souris	Extrait de cannabis chez des souris castrées	Nature anti-androgénique du composé suggérée	(Dixit and Lohiya, 1975)
Souris	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 0,25, 2,5, ou 25 µg/ml de Δ9-THC	Diminution de la testostérone dans le milieu de culture 4 heures après le traitement	(Dalterio et al., 1977)
Souris	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 25 µg/ml de Δ9-THC	Diminution de la testostérone dans le milieu de culture après incubation avec de l'hCG	(Dalterio et al., 1978)
	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 25 µg/ml de CBN	Diminution de la testostérone dans le milieu de culture après incubation avec ou sans hCG	
	50 ou 100 mg/kg de Δ9-THC par po	Diminution de la [T]p	
Souris	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 2,5 ng/ml de CBD	Augmentation de la testostérone dans le milieu de culture	(Dalterio et al., 1983)
	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 2,5 ng/ml de Δ9-THC	Augmentation de la testostérone dans le milieu de culture	
	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 250 ng/ml de CBN	Augmentation de la testostérone dans le milieu de culture	
	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 250 ng/ml de Δ9-THC	Diminution de la testostérone dans le milieu de culture	
	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 2500 ng/ml de CBN ou de CBD	Diminution de la testostérone dans le milieu de culture	
	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 25 000 ng/ml de Δ9-THC, de CBN ou de CBD	Diminution de la testostérone dans le milieu de culture	
	Administration intratesticulaire <i>in vivo</i> de 0,25 µg/ml de Δ9-THC	Diminution de la [T]t avec ou sans pré-traitement avec de l'hCG 1 heure après traitement	
	Administration intratesticulaire <i>in vivo</i> de 0,25 µg/ml de CBN	Diminution de la [T]t sans pré-traitement avec de l'hCG	
	Administration intratesticulaire <i>in vivo</i> de 2,5 µg/ml de Δ9-THC	Augmentation de la [T]t avec ou sans pré-traitement avec de l'hCG 1 heure après traitement	
	Administration intratesticulaire <i>in vivo</i> de 2,5 µg/ml de CBD	Augmentation de la [T]t sans pré-traitement avec de l'hCG	

Table 5 : Effets néfastes d'une exposition au cannabis ou à des phytocannabinoïdes sur la sécrétion de testostérone chez des modèles animaux et chez l'homme.

Ce tableau résume les résultats obtenus d'études ayant observé des modifications significatives *in vivo* et *in vitro* sur la sécrétion de testostérone après une exposition au cannabis, au Δ9-THC, au Δ8-THC, au 11-OH-Δ9-THC, au 11-OH-Δ9-THC, au CBD, au CBC, au CBG, ou au CBN chez des animaux mâles adultes et chez l'homme. Ip pour injection intrapéritonéale, po pour gavage, D pour jour, T pour testostérone, [T]p pour testostérone plasmatique, [T]t pour testostérone testiculaire, et vs pour versus.

D'autres études investiguant l'impact du cannabis et de certains phytocannabinoïdes sur les sécrétions hormonales de l'axe HHT sont encore nécessaires chez l'homme et les animaux modèles.

a) L'altération de la sécrétion de testostérone

Comme il a été vu dans le paragraphe précédent, l'exposition au cannabis peut entraîner une diminution de la sécrétion de GnRH et de LH, ce qui en conséquence peut induire une diminution de la synthèse et de la libération de la testostérone par les cellules de Leydig. De plus, il a été décrit chez l'homme et les espèces modèles que ces cellules possèdent des récepteurs aux cannabinoïdes, suggérant que les phytocannabinoïdes pourraient également avoir une action directe sur ces cellules.

Les résultats obtenus dans des études ayant observé des effets significatifs d'un traitement au cannabis ou à différents phytocannabinoïdes sur la libération de testostérone *in vitro* et *in vivo* chez les animaux modèles et l'homme sont résumés dans la **Table 5**.

(1) Chez les modèles animaux

Dès les années 1970-1980, il avait été observé un effet anti-androgénique d'une exposition au cannabis *in vivo* et *in vitro* chez le chien (Dixit et al., 1977), la souris (Dixit and Lohiya, 1975; Dalterio et al., 1977, 1978, 1983, 1987) et le rat (List et al., 1977; Maskarinec et al., 1978; Harclerode et al., 1978; Jakubovic et al., 1979; Rosenkrantz and Esber, 1980; Steger et al., 1990).

Ainsi, l'exposition quotidienne *in vivo* par gavage de souris à 3 ou 6 mg/kg de cannabis pendant 36 jours consécutifs (Banerjee et al., 2011b) et le traitement *in vivo* chronique (7 mois) quotidien de singes par l'ingestion de cookies avec des doses croissantes de Δ^9 -THC (Hedges et al., 2022) entraînent une diminution de la testostérone circulante, de manière dose-dépendante chez les deux espèces. De même, l'injection intra-péritonéale chronique de doses faibles d'extrait de cannabis (2 mg) pendant 20 ou 30 jours chez la souris *in vivo* entraîne la diminution significative des concentrations plasmatiques de testostérone

	Administration intratesticulaire <i>in vivo</i> de 250 µg/ml de CBC	Augmentation de la [T]t sans pré-traitement avec de l'hCG	
Souris	Addition de 250 ng/mg de Δ9-THC dans le milieu de culture de testicules perfusés <i>in vitro</i>	Suppression de la sécrétion de testostérone stimulée par l'hCG 30 minutes après le traitement	(Dalterio et al., 1987)
	Addition de 25 ng/mg de Δ9-THC dans le milieu de culture de testicules perfusés <i>in vitro</i>	Suppression de la sécrétion de testostérone stimulée par l'hCG 30 minutes après	
Souris	2 mg d'extrait de cannabis pendant 20 jours ou 30 jours par ip	Diminution de la [T]p	(Mandal and Das, 2010)
Souris	3 ou 6 mg/kg/jour d'extrait de cannabis pendant 36 jours par po	Diminution de la [T]p et diminution de l'activité de l'enzyme 3β-HSD dose-dépendante	(Banerjee et al., 2011a)
	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 1,5 mg/mg ou 3 mg/ml d'extrait de cannabis	Diminution de l'activité des enzymes 3β-HSD	
	Traitement <i>in vitro</i> de testicules avec 1,5 mg/mg ou 3 mg/ml d'extrait de cannabis	Diminution de l'expression testiculaire du récepteur à la LH	
Souris	30 mg/kg de CBD pendant 34 jours par po	Diminution de la [T]p	(Carvalho et al., 2018b)
Rat	10 mg/kg de Δ9-THC ou de CBD par ip	Diminution de la formation de testostérone dans les microsomes testiculaires	(List et al., 1977)
Rat	50 mg/kg/jour de Δ9-THC pendant 7 jours par po	Diminution de la [T]p	(Maskarinec et al., 1978)
Rat	10 mg/kg de Δ9-THC ou de CBD par ip	Diminution de la formation de testostérone dans les microsomes testiculaires	(Harclerode et al., 1978)
	2 mg/kg/jour de Δ9-THC pendant 10 jours par ip	Diminution de la formation de testostérone	
		Diminution de la quantité d'enzyme CYP450 dans les microsomes testiculaires. Effet reversé par le traitement des rats avec de la LH et de la FSH	
Rat	Exposition de cellules de Leydig <i>in vitro</i> avec 0,05 µg/ml (0.15 µM) de 11-OH-Δ9-THC ou 8β-OH-Δ9-THC	Diminution de la production de testostérone stimulée par l'hCG	(Jakubovic et al., 1979)
	Exposition de cellules de Leydig <i>in vitro</i> avec 1,5 µM de CBN, CBD ou CBG		
	Exposition de cellules de Leydig <i>in vitro</i> avec 15 µM de Δ9-THC ou Δ8-THC		
	Exposition de cellules de Leydig <i>in vitro</i> avec 15 µM de 11-OH-Δ9-THC, 8β-OH-Δ9-THC, CBN ou Δ9-THC	Diminution de la synthèse protéique	

(Mandal and Das, 2010). Dans la même étude, les souris traitées pendant 40 jours consécutifs ainsi que des souris traitées pendant 40 jours puis observées après une période de 45 jours ont vu dans les deux groupes leur testostérone plasmatique ré-augmenter, en parallèle de celles de LH et de FSH évoquées plus haut, suggérant une adaptabilité et une réversibilité des effets du cannabis sur ces paramètres.

Toujours chez la souris, une étude a récemment observé qu'un traitement oral *in vivo* de 30 mg/kg de CBD pendant 34 jours consécutifs entraîne une inhibition de 76% de la testostérone circulante, cette dernière se situant toujours dans les limites de la normalité (Carvalho et al., 2018a).

Dans une étude de 1978, le traitement oral *in vivo* de souris avec une dose unique de 50 mg/kg de Δ^9 -THC entraîne une diminution drastique de la testostérone plasmatique, de façon concomitante à la diminution de la LH plasmatique, conduisant les auteurs à suggérer qu'une partie des effets des phytocannabinoïdes sur l'axe HHT a lieu au niveau central (Dalterio et al., 1978). En outre, chez le rat, le traitement aigu *in vivo* avec 10 mg/kg de Δ^9 -THC ou de CBD et le traitement chronique *in vivo* avec 2 mg/kg de Δ^9 -THC, mais pas de CBD, induit la diminution de la biosynthèse de testostérone dans les microsomes testiculaires via une diminution jusqu'à 60% de l'expression des enzymes CYP450 (List et al., 1977). Deux années plus tard, le même groupe observe que chez ces rats traités avec la même dose de Δ^9 -THC *in vivo*, un traitement avec des gonadotropines restaurent les niveaux des enzymes CYP450, suggérant que la diminution de la production de testostérone passe en partie par une perturbation de la sécrétion hypophysaire des gonadotropines (Harclerode et al., 1978).

Plusieurs études ont également investigué les effets locaux testiculaires des phytocannabinoïdes sur la sécrétion de testostérone. Ainsi, une étude chez la souris a montré que le traitement *in vitro* de testicule avec 25 $\mu\text{g/ml}$ de Δ^9 -THC entraîne une diminution significative de la sécrétion de testostérone stimulée par 12,5 mIU/ml d'hCG dans le milieu (Dalterio et al., 1978). Une diminution de la sécrétion de testostérone stimulée ou non par l'hCG est également observée quand les testicules sont incubés avec du CBN. Les auteurs concluent de ces résultats que les phytocannabinoïdes jouent également un rôle direct au niveau gonadique. Ils proposent également que le Δ^9 -THC altère la capacité de cellules de Leydig à répondre à une stimulation de l'hCG.

Rat	2 ou 4 mg/kg de Δ9-THC pendant 14 jours par inhalation	Diminution de la [T]p	(Rosenkrantz and Esber, 1980)
	10 de Δ9-THC pendant 14 jours par po		
Singe	300 mg/kg de CBD pendant 90 jours par po	Diminution de la [T]p Augmentation de la [T]p 30 jours après l'arrêt du traitement	
Rat	2 ou 4 mg/kg de Δ9-THC pendant 14 jours par inhalation	Diminution de la [T]p	(Rosenkrantz and Esber, 1980)
	10 de Δ9-THC pendant 14 jours par po		
Singe	300 mg/kg de CBD pendant 90 jours par po	Diminution de la [T]p Augmentation de la [T]p 30 jours après l'arrêt du traitement	
Rat	15 mg/kg d'extrait de cannabis pendant 77 jours ou de 5 mg/kg de Δ9-THC pendant 74 jours	Augmentation de la [T]p	(Morrell et al., 1983)
Rat	0,1 ou 1 mg/kg de Δ9-THC	Diminution de la [T]p 1 heure après le traitement	(Steger et al., 1990)
	10 mg/kg de Δ9-THC ou de CBN	Diminution de la [T]p 1 heure après le traitement	
Rat	Traitement de microsomes testiculaires avec 50 μM de Δ9-THC ou CBN	Diminution de l'activité de l'enzyme <i>progesterone 17α-hydroxylase</i>	(Funahashi et al., 2005)
	Traitement de microsomes testiculaires avec 100 μM de Δ9-THC ou CBN		
Rat	Traitement de microsomes hépatiques avec 10-1000 μM de Δ9-THC, CBD ou CBN	Diminution de l'activité des enzymes <i>testosterone 6β- et 16α hydroxylase</i>	(Watanabe et al., 2005)
Singe	0,07 mg/kg/jour de D1 à D70, 0,14 mg/kg/jour de D71 à D140 et 0,36 mg/kg/jour de D141 à D210 de Δ9-THC par ingestion d'un cookie	Diminution de la [T]p	(Hedges et al., 2022)
20 hommes consommateurs de cannabis (≥ 4 jours/semaines)	vs 20 hommes n'ayant jamais consommé	Diminution de la [T]p dose-dépendante	(Kolodny et al., 1974a)
20 hommes consommateurs de cannabis « modérés » à « fréquents » (≥ 3 fois/semaine)	Consommation d'un joint	Diminution de la [T]p 2 et 3 heures après la consommation Diminution de la [T]p basale	(Cohen, 1976)
532 hommes consommateurs de cannabis	vs 651 hommes non consommateurs	Augmentation de la [T]p	(Gundersen et al., 2015)

De plus, le traitement *in vitro* de testicules murins avec 250 ng/ml de Δ^9 -THC a entraîné une inhibition totale de la sécrétion de testostérone stimulée par l'hCG en 30 minutes alors que 60 minutes sont nécessaires pour observer le même effet avec une dose de 25 ng/ml, démontrant un effet-dose (Dalterio et al., 1987). Chez le rat, le traitement de cellules de Leydig *in vitro* avec du CBN (dès 1,5 μ M), du CBD (dès 1,5 μ M), du CBG (dès 1,5 μ M), du Δ^9 -THC (à partir de 15 μ M) et deux de ses métabolites le 11-OH- Δ^9 -THC (dès 0,15 μ M) et le 8 β -OH- Δ^9 -THC (dès 0,15 μ M) inhibent la biosynthèse de testostérone stimulée par l'hCG de manière dose-dépendante ainsi que la synthèse protéique (Jakubovic et al., 1979). Chez la même espèce, le traitement *in vitro* aigu de microsomes testiculaires avec 50 μ M de Δ^9 -THC et 100 μ M de CBD inhibe l'activité enzymatique de la *progesterone 17 α -hydroxylase*, qui catalyse une des premières étapes de la stéroïdogénèse (Funahashi et al., 2005). Une étude *in vivo* chez des souris exposées quotidiennement à 3 ou 6 mg/kg de cannabis pendant 36 jours consécutifs dans laquelle il avait été observé une diminution de la testostérone circulante, a montré une diminution de l'activité de l'enzyme 3 β -HSD, qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse de testostérone, et ce de manière dose-dépendante (Banerjee et al., 2011b). Dans la même étude, le traitement *in vitro* des testicules avec 1,5 mg/ml ou 3 mg/ml de cannabis a entraîné de manière dose-dépendante une diminution de l'expression du récepteur à la LH dans le tissu.

A l'inverse, des études *in vivo* et *in vitro* dans plusieurs espèces modèles n'ont pas observé d'effets inhibiteurs de la sécrétion de testostérone suite à une exposition au CBD, au Δ^9 -THC ou au CBN (Rosenkrantz and Esber, 1980; Dalterio et al., 1982; Steger et al., 1990) voir même un effet stimulateur de la sécrétion de testostérone après une exposition au cannabis, au Δ^9 -THC ou au CBD (Dalterio et al., 1983; Morrill et al., 1983).

(1) Chez l'homme

Les données existantes chez l'homme sur l'impact du cannabis sur la sécrétion de testostérone présentent une grande variabilité.

Ainsi, une diminution significative de la testostérone plasmatique, de façon dose-dépendante, a également été observée chez des hommes consommant au moins 4 joints par

963 hommes ayant déjà consommé du cannabis	vs 614 hommes n'ayant jamais consommé de cannabis	Augmentation de la [T]p chez les consommateurs de cannabis, de manière dose-dépendante à la récurrence de la dernière consommation	(J. E. Thistle et al., 2017)
3027 hommes ayant déjà consommé du cannabis	vs 2119 hommes n'ayant jamais consommé de cannabis	Augmentation de la [T]p chez les consommateurs de cannabis, de manière dose-dépendante à la fréquence de consommation	(Fantus et al., 2020)

semaine depuis plus de 6 mois comparé aux non-consommateurs (Kolodny et al., 1974a). Dans cette étude, l'arrêt de la consommation de cannabis a entraîné une ré-augmentation de la sécrétion de testostérone. Dans une autre étude, la consommation d'un joint chez 20 hommes consommateurs de cannabis décrits comme « modérés » à « fréquents » (consommant plus de 3 joints par semaine) pendant 64 jours a entraîné la diminution significative de la sécrétion de testostérone 3 heures après la consommation (Cohen, 1976). Les niveaux basaux de testostérone ont aussi diminué de façon temporaire chez ces hommes.

Ces observations ne sont pas retrouvées dans toute la littérature. Ainsi, dans plusieurs études, une exposition aiguë ou chronique au cannabis n'est pas associée avec une diminution significative de la testostérone plasmatique (Jack H. Mendelson et al., 1974; Cushman, 1975a; Schaeffer et al., 1975; Mendelson et al., 1978; Cone et al., 1986; Dax et al., 1989; Friedrich et al., 1990; Block et al., 1991; Lisano et al., 2019).

Au contraire, il a même été observé dans une étude danoise que les consommateurs de cannabis présentaient un taux plus élevé (7%) de testostérone plasmatique comparé aux individus témoins (Gundersen et al., 2015). Les auteurs ont cependant émis des réserves sur l'interprétation de ce résultat, cet effet pouvant être causé par le tabac contenu dans les joints consommés. Dans une autre étude, la concentration de testostérone plasmatique a été inversement corrélée au dernier usage régulier de cannabis (J. E. Thistle et al., 2017). Les hommes de cette étude dont la consommation de cannabis était la plus récente présentaient ainsi une concentration de testostérone plasmatique plus haute (avec une augmentation de la force de l'association dans la tranche d'âge 18-29 ans). De plus, il a mis en évidence dans une étude récente conduite sur 5146 hommes que les niveaux de testostérone chez les hommes ayant déjà consommé du cannabis étaient significativement légèrement plus hauts que ceux n'en ayant jamais consommé, quelle que soit la fréquence de la consommation (Fantus et al., 2020). Dans cette étude, parmi les hommes ayant déjà consommé du cannabis, les consommateurs dits « réguliers » (2 à 3 fois par mois) ont présenté la plus grande augmentation de la testostérone plasmatique par rapport aux non-consommateurs. Si l'étude n'est pas sans limites comme discuté par les auteurs (potentiels facteurs confondants additionnels pouvant agir sur la sécrétion de testostérone, consommation de cannabis basée sur un auto-rapport ce qui diminue l'exactitude et la précision des informations rapportées), ils émettent néanmoins plusieurs hypothèses pour

expliquer cette observation. L'exposition chronique à des phytocannabinoïdes chez les consommateurs de cannabis pourrait entraîner le développement d'une insensibilité du récepteur à la testostérone, entraînant l'augmentation des quantités de testostérone sécrétée pour qu'elle agisse sur ses tissus cibles. Il a également été avancé dans cette étude que l'usage de cannabis soit plus fréquent chez les personnes ayant naturellement plus de testostérone dans le sang. Une étude chez le rat a noté l'inhibition de l'activité d'une enzyme de métabolisation de la testostérone dans des microsomes hépatiques après un traitement *in vitro* avec différentes concentrations de $\Delta 9$ -THC, de CBD ou de CBN, pouvant également expliquer l'augmentation plasmatique de testostérone observée chez l'homme et les animaux (Watanabe et al., 2005).

Les études sur les modèles animaux ont permis de montrer un effet inhibiteur d'une exposition aux phytocannabinoïdes sur la sécrétion de testostérone, à la fois dû à une action centrale via la diminution de la sécrétion de LH mais également gonadique, les phytocannabinoïdes étant capables à ce niveau d'inhiber directement la biosynthèse des androgènes ainsi que la capacité de la cellule de Leydig à répondre à la LH. Cependant, chez l'homme, les données actuelles ne permettent pour l'instant pas de conclure avec certitude d'un effet anti-androgénique de la consommation de cannabis. Une méta-analyse récente a ainsi conclu à une absence globale d'effet du cannabis sur la testostérone plasmatique (Belladelli et al., 2021a).

2. La diminution de la qualité spermatique

Comme il a été vu au cours du chapitre II, le système des ECB est impliqué dans la régulation d'étapes clés de la spermatogenèse et de la physiologie des spermatozoïdes. Une perturbation de la signalisation des endocannabinoïdes par une exposition à des ligands exogènes comme les phytocannabinoïdes peut avoir des effets drastiques sur la production de spermatozoïdes capables de féconder l'ovocyte.

Espèce	Traitement	Effets	Référence
Souris	2 mg/jour d'extrait de cannabis pendant 25 jours ou 45 jours par ip	Diminution du poids testiculaire, altérations histologiques des tubes séminifères, diminution du nombre de spermatogonies, arrêt complet de la spermatogenèse	(Dixit et al., 1974)
Souris	2 mg/kg/jour de $\Delta 9$ -THC pendant 10 jours par ip	Diminution du poids testiculaire	(Harclerode et al., 1978)
Souris	5 ou 10 mg/kg/jour de $\Delta 9$ -THC et 10 ou 25 mg/kg/jour de CBN pendant 5 jours par ip	Altération de la morphologie spermatique 35 jours après le traitement	(Zimmerman et al., 1978)
Souris	2 mg/jour pendant 20 ou 30 jours par ip	Diminution du poids testiculaire, réduction du nombre de spermatogonies, altérations histologiques des tubules séminifères, arrêt complet de la spermatogenèse	(Mandal and Das, 2010)
Souris	3 ou 6 mg/kg/jour d'extrait de cannabis pendant 36 jours par po	Altération histologique des tubules séminifères, diminution du compte spermatique et de la motilité dose-dépendante	(Banerjee et al., 2011a)
Souris	15 minutes de prétraitement <i>in vitro</i> de spermatozoïdes avec 1 ou 10 μ M de $\Delta 9$ -THC	Diminution de la motilité spermatique dose-dépendante	(D. J. Morgan et al., 2012)
Souris	15 ou 30 mg/kg/jour de CBD pendant 34 jours	Altération histologiques des tubes séminifères, diminution du compte spermatique et anomalies morphologiques des spermatozoïdes, altération du nombre de cellules de Sertoli	(Carvalho et al., 2018b)

Table 6 : Effets néfastes d'une exposition au cannabis ou à des phytocannabinoïdes sur la physiologie testiculaire et les paramètres spermatiques chez des modèles animaux et chez l'homme.

Ce tableau résume les résultats obtenus d'études ayant observé des modifications significatives *in vivo* et *in vitro* sur la physiologie testiculaire ou les paramètres spermatiques après une exposition au cannabis (extrait ou marijuana), au $\Delta 9$ -THC, au CBD ou au CBN chez des animaux mâles adultes et chez l'homme. Ip pour injection intrapéritonéale, po pour gavage, iv pour injection intraveineuse, D pour jour, vs pour versus.

Dans cette prochaine partie seront énumérées les données existantes d'une exposition au cannabis sur plusieurs paramètres spermatiques :

- le compte total/la concentration spermatique, dont l'altération peut conduire à une pathologie appelée oligozoospermie,
- la morphologie spermatique, dont l'altération peut conduire à une pathologie appelée tératozoospermie,
- la motilité spermatique, dont l'altération peut conduire à une pathologie appelée asthénozoospermie.

a) L'altération du compte/de la concentration spermatique

Des études ont rapporté que l'exposition à plusieurs phytocannabinoïdes entraîne des altérations physiologiques du tissu testiculaire, en lien avec la spermatogenèse.

Les résultats obtenus dans des études ayant observé des effets significatifs d'un traitement au cannabis ou à différents phytocannabinoïdes sur l'histologie testiculaire, la spermatogenèse ou les paramètres spermatiques sont résumés dans la **Table 6**.

(1) Physiologie testiculaire

Ainsi, dans la littérature, l'administration *in vivo* de cannabis a déjà été plusieurs fois associée avec une réduction de la taille ou du poids testiculaire et une dégénérescence des tubules séminifères chez la souris (Dixit et al., 1974), le rat (Thompson et al., 1973; Harclerode et al., 1978; Huang et al., 1979; Morrill et al., 1983) et le chien (Dixit et al., 1977). Plus récemment chez la souris, l'exposition quotidienne *in vivo* par gavage avec 3 ou 6 mg/kg de cannabis pendant 36 jours consécutifs a entraîné la diminution du poids des testicules et ce de manière dose-dépendante (diminution de 14% pour le traitement 3mg/kg et de 27% pour le traitement 6 mg/kg) (Banerjee et al., 2011b). Dans la même étude, des modifications histologiques du tissu testiculaire et une augmentation de l'apoptose dans le tissu ont été observées, également de manière dose-dépendante. Les auteurs ont souligné le fait que le

Souris	Exposition <i>in vitro</i> de cellules de Sertoli avec 12,5 µM de CBD	Diminution de la viabilité dose- et durée-dépendante, diminution de la prolifération, altération du cytosquelette	(Li et al., 2022)
Homme	Exposition <i>in vitro</i> de cellules de Sertoli avec 7 µM de CBD		
Rat	50 mg/kg/jour de Δ9-THC pendant 28 jours	Diminution du poids testiculaire et altérations histologiques des tubes séminifères	(Thompson et al., 1973)
Rat	2 mg/kg/jour de Δ9-THC pendant 10 jours par ip	Diminution du poids testiculaire	(Harclerode et al., 1978)
Rat	Fumée de marijuana contenant 0,25 % de Δ9-THC et 1,2% CBD ou fumée de marijuana avec 0,6% de CBD 5 jours/semaine pendant 17-25 jours	Altérations histologiques des tubes séminifères	(Rosenkrantz and Hayden, 1979)
Rat	Inhalation de fumée de marijuana pendant 75 jours	Altérations histologiques des tubes séminifères, diminution du nombre de cellules germinales, altération de la morphologie spermatique	(Huang et al., 1979)
Rat	25 mg/kg/jour de Δ9-THC pendant 64 jours par po	Diminution du poids testiculaire, du compte spermatique	(Morrill et al., 1983)
Rat	2 mg/kg/jour d'extrait de cannabis pendant 30 ou 40 jours par po	Diminution du poids testiculaire, du compte et de la motilité spermatique, altération de la morphologie spermatique	(Alagbonsi et al., 2016)
Chien	12.5 mg/kg/jour d'extrait de cannabis pendant 30 jours	Arrêt total de la spermatogenèse	(Dixit et al., 1977)
Singe	130 ou 260 mg/kg d'huile de cannabis contenant 11,6% de Δ9-THC pendant 5 jours par iv	Diminution du poids testiculaire et arrêt de la spermatogenèse	(Rosenkrantz et al., 1981)
	30 à 300 mg/kg/jour pendant 90 jours de CBD par po		
Singe	Incubation de spermatozoïdes <i>in vitro</i> avec 0.05 mM de Δ9-THC	Inhibition de la motilité spermatique de façon temps- et dose-dépendante	(Ernesto Perez et al., 1981)
Singe	0,07 mg/kg/jour de D1 à D70, 0,14 mg/kg/jour de D71 à D140 et 0,36 mg/kg/jour de D141 à D210 de Δ9-THC par ingestion d'un cookie	Diminution du poids testiculaire dose-dépendant	(Hedges et al., 2022)
9 hommes consommateurs de cannabis « fréquents » (≥10 fois/semaine)	vs 11 hommes consommateurs de cannabis « modérés » (entre 4 et 9 fois/semaine)	Diminution du compte spermatique	(Kolodny et al., 1974a)
16 hommes consommateurs chroniques de cannabis	Consommation de 8 joints/jour environ	Diminution de la concentration et de la motilité spermatique, altération de la morphologie spermatique	(Hembree et al., 1978)

cannabis entraîne des effets gonadiques directs sur la physiologie tubulaire, et pas seulement via une altération endocrine de l'axe HHT. Dans une étude chez la souris, des injections intra-péritonéales chroniques *in vivo* de doses faibles d'extrait de cannabis (2 mg) pendant 30 jours entraînent une diminution significative du poids testiculaire, une réduction du nombre de spermatogonies, des altérations tubulaires et un arrêt de la spermatogenèse (Mandal and Das, 2010). En revanche, les souris traitées pendant 40 jours consécutifs et les souris traitées pendant 40 jours consécutifs puis observées après une période de 45 jours ont vu ces paramètres s'améliorer, sans toutefois regagner des valeurs normales, suggérant des effets adaptatifs et réversibles partiels. Dans cette étude, les auteurs ont corrélé les perturbations testiculaires observées avec une altération du système antioxydant cellulaire. Ceci suggère que les effets négatifs d'une exposition au cannabis sur la physiologie testiculaire pourraient être dus à l'induction d'un stress oxydant dans le tissu. De même, une étude menée chez 55 rats a montré que l'administration de 2 mg/kg de cannabis pendant 40 jours altère leur capacité antioxydante totale (Alagbonsi et al., 2016). Chez le rat, l'exposition *in vivo* à des doses relativement faibles de CBD (1,2 mg/kg), 5 jours par semaine pendant 17 à 25 jours entraîne une diminution du poids testiculaire et une dégénération des tubes séminifères associée avec une inhibition de la spermatogenèse (Rosenkrantz and Hayden, 1979). Chez le singe, un traitement *in vivo* de 5 jours avec de 130 ou 260 mg/kg d'huile de cannabis contenant 11,6% de Δ^9 -THC par injection intraveineuse quotidienne pendant 5 jours avec 300 mg/kg de CBD par administration orale quotidienne pendant 90 jours a entraîné la diminution du poids testiculaire, des altérations des tubules séminifères et une diminution du nombre des cellules germinales (Rosenkrantz et al., 1981). De façon cohérente, il a été montré récemment dans la même espèce que le traitement *in vivo* chronique (7 mois) quotidien par l'ingestion de cookies avec des doses croissantes de Δ^9 -THC induit une diminution de la taille testiculaire dose-dépendante (Hedges et al., 2022).

Chez la souris, deux études s'intéressant aux effets chroniques d'une exposition au Δ^9 -THC n'ont pas observé d'altération de la fertilité et de la spermatogenèse (Berryman et al., 1992; López-Cardona et al., 2018).

Une étude chez l'homme a montré une diminution de la taille testiculaire chez des consommateurs fréquents de cannabis ou des consommateurs depuis l'adolescence (A A Ugboma et al., 2012).

10 hommes consommateurs de cannabis	vs 132 hommes non consommateurs	Meilleure motilité spermatique	(Close et al., 1990)
78 hommes	Exposition <i>in vitro</i> de spermatozoïdes avec 0,032, 0,32 ou 4,8 µM de Δ9-THC	Diminution de la motilité spermatique dose-dépendante	(Whan et al., 2006)
40 hommes souffrant de dysfonctions uro-génitales consommateurs de cannabis	vs 35 hommes souffrant de dysfonctions uro-génitales non consommateurs de cannabis	Diminution du poids testiculaire	(A A Ugboma et al., 2012)
36 hommes qui ont consommé du cannabis 3 mois avant la collecte du sperme	vs 279 hommes non consommateurs	Altération de la morphologie spermatique	(Pacey et al., 2014)
130 hommes consommateurs de cannabis « fréquents » (>1 fois/semaine)	vs 643 hommes n'ayant jamais consommé de cannabis	Diminution du compte/concentration spermatique et de la motilité, altération de la morphologie spermatique	(Gundersen et al., 2015)
12 consommateurs de cannabis fréquents	vs 12 hommes non consommateurs	Diminution du compte spermatique	(Murphy et al., 2018)
365 hommes hypofertiles ayant déjà consommé du cannabis	vs 297 hommes hypofertiles n'ayant jamais consommé de cannabis	Augmentation du compte/de la concentration spermatique, meilleure motilité spermatique	(Feiby L. Nassan et al., 2019)
229 hommes consommateurs de cannabis	Parmi eux, consommateurs récents ou en grande quantité	Diminution de la motilité spermatique et altération de la morphologie spermatique	(Carroll et al., 2020)
174 hommes ayant déjà consommé du cannabis	vs 235 hommes n'ayant jamais consommé de cannabis	Augmentation de la motilité spermatique et altération de la morphologie spermatique	(Hehemann et al., 2021)

A noter, si les effets des phytocannabinoïdes peuvent être directs sur les cellules germinales, ces dernières possédant certains récepteurs aux cannabinoïdes (en fonction de leur stade de différenciation spermatogénique), une partie des effets des phytocannabinoïdes peut également passer par les cellules de Sertoli. A noter, les investigations concernant ce paramètre ont majoritairement étudié les effets du CBD seul, et beaucoup moins ceux du Δ^9 -THC.

Ainsi, le traitement *in vivo* oral chronique de souris pendant 34 jours consécutifs avec 30 mg/kg de CBD entraîne une diminution du nombre de cellules de Sertoli dans les tubes séminifères (Carvalho et al., 2018a). Dans une autre étude, l'exposition *in vitro* de cellules de Sertoli murines et humaines à plusieurs doses de CBD se rapprochant des doses utilisées en thérapie pendant 24 ou 48 heures entraîne une diminution significative de leur viabilité de façon dose- et durée-dépendante, et ce dès 12,5 μ M chez la souris et dès 7 μ M chez l'humain (Li et al., 2022). Dans cette étude, il est décrit que les effets cytotoxiques observés du CBD sur les cellules de Sertoli passent par une inhibition de la prolifération, des changements d'expression génique et par l'induction d'altérations du cytosquelette. Dans cette même étude, les auteurs ont testé l'effet de deux métabolites du CBD et ont observé une cytotoxicité similaire entre le 7-OH-CBD et le CBD tandis que le 7-COOH-CBD était moins toxique que les deux autres. En revanche, dans une autre étude utilisant la culture *in vitro* de cellules de Sertoli humaines, le Δ^9 -THC et le CBD à diverses concentrations, jusqu'à 6,36 x10⁻⁷M, n'ont pas affecté l'activité des cellules de Sertoli (Holmes et al., 1983).

En conclusion, l'exposition du testicule à du cannabis est donc susceptible chez les espèces animales modèles mais aussi chez l'homme d'entraîner, de façon très variable, une altération de la physiologie testiculaire et de la spermatogenèse, via la diminution du nombre de cellules germinales ou des cellules de Sertoli, pouvant potentiellement conduire à une altération du compte total et de la concentration des spermatozoïdes.

(2) Chez les modèles animaux

Ainsi, chez le rat exposé à 16 inspirations de fumée de joint par jour *in vivo* pendant 75 jours à des niveaux comparables aux doses récréationnelles chez l'humain, une diminution de la concentration spermatique épидидymale a été observée (Huang et al., 1979). De même, le traitement quotidien oral *in vivo* chronique de rat avec 25 mg/kg de $\Delta 9$ -THC (ce qui correspond selon les auteurs à une forte dose chez l'humain) pendant 64 jours a été associé avec une diminution du compte spermatique épидидymal (Morrill et al., 1983). Chez la souris, l'exposition quotidienne *in vivo* par gavage à 3 ou 6 mg/kg de cannabis pendant 36 jours consécutifs a induit de manière dose-dépendante une diminution significative de la viabilité des spermatozoïdes, entraînant une diminution significative du compte spermatique (Banerjee et al., 2011b). Dans la même espèce, le traitement oral *in vivo* chronique avec 15 ou 30 mg/kg par jour de CBD a entraîné une diminution de 38% du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme (Carvalho et al., 2018a).

De plus, l'administration quotidienne *in vivo* de 2mg de cannabis pendant 45 jours conduit à un arrêt total de la spermatogenèse chez la souris (Dixit et al., 1974). Ces effets se sont cependant montrés réversibles. De même, le traitement de chiens avec 12,5 mg/kg de cannabis pendant 30 jours *in vivo* entraîne l'arrêt complet de la spermatogenèse (Dixit et al., 1977).

Au contraire, chez le singe, le traitement *in vivo* chronique (7 mois) quotidien par l'ingestion de cookies avec des doses croissantes de $\Delta 9$ -THC n'a pas été corrélé avec des effets sur le compte et la concentration spermatique, même à la dose testée la plus forte (2,5mg/7kg) (Hedges et al., 2022). De même, des souris traitées *in vivo* pendant 30 jours avec 10 mg/kg de $\Delta 9$ -THC par injection intrapéritonéale n'ont pas présenté d'altérations de la concentration spermatique (López-Cardona et al., 2018)

(3) Chez l'homme

Une étude a mis en évidence une oligospermie dose-dépendante chez des consommateurs chroniques de cannabis (Issidorides, 1979). De plus, dans une étude danoise, il a été observé une diminution de 29% du compte et de 28% de la concentration spermatique chez des hommes consommant du cannabis plus d'une fois par semaine,

comparé aux hommes n'en ayant jamais consommé (Gundersen et al., 2015). De même, une étude a observé une diminution de 40% du compte spermatique chez les consommateurs hebdomadaires comparé aux non consommateurs (Murphy et al., 2018). En outre, une autre étude a observé une diminution significative du compte spermatique des hommes qui consommaient du cannabis plus de 10 fois par semaine depuis plus de 6 mois comparé aux hommes en consommant de 5 à 9 fois, montrant un effet dose-réponse du cannabis sur ce paramètre (Kolodny et al., 1974a). Enfin, un groupe a observé que l'exposition chronique au cannabis (environ 8 joints par jour) pendant 1 mois entraîne chez des consommateurs fréquents de cannabis, une diminution du compte et de la concentration spermatique 1 semaine après la fin de l'exposition (Hembree et al., 1978). Les auteurs ont cependant noté que cet effet du cannabis était réversible.

Au contraire, certains groupes n'ont pas observé la relation entre la consommation de cannabis et une diminution du compte/de la concentration spermatique. Ainsi, dans une étude aux USA, des consommateurs de cannabis n'ont pas présenté d'altération du compte spermatique par rapport aux non-consommateurs (Close et al., 1990). Une étude conduite aux USA a même conclu que la consommation de cannabis dans l'échantillon étudié semblait avoir des effets protecteurs sur le compte et la concentration spermatique (Feiby L. Nassan et al., 2019).

Au niveau du testicule, la BHT limite l'accès de plusieurs molécules aux cellules germinales post-méiotiques. Il a cependant été montré dans une étude observationnelle chez 12 consommateurs chroniques de cannabis que les concentrations de $\Delta 9$ -THC retrouvées dans le liquide séminal étaient corrélées à celle retrouvées dans le sérum, montrant la capacité de cette molécule à traverser la barrière BHT (Lee et al., 2020). Dans une autre étude, un traceur radioactif du $\Delta 9$ -THC a été injecté de façon intramusculaire chez des rats afin de suivre son accumulation dans plusieurs tissus (Nahas et al., 2002). Les auteurs ont noté que les concentrations retrouvées dans le plasma étaient similaires à celles retrouvées lors d'une consommation récréationnelle chez l'homme. Les résultats de cette étude ont montré l'accumulation du $\Delta 9$ -THC dans le cerveau et le testicule, mais à de faibles doses comparées à la dose injectée, montrant la capacité de la BHT et de la barrière hémato-encéphalique à limiter l'accès du $\Delta 9$ -THC au testicule et au cerveau. Dans cette même étude,

les auteurs ont montré la forte accumulation du traceur dans la graisse épидидymale et testiculaire. En effet, les phytocannabinoïdes sont lipophiles et peuvent s'accumuler dans les membranes plasmiques ainsi que dans les tissus adipeux, d'où ils peuvent être relâchés progressivement.

b) Altération de la morphologie des spermatozoïdes

(1) Chez les modèles animaux

Chez la souris, l'exposition *in vitro* et *in vivo* à du cannabis entraîne l'augmentation de l'incidence des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Tilak and Zimmerman, 1984). Dans la même espèce, le traitement *in vivo* oral quotidien avec 15 mg/kg ou 30 mg/kg de CBD pendant 34 jours consécutifs a entraîné une augmentation des anomalies morphologiques spermatiques (Carvalho et al., 2018a). Dans une autre étude, l'injection intrapéritonéale de Δ^9 -THC (à 5 ou 10 mg/kg) ou de CBN (à 10 ou 25 mg/kg) pendant 5 jours consécutifs chez la souris *in vivo* a induit des anomalies de la morphologie des spermatozoïdes 35 jours après la fin du traitement (Zimmerman et al., 1978). Un résultat similaire a été observé *in vivo* chez le rat après l'exposition pendant 5 jours à de la fumée de joint de cannabis (Huang et al., 1979).

En revanche, chez le singe, le traitement *in vivo* chronique (7 mois) quotidien par l'ingestion de cookies avec des doses croissantes de Δ^9 -THC n'a pas entraîné d'altération de la morphologie même à la dose testée la plus forte (2,5mg/7kg) (Hedges et al., 2022).

(2) Chez l'homme

Une étude a observé que la consommation modérée de cannabis entraîne chez l'homme 3,4 fois plus de risques de présenter une morphologie anormale des spermatozoïdes (Carroll et al., 2020). Un autre groupe a montré que les jeunes hommes consommateurs de cannabis dans les 3 mois avant un prélèvement de sperme avaient plus de risque de présenter des défauts morphologiques des spermatozoïdes que les hommes non consommateurs (Pacey et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs ont noté que les hommes qui s'étaient abstenus de consommer du cannabis pendant les 6 jours avant le

prélèvement voyaient leur risque de tératozoospermie diminuer. Néanmoins, une autre étude a observé que, non seulement des consommateurs actuels, mais aussi anciens, avaient plus de risque de présenter des anomalies de la morphologie des spermatozoïdes (Hehemann et al., 2021).

Dans d'autres études en revanche, la consommation de cannabis n'a pas d'effet sur la morphologie des spermatozoïdes (Murphy et al., 2018; Belladelli et al., 2022a) voire même a un effet protecteur sur ce paramètre (Feiby L. Nassan et al., 2019).

Comme il a été précédemment évoqué dans le chapitre II, la signalisation des récepteurs aux cannabinoïdes, particulièrement celle de CB1, est impliquée dans le remodelage de la chromatine des spermatides et des spermatozoïdes, ce qui influence leur morphologie respective (Chioccarelli et al., 2010, 2020; Cacciola et al., 2013). Il a ainsi été proposé qu'une partie des effets néfastes des phytocannabinoïdes sur la morphologie des spermatozoïdes puisse passer par une altération du remodelage chromatinien. Des études ont proposé que l'altération de la morphologie spermatique ne soit pas liée à une dégradation du matériel génétique des spermatozoïdes chez les animaux (Generoso et al., 1985; Berryman et al., 1992) et chez l'homme (Feiby L. Nassan et al., 2019). A l'inverse, une étude récente conduite en France a rapporté que les spermatozoïdes d'hommes consommateurs de cannabis présentaient plus d'anomalités chromosomiques et de fragmentation de l'ADN (Verhaeghe et al., 2020).

c) Altération de la motilité des spermatozoïdes

(1) Chez les modèles animaux

Chez la souris, l'exposition quotidienne *in vivo* par gavage à 3 ou 6 mg/kg de cannabis pendant 36 jours consécutifs a entraîné une diminution significative de la motilité des spermatozoïdes de manière dose-dépendante (Banerjee et al., 2011b). De même, il a été observé que l'incubation de spermatozoïdes de singes et de lapins *in vitro* avec 0,05 mM de Δ^9 -THC entraîne une inhibition de leur motilité de 30% après 3 heures d'incubation et de 60% après 6 heures d'incubation (Ernesto Perez et al., 1981). Dans cette même étude,

l'incubation des spermatozoïdes de ces espèces avec 0,1 mM et 0,2 mM de Δ 9-THC entraîne une inhibition totale de la motilité spermatique en 3 à 5 heures. Dans une autre étude, le pré-traitement de spermatozoïdes murins *in vitro* avec 1 μ M de Δ 9-THC pendant 15 minutes induit une baisse significative de leur motilité basale ou stimulée par un activateur (D. J. Morgan et al., 2012). Dans cette étude, il a été observé que l'administration *in vivo* de 50 mg/kg de Δ 9-THC à des souris mâles juste avant l'accouplement entraîne une diminution de 20% de la taille des portées, un effet suggéré comme étant dû en partie à la diminution de la proportion de spermatozoïdes motiles.

En revanche, chez le singe, le traitement *in vivo* chronique (7 mois) quotidien par l'ingestion de cookies avec des doses croissantes de Δ 9-THC n'a pas été corrélée à des effets sur la motilité même à la dose testée la plus forte (2,5mg/7kg) (Hedges et al., 2022). De même, des souris traitées *in vivo* pendant 30 jours avec 10 mg/kg de Δ 9-THC par injection intrapéritonéale n'ont pas présenté d'altérations de la motilité spermatique (López-Cardona et al., 2018).

(2) Chez l'homme

Dans une étude, il a été observé que l'incubation de spermatozoïdes humains *in vitro* avec 0,05 mM de Δ 9-THC entraîne une inhibition de leur motilité de 30% après 3 heures d'incubation et de 60% après 6 heures d'incubation (Ernesto Perez et al., 1981). Dans cette même étude, l'incubation des spermatozoïdes avec 0,1 mM et 0,2 mM de Δ 9-THC entraîne une inhibition totale de la motilité spermatique en 3 à 5 heures. Dans une autre étude utilisant des doses plus caractéristiques d'une exposition humaine, il a été montré que l'incubation *in vitro* de spermatozoïdes humains à des doses de de Δ 9-THC thérapeutiques (0,032 μ M) ou récréationnelles (0,32 μ M et 4,8 μ M) pendant 3 heures entraîne une diminution de leur vitesse moyenne pour tous les traitements (Whan et al., 2006). De plus, dans la même étude l'exposition des spermatozoïdes à 4,8 μ M de Δ 9-THC induit une diminution de 28% de leur motilité. Les auteurs ont également noté un effet inhibiteur du Δ 9-THC sur la réaction acrosomique spontanée et induite. De façon cohérente, une étude observationnelle a trouvé que l'usage récent ou à haute dose de cannabis entraîne une hausse de 2,6 et 4,3 respectivement de risques de présenter une motilité spermatique anormale (Carroll et al., 2020). De même, une autre étude a observé que chez la

consommation d'une forte dose de cannabis (8-20 joints par jour) est associée avec la diminution de la motilité spermatique (Hembree et al., 1978). Néanmoins dans cette étude, l'arrêt de la consommation est corrélé avec une amélioration de ce paramètre.

Au contraire, des études observationnelles chez l'homme ont noté un effet neutre (Murphy et al., 2018; Belladelli et al., 2022a), voir protecteur (Close et al., 1990; Feiby L. Nassan et al., 2019; Hehemann et al., 2021) de la consommation de cannabis sur la motilité des spermatozoïdes.

Comme décrit dans le chapitre II, le système des ECB est impliqué dans l'acquisition et la régulation de la motilité des spermatozoïdes. Les études ci-dessus ont montré qu'une exposition à des phytocannabinoïdes peut perturber ces processus.

Une partie des effets inhibiteurs des phytocannabinoïdes sur la motilité spermatique semble passer par une inhibition du métabolisme énergétique des spermatozoïdes, ce dernier étant basé sur la phosphorylation oxydative et la glycolyse (S. du Plessis et al., 2015). Il a ainsi été montré que le Δ^9 -THC peut inhiber la respiration mitochondriale des spermatozoïdes humains *in vitro* (Badawy et al., 2009) et entraîner une baisse de leurs niveaux d'ATP chez la souris (D. J. Morgan et al., 2012). De même, il a été montré que le Δ^9 -THC peut inhiber *in vitro* le métabolisme du glucose et du fructose dans le testicule de rat et de souris (Husain, 1989) et inhiber *in vitro* la consommation de fructose des spermatozoïdes humains, simiens et de lapins (Ernesto Perez et al., 1981).

L'effet négatif des phytocannabinoïdes sur la motilité spermatique pourrait passer en partie par le récepteur CB1, l'activation de ce dernier constituant un signal inhibiteur de la motilité des spermatozoïdes chez le rongeur *in vivo* (Cobellis et al., 2010; S. E. Lewis et al., 2012) et chez l'homme *in vitro* (Rossato et al., 2005; Barbonetti et al., 2010). Un groupe a cependant décrit l'existence d'un mécanisme CB1-indépendant de l'inhibition du Δ^9 -THC sur la motilité des spermatozoïdes murins *in vitro* (D. J. Morgan et al., 2012). Il pourrait s'agir de l'activation de CB2, comme il a été proposé dans une étude *in vitro* sur des spermatozoïdes humains (Agirregoitia et al., 2010).

L'ensemble des atteintes spermatiques décrites dans les paragraphes précédents après une exposition d'animaux modèles ou de l'homme à des composés du cannabis, laissent présager d'effets néfastes sur leur descendance.

3. Les effets multigénérationnels

En effet, il a été montré chez des espèces modèles animales qu'une exposition parentale au cannabis avant la conception peut entraîner des effets néfastes sur plusieurs fonctions physiologiques des petits, dont la reproduction, sans qu'eux-mêmes n'y soient directement exposés pendant le développement. Dans une étude chez la souris, des mâles adultes *in vivo* exposés quotidiennement pendant 5 jours à 50 mg/kg de Δ 9-THC ou de CBN, ont présenté des anomalies chromosomiques et les petits issus de ces individus (la génération F1) ont souffert d'infertilité (Dalterio et al., 1982). Dans une autre étude, des rats (la génération F1) dont la mère avait été exposée *in vivo* quotidiennement à de la fumée de joint contenant 3,3 mg de Δ 9-THC pendant la gestation se sont eux-mêmes montrés moins fertiles et ont présenté des organes reproductifs plus petits. Les petits issus de l'accouplement de ces animaux (la génération F2) pesaient moins lourd et ont présenté des altérations du développement (Fried and Charlebois, 1979b).

La transmission de ses effets se ferait en partie par des modifications épigénétiques du génome des gamètes paternels (pour revue : Schrott and Murphy, 2020). Une étude a ainsi mis en évidence une différence de la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) dans les spermatozoïdes d'hommes consommateurs de cannabis et d'hommes non consommateurs (Murphy et al., 2018). Dans la même étude, l'exposition de rat *in vivo* à 2mg/kg de Δ 9-THC par gavage pendant 12 jours a également entraîné des altérations de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes comparé aux animaux témoins. De façon intéressante dans ces deux études chez l'homme et le rat, il a été mis en évidence une altération de la méthylation dans des sites associés à la cancérogenèse.

De façon cohérente, un effet marquant de la consommation de cannabis sur la fonction de reproduction chez l'homme est son association avec l'incidence du cancer

testiculaire et plus spécifiquement un cancer dû à des tumeurs testiculaires des cellules germinales (TGCT).

4. Augmentation de l'incidence du cancer testiculaire

Plusieurs études ont porté sur le lien entre la consommation de cannabis et le risque de développer des TGCT. Ainsi, une étude conduite aux USA sur 1348 hommes diagnostiqués avec des TGCT a mis en évidence que les hommes atteints de TGCT étaient plus susceptibles d'être des consommateurs actuels de cannabis comparé aux hommes non consommateurs (Daling et al., 2009). Il a été montré dans cette étude que l'âge de la première consommation parmi les usagers actuels (avant ou après 18 ans) et la fréquence de l'usage (quotidien ou hebdomadaire comparé à moins d'une fois par semaine) jouent également un rôle. Dans cette même étude, il a été ajouté que l'association entre la consommation de cannabis et la présence de TGCT est plus forte chez des hommes atteints de TGCT non-séminomateuses. Une autre étude américaine sur 455 hommes a montré que les hommes ayant déjà consommé du cannabis présentaient un risque deux fois plus élevé de développer des TGCT comparé aux hommes n'ayant jamais consommé (Lacson et al., 2012). Dans cette étude également il a été mis en évidence une association spécifique entre l'usage de cannabis et le développement de TGCT non séminomateuses. Une 3^{ème} étude conduite aux USA sur 335 hommes a observé que les patients atteints de TGCT étaient plus susceptibles d'être des consommateurs fréquents (au moins une fois par jour) de cannabis comparés aux hommes non-consommateurs (Trabert et al., 2011). Dans la même étude, les auteurs ont conclu que les patients atteints de TGCT non-séminomateuses étaient plus susceptibles d'être des consommateurs fréquents et depuis un certain temps (plus de 10 ans) par rapport aux individus témoins. Enfin, dans une étude suédoise conduite sur 343 hommes, il a été trouvé que la forte consommation de cannabis (plus de 50 fois en une vie) était associée avec une augmentation de l'incidence du cancer testiculaire (Callaghan et al., 2017).

Prenant en compte les études décrites ci-dessus et en tâchant de s'affranchir de certains facteurs confondants (comme la consommation de tabac, elle-même carcinogène), plusieurs méta-analyses ont conclu à un effet modeste mais significatif de la consommation

de cannabis sur l'incidence des TGCT, avec une plus forte association concernant les TGCT non séminomateuses (Gurney et al., 2015a; Ghasemiesfe et al., 2019a; Song et al., 2020a). Selon les méta-analyses, il a été souligné que l'usage de cannabis en général mais aussi la fréquence et la chronicité de la consommation sont impliqués dans le risque de développer des TGCT.

La corrélation entre l'usage de cannabis et le développement de TGCT non séminomateuses spécifiquement, n'est pour l'instant pas élucidée. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer cette observation. Une première hypothèse découle de l'observation que les TGCT non séminomateuses sont diagnostiquées près de 10 ans avant les TGCT séminomateuses (comme il a été vu dans le chapitre I). La période critique d'exposition au cannabis qui entrainerait l'apparition de TGCT pourrait donc se situer autour de la puberté (Gurney et al., 2015a). Cette hypothèse est appuyée par l'observation dans une des études citées que les hommes ayant commencé à consommer du cannabis avant 18 ans avaient plus de risque de développer des TGCT non séminomateuses comparé aux hommes dont la première consommation s'est déroulée après 18 ans (Daling et al., 2009). Une autre hypothèse avance que l'initiation précoce au cannabis pourrait être un marqueur d'une exposition durable et fréquente plus tard au cours de la vie. Enfin, les TGCT non séminomateuses se développant plus tôt que les TGCT séminomateuses, les hommes atteints de TGCT non séminomateuses inclus dans les études épidémiologiques citées plus haut seraient plus aptes à décrire de façon plus précise leur consommation de cannabis des dernières années.

Il est important de garder en tête que les méta-analyses citées précédemment (Gurney et al., 2015a; Ghasemiesfe et al., 2019a; Song et al., 2020a) sont basées sur quatre études, qui présentent différents biais et dont la majorité des données (trois sur quatre) ont été acquises dans les années 1990 aux USA. Des données supplémentaires sont donc encore nécessaires afin d'appuyer cette corrélation entre la consommation de cannabis et l'augmentation de l'incidence des TGCT.

De plus, si ces études apportent des données au niveau épidémiologique, les mécanismes moléculaires d'action du cannabis impliqués dans la carcinogenèse testiculaire ne sont pas encore compris (Barchi et al., 2019). Pour les équipes de recherche travaillant sur le sujet, il est probable que l'exposition à certains composants du cannabis perturbe l'axe HHT,

entraînant des perturbations endocrines et une altération de la régulation de la spermatogenèse, entraînant la carcinogenèse. Plusieurs types testiculaires exprimant les récepteurs aux cannabinoïdes, il est également possible que les composants du cannabis puissent se fixer directement au niveau du testicule, entraînant une altération des signaux régulateurs des cellules germinales et à terme une transformation cancéreuse.

5. L'altération de la fonction sexuelle

Enfin, une relation entre la consommation de cannabis et la fonction sexuelle chez les espèces modèles et chez l'homme a également été mise en évidence (pour revue : Shamloul and Bella, 2011). Ainsi, si certaines études ont observé que le cannabis peut augmenter la libido et le plaisir sexuel chez l'homme (Tart, 1970; Chopra and Jandu, 1976; Abel, 1981; Halikas et al., 1982; Chowdhury, 1987; Smith et al., 2010; Androvicova et al., 2017; Sun and Eisenberg, 2017; Wiebe and Just, 2019; Bhambhvani et al., 2020), sa consommation est également liée avec une réduction de la libido chez le rat (Murphy et al., 1994; Dhawan and Sharma, 2003), le singe (Gorzalka et al., 2010) et chez l'homme quand elle est chronique (Chowdhury, 1987) ou en grandes quantités (Abel, 1981). Des désordres orgasmiques (Smith et al., 2010) et une augmentation de l'incidence de la dysfonction érectile chez le rat (Murphy et al., 1994), le singe (Gorzalka et al., 2010) et l'homme (Johnson et al., 2004; Aversa et al., 2008; Elbendary et al., 2009; Smith et al., 2010; Mialon et al., 2012; pour revue : Pizzol et al., 2019), ont également été mis en exergue, potentiellement via le blocage du récepteur CB1 (Melis et al., 2006; Succu et al., 2006).

En résumé, la corrélation entre la consommation de cannabis chez l'homme adulte et l'apparition d'effets néfastes sur plusieurs paramètres de la fonction reproductive demeure encore incertaine. Les observations les plus significatives concernent le développement de TGCT. Si certaines études ont montré que la consommation de cannabis était liée avec l'altération de sécrétions hormonales de l'axe HHT et des paramètres spermatiques, d'autres n'ont pas mis en évidence ce lien. Les résultats observés sont parfois contradictoires entre

les études sur un même paramètre. Une récente méta-analyse a conclu à l'absence d'effets d'une consommation de cannabis sur la fonction testiculaire en générale (Belladelli et al., 2021a).

Il est important de noter qu'une partie de ces études sur l'homme sont conduites sur un petit nombre de patients, dont la consommation de cannabis est souvent auto-estimée. Les études conduites sur des régions différentes du monde, peuvent également amener de la variabilité notamment au niveau du style de vie des hommes étudiés et de leurs différentes expositions environnementales. De plus, le délai depuis la dernière consommation, la chronicité de la consommation, l'âge auquel la consommation a démarré, les concentrations des différents phytocannabinoïdes ingérées, le type de consommation (récréationnelle ou thérapeutique) et les méthodes de consommation participent à la très large variabilité des résultats observés entre les études. De nouvelles études *in vivo* et *in vitro* utilisant différents modèles sont encore nécessaires pour comprendre l'impact du cannabis sur la fonction de reproduction chez l'homme.

La plupart des études décrites plus haut ont étudiés l'effet du $\Delta 9$ -THC ou du cannabis entier sur la fonction de reproduction, et relativement peu se sont intéressées aux effets d'autres phytocannabinoïdes isolés. Parmi eux, le CBD est capable d'induire des effets néfastes sur plusieurs fonctions physiologiques dont la fonction reproductive (pour revue : Carvalho et al., 2019). Ainsi, comme il a été décrit dans les études citées plus haut, le CBD seul peut moduler les sécrétions endocrines et altérer le tissu testiculaire et les paramètres spermatiques. De plus, il est capable de moduler la pharmacocinétique du $\Delta 9$ -THC dans plusieurs modèles. Récemment mis sur le devant de la scène avec un engouement croissant de sa consommation récréationnelle et venté pour ses intérêts thérapeutiques, en association ou non avec le $\Delta 9$ -THC, l'étude de ses effets quand il est administré seul ou en co-administration avec du $\Delta 9$ -THC sur la fonction reproductive est essentielle.

Problématiques et objectifs

Mon travail de recherche comporte plusieurs problématiques et hypothèses de travail, testées via différentes stratégies expérimentales.

La consommation de cannabis a été corrélée chez l'homme avec l'augmentation des risques de développer des tumeurs testiculaires des cellules germinales (TGCT), sans que les mécanismes moléculaires sous-jacents ne soient élucidés. L'impact de cette consommation sur d'autres aspects reproductifs tels que les sécrétions hormonales de l'axe HHT et les paramètres spermatiques n'est pas encore clairement élucidé. Dans le contexte de l'augmentation mondiale de la consommation de cannabis, en raison notamment de la légalisation de son usage récréationnel et thérapeutique dans plusieurs pays, la compréhension de ses effets sur le testicule représente donc un enjeu majeur de santé publique au niveau international. Nous avons testé ici l'hypothèse **(1) qu'une exposition du testicule adulte humain aux deux principaux composants du cannabis, le (-)- Δ 9-trans-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) et le cannabidiol (CBD), également utilisés en thérapie, pourrait entraîner des altérations de la physiologie testiculaire.** La majorité des études existantes à ce jour décrivant des effets néfastes d'une exposition au cannabis sur la fonction reproductive chez l'homme utilisent la culture *in vitro* de différents types cellulaires testiculaires ou décrivent des observations épidémiologiques. Nous avons utilisé un modèle original de culture organotypique de testicule humain adulte, standardisé au sein de notre laboratoire, afin de modéliser les effets d'une consommation de cannabis. Ce modèle permet de discriminer les effets centraux des effets gonadiques du Δ 9-THC et du CBD sur la fonction testiculaire. Nous avons ainsi évalué l'impact de ces deux phytocannabinoïdes sur plusieurs paramètres testiculaires dont la fonction endocrine. Nous nous sommes également intéressés à l'impact de ces deux molécules sur la physiologie des cellules germinales, en lien potentiel avec le développement de TGCT.

L'exposition au cannabis étant capable d'induire l'apparition de cellules germinales cancéreuses dans le testicule adulte, et ces TGCT pouvant être la manifestation d'altérations cellulaires acquises au cours du développement embryonnaire, nous avons postulé **(2) qu'une exposition au cannabis du testicule humain au cours de la vie foetale peut perturber la physiologie testiculaire, en particulier la différenciation des cellules germinales.** Le Δ 9-THC et le CBD interagissent avec les récepteurs du système des endocannabinoïdes (ECB), composé de ligands endogènes et d'enzymes de synthèse et de

dégradation. Si le système des ECB a récemment été décrit dans le testicule humain adulte, il n'existe pas de données sur son expression dans le testicule humain fœtal. La description du système des ECB est nécessaire **(3) d'une part de comprendre ses implications potentielles dans la différenciation testiculaire et d'autre part d'expliquer les effets éventuels observés lors d'une exposition à des phytocannabinoïdes exogènes tels que le Δ 9-THC et le CBD.** Nous avons donc réalisé une cartographie du système des ECB dans le testicule humain fœtal au cours du premier trimestre de grossesse, période critique de l'établissement des fonctions testiculaires. Nous avons pour ceci interrogé des données transcriptomiques acquises dans notre équipe dans le cadre d'autres projets et mis en place différentes collaborations pour décrire le système au niveau protéique. Une fois les potentielles cibles cellulaires d'une exposition aux phytocannabinoïdes mieux appréhendées, nous avons évalué l'impact d'un traitement de Δ 9-THC et de CBD sur la physiologie testiculaire fœtale. Pour ceci, nous avons travaillé sur un modèle de culture organotypique de testicules humains fœtaux, standardisé au sein de notre équipe, et avons étudié les effets d'une exposition au Δ 9-THC et au CBD sur la fonction endocrine, paracrine et cellulaire du testicule.

Notre dernier axe de recherche a reposé sur l'hypothèse **(4) qu'une exposition gestationnelle *in vivo* au cannabis altère le développement testiculaire, entraînant des effets néfastes sur la fonction reproductive, révélés plus tard au cours de la vie.** Ainsi, dans le but de caractériser les effets à court ou long terme d'une exposition fœtale au Δ 9-THC et au CBD sur le testicule fœtal, nous avons utilisé un modèle de souris *in vivo*. Des femelles gestantes ont été traitées avec du Δ 9-THC et du CBD et la fonction testiculaire de la descendance étudiée à différentes périodes de la vie. Ce modèle nous permet de prendre en compte un grand nombre de paramètres physiologiques tel que le passage materno-fœtal des phytocannabinoïdes, leur potentielle métabolisation par différents tissus avant d'arriver au testicule fœtal, ainsi que leurs effets possibles au niveau central des embryons. Ce travail expérimental est encore en cours d'analyse au moment où est écrit ce manuscrit.

Mon travail de thèse comporte 3 parties, présentées dans des chapitres distincts dans la section « Résultats et discussion ». Pour le chapitre I (impact du Δ 9-THC et du CBD sur le testicule humain adulte) et II (impact du Δ 9-THC et du CBD sur le testicule humain fœtal)

sont intégrés un matériel et méthode succinct, les articles rédigés, une discussion des résultats et les perspectives envisagées. Pour le travail expérimental concernant le modèle souris *in vivo* (Chapitre III), un matériel et méthode complet est donné et les premiers résultats obtenus sont décrits.

Résultats et discussion

The World Journal of Men's Health

The Exposure of Human Adult Testis Tissue to Cannabinoids THC and CBD Does Not Impact Testosterone Production

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	The Exposure of Human Adult Testis Tissue to Cannabinoids THC and CBD Does Not Impact Testosterone Production
Short Title:	Cannabinoids effects on adult human testis ex vivo
Article Type:	Original Article
Section/Category:	Male reproductive health and infertility
Keywords:	Cannabis; Leydig cells; Male infertility; Spermatogenesis
Corresponding Author:	Gely-Pemot Aurore FRANCE
Corresponding Author's Institution:	
First Author:	Janaina Da Silva
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Janaina Da Silva Juliette Dochez-Arnault Chritèle Desdoits-Lethimonier Nathalie Dejuçq-Rainsford Gely-Pemot Aurore
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	<p>Purpose: While an increased risk of developing germ cell tumors has been established in regular cannabis consumers, there is conflicting evidence about an association between cannabis use and testosterone levels. In this context, we aimed to determine whether Δ^9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), the two major and best-studied cannabinoids present in cannabis, also the most used for therapeutic applications, can directly impact the steroidogenic function and germ cell lineage of the human adult testis.</p> <p>Materials and Methods: We used our well-characterized organotypic culture of human testis, in which adult testis explants were exposed to CBD, THC, or CBD/THC [ratio 1:1] from 10-9 to 10-5M for up to either 48h or 9 days. The testes were obtained from multi-organ donors (n = 13; mean age: 55.15±5.62 years).</p> <p>Results: The testosterone production and the spatial distribution of Leydig cells did not change upon CBD and/or THC exposure either after 48h or 9 days. Also, the tissue morphology, the number of apoptotic and proliferative cells as well as the mRNA expression of genes encoding proteins involved in germ cell differentiation, meiosis, and Sertoli and Leydig functions were also not affected by the phytocannabinoid exposures.</p> <p>Conclusions: Altogether, these findings show an absence of acute direct effects of exposure to cannabis-derived cannabinoids THC and CBD on testicular testosterone production and germ cells ex vivo. Further studies are warranted to explore an indirect impact of cannabinoids on testis functions through the hypothalamic-pituitary-testis axis as well as the potential effects of long-term exposures.</p>
Suggested Reviewers:	Ilpo Huhtaniemi ilpo.huhtaniemi@imperial.ac.uk Nathalie Rives nathalie.rives@chu-rouen.fr Gilda Cobellis gilda.cobellis@unina2.it
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Corresponding Author E-Mail:	aurore.gely-pemot@ehesp.fr
Manuscript Classifications:	50: Male Infertility; 120: Health promotion, prevention and lifestyle; 140: Endocrinology

CHAPITRE I. EFFETS DE L'EXPOSITION DU TESTICULE HUMAIN ADULTE AU Δ 9-THC ET/OU AU CBD

Le premier axe de recherche de cette thèse est consacré aux effets de l'exposition du testicule humain adulte au Δ 9-THC et au CBD, selon des doses se rapprochant d'une consommation récréationnelle ou thérapeutique chez l'homme, en utilisant un modèle de culture organotypique.

Cette étude a donné lieu à un article soumis pour publication dont je suis le deuxième auteur.

A) Résumé

Aujourd'hui, les débats s'intensifient dans le monde pour la légalisation du cannabis à usage récréationnel ou thérapeutique, bien que sa consommation ait été associée avec des risques néfastes pour la santé. Un risque accru de développer des tumeurs testiculaires des cellules germinales a été établi chez les consommateurs de cannabis. Cependant, il existe encore des preuves contradictoires de l'association entre la consommation de cannabis et de faibles niveaux de testostérone ainsi que l'altération de paramètres spermatiques. Dans ce contexte, nous avons investigué l'impact des deux principaux phytocannabinoïdes du cannabis, également utilisé en thérapie, sur la physiologie du testicule humain adulte. Des explants testiculaires adultes provenant de 13 donneurs *post-mortem* et cultivés en culture organotypique ont été exposés au CBD, au Δ 9-THC ou à un mélange équimolaire de CBD et de Δ 9-THC pendant 48 heures ou 9 jours. Les données pharmacocinétiques montrant que les concentrations plasmatiques maximales (C_{max}) chez les consommateurs varient autour de $10^{-7}M$, en fonction du mode d'administration du cannabis, nous avons évalué les effets dose-réponse du CBD ou du Δ 9-THC de $10^{-9}M$ à $10^{-5}M$. Afin de tenir compte des effets additifs des molécules, l'impact ces composés a également été étudiés en mélange équimolaire. Suite à l'exposition aux phytocannabinoïdes des explants testiculaires, nous avons évalué la morphologie, la sécrétion de testostérone, le nombre de cellules apoptotiques et

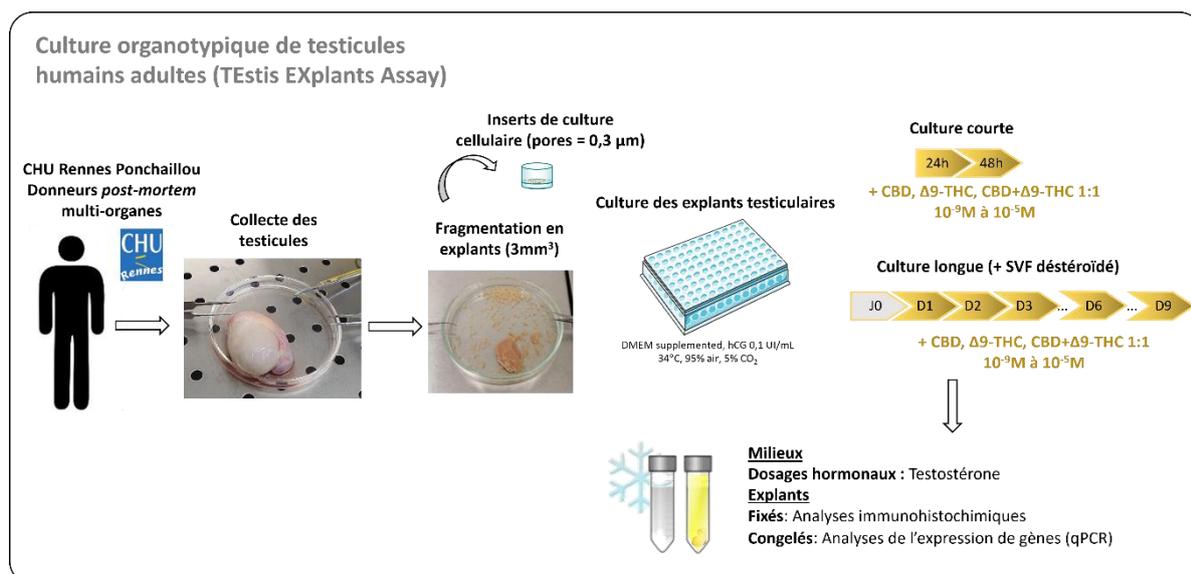


Figure 32 : Procédures expérimentales relatives au modèle d'explants testiculaires humains adultes *ex vivo*.

Des explants testiculaires humains adultes ont été exposés à du CBD seul, du Δ9-THC seul et un mélange équimolaire de CBD et de Δ9-THC (CBD+Δ9-THC 1 :1), à des doses allant de 10⁻⁹M à 10⁻⁵M pendant 48 heures (h) (culture courte) ou 9 jours (D) (culture longue). En culture courte, les explants sont exposés aux différents traitements dès la mise en culture. En culture longue, les explants ne sont pas exposés aux drogues pendant les 24 premières heures (J0), permettant d'obtenir des valeurs basales de sécrétions hormonales et paracrines pour chaque puit. Du sérum de veau foetal (SVF) déstéroïdé est ajouté dans le milieu de culture des cultures longues. Les milieux de culture sont collectés et changés toutes les 24 heures, et les explants sont récupérés à la fin de la culture et analysés.

prolifératives, ainsi que l'expression de l'ARNm de gènes codants pour des protéines impliquées dans les fonctions des cellules de Sertoli et de Leydig, et dans la différenciation des cellules germinales et la méiose. L'exposition *ex vivo* de testicules humains adultes à une gamme de concentrations de CBD, de Δ 9-THC ou d'un mélange équimolaire de CBD et de Δ 9-THC pendant 48 heures ou 9 jours n'affecte pas les paramètres testés. Ces résultats suggèrent l'absence d'effets directs d'une exposition à ces phytocannabinoïdes sur les fonctions testiculaires avec les durées de culture étudiées. Ces résultats reflètent une exposition *ex vivo* du testicule humain adulte au CBD et au Δ 9-THC, et ne peuvent rendre compte des effets potentiels d'une exposition plus chronique ou des effets indirects, telles que des perturbations de l'axe HHT.

B) Matériel et méthodes

Le protocole expérimental utilisé au cours de cette étude est illustré en **Figure 32**.

Les testicules humains adultes de patients décédés sont obtenus grâce à une collaboration avec le Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, après autorisation de l'Agence de la Biomédecine et accord des familles concernées. Afin d'étudier les effets d'une exposition au Δ 9-THC et au CBD sur le testicule humain adulte, nous avons utilisé un modèle de culture organotypique d'explants testiculaires adultes (*Testicular explants assay*, TEXAS), déjà décrit dans plusieurs papiers (Naumenko et al., 2011; Kristensen et al., 2018a) et standardisé au sein de notre équipe (Vanessa Roulet et al., 2006; Desdoits-Lethimonier et al., 2012; Albert et al., 2013; Desdoits-Lethimonier et al., 2017a; Matusali et al., 2018a). Brièvement, après avoir retiré l'albuginée, le testicule entier est découpé en fragments de 3mm³, appelés « explants ». Pour chaque condition, en triplicat, 4 explants sont déposés sur une membrane poreuse (appelée « insert »), placée dans un puit à la surface du milieu de culture. En permettant le maintien de l'architecture tissulaire et des communications cellulaires, ce modèle permet de se rapprocher au plus près de la réalité physiologique *in vivo*.

Les effets des deux phytocannabinoïdes majoritaires du cannabis, et utilisés à des fins thérapeutiques, le Δ 9-THC et le CBD, ont été étudiés, seuls ou en mélange équimolaire. Ces

conditions nous ont permis d'évaluer les potentiels effets additifs ou inhibiteurs d'une molécule sur l'autre. La concentration plasmatique de $\Delta 9$ -THC et de CBD après une consommation récréationnelle ou thérapeutique atteignant environ 10^{-7} M chez l'homme adulte (pour revue : Grotenhermen, 2003; Huestis, 2005, 2007; Lucas et al., 2018), nous avons encadré cette valeur en traitant nos explants testiculaires avec des concentrations de $\Delta 9$ -THC et/ou de CBD allant de 10^{-9} M à 10^{-5} M et afin d'observer d'éventuels effets doses. Lors de cette étude, nous avons testé l'impact d'une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD « courte » (pendant 48 heures), mimant une consommation aigüe de ces phytocannabinoïdes chez l'homme *in vivo*, et une exposition « longue » (10 jours), mimant une consommation plus chronique de ces composés.

Nous avons observé les effets du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD sur différents paramètres. La capacité des explants à sécréter une des hormones principales du testicule, la testostérone, a été étudiée par le dosage de ce facteur dans les milieux de culture. Les explants testiculaires ont été récupérés en fin de culture et pour chaque condition, sur la moitié des explants ont été réalisées des immunohistochimies, afin d'évaluer l'impact des différents traitements sur la morphologie, la viabilité cellulaire et la surface occupée par les cellules de Leydig. Sur l'autre moitié des explants, les effets des traitements sur l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les fonctions sertoliennes, leydigiennes et dans la différenciation des cellules germinales ont été investigués par *quantitative Polymerase chain reaction* (qPCR).

C) Article rédigé

The exposure of adult human testis tissue to cannabinoid THC and CBD does not impact testosterone production

J. Da Silva¹, J. Dochez-Arnault¹, C. Desdoits-Lethimonier¹, N. Dejuqc-Rainsford^{1#}, A. Gely-Pernot^{1##} (#Co-last Authors)

¹Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France.

*Correspondence address: Inserm (Institut National de la santé et de la recherche médicale), Irset - Inserm UMR 1085 (Institut de recherche en santé, environnement et travail), 9 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35000 Rennes, CEDEX, France. Tel: +33 (0) 6 24 10 86 67; E-mail: aurore.gely-pernot@ehesp.fr

#N. Dejuqc-Rainsford and A. Gely-Pernot contributed equally to this work

ABSTRACT

Purpose: While an increased risk of developing germ cell tumors has been established in regular cannabis consumers, there is conflicting evidence about an association between cannabis use and testosterone levels. In this context, we aimed to determine whether Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), the two major and best-studied cannabinoids present in cannabis, also the most used for therapeutic applications, can directly impact the steroidogenic function and germ cell lineage of the human adult testis.

Materials and Methods: We used our well-characterized organotypic culture of human testis, in which adult testis explants were exposed to CBD, THC, or CBD/THC [ratio 1:1] from 10^{-9} to 10^{-5} M for up to either 48h or 9 days. The testes were obtained from multi-organ donors (n = 13; mean age: 55.15±5.62 years).

Results: The testosterone production and the spatial distribution of Leydig cells did not change upon CBD and/or THC exposure either after 48h or 9 days. Also, the tissue morphology, the number of apoptotic and proliferative cells as well as the mRNA expression

of genes encoding proteins involved in germ cell differentiation, meiosis, and Sertoli and Leydig functions were also not affected by the phytocannabinoid exposures.

Conclusions: Altogether, these findings show an absence of acute direct effects of exposure to cannabis-derived cannabinoids THC and CBD on testicular testosterone production and germ cells *ex vivo*. Further studies are warranted to explore an indirect impact of cannabinoids on testis functions through the hypothalamic-pituitary-testis axis as well as the potential effects of long-term exposures.

Keywords: Cannabis; Leydig cells; Male infertility; Spermatogenesis

INTRODUCTION

Cannabis remains the most widely used drug worldwide. In 2020, more than 4 per cent of the global population aged 15–64 (209 million people) had used cannabis in the past year. The use of cannabis has increased in young people of reproductive age, with a majority of consumers starting smoking cannabis in their mid to late teens. Of concern, puberty represents a sensitive window for reproductive health, which integrity is required for lifelong fertility. Furthermore, there has been a renewed interest in the potential medical use of cannabis, cannabis extracts, and pharmaceutical products (containing cannabinoids) (UNODC, 2022).

Scientific evidence based on observational findings from cannabis smokers has produced conflicting data about the effect of cannabinoids on male reproductive health. Some studies highlighted the negative effect of cannabis consumption on sperm parameters (Feiby L Nassan et al., 2019; Payne et al., 2019b) and testosterone secretion (Belladelli et al., 2022c; Kolodny et al., 1974b), whereas others failed to observe any impact (Belladelli et al., 2022b; Jack H Mendelson et al., 1974; Jack E. Thistle et al., 2017; Cushman, 1975b). In the last few years, a review (Maccarrone et al., 2021b) and a meta-analysis (Belladelli et al., 2021b) concluded that the current evidence does not support a clinically significant association between cannabis use and testicular function, assessed through published clinical data of semen quality and serum hormone levels. Nevertheless, it is now established that frequent cannabis use is associated with the development of testicular germ cell tumors (TGCT), suggesting that recreational and therapeutic uses of cannabis or its compounds may

impact the testis (Ghasemiesfe et al., 2019b; Gurney et al., 2015b; Song et al., 2020b). Furthermore, a recent systematic review indicated that the most consistent consequence of cannabis addition is its negative effects on sperm morphology, while its negative impact on the hormonal profile was still questionable (Alghobary and Mostafa, 2022b). Also, the evidence that cannabis depresses testosterone levels relies heavily on animal studies (Payne et al., 2019b).

The two major cannabinoids of cannabis are Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), responsible for the psychotropic effect, and cannabidiol (CBD). These two compounds are the best-studied and most used as an alternative for therapeutic applications such as epilepsy, Alzheimer's and Parkinson's diseases, multiple sclerosis, and cancer (Cohen et al., 2019). THC and CBD act on specific G protein-coupled receptors called cannabinoid receptors, CB1 and CB2. These receptors, together with their naturally synthesized cannabinoids, so-called endocannabinoids (eCAs), and their synthesis/degradation enzymes and transporters, constitute the endocannabinoid system (ECS) (Kilaru and Chapman, 2020). Gonads synthesize eCAs, which in rodents control Sertoli and Leydig cells activity, germ cell progression, as well as the acquisition of sperm functions (Bovolin et al., 2014b). Our laboratory recently evidenced the expression of the main components of the ECS in the human adult testis (Nielsen et al., 2019b). Notably, both CB1 and CB2 were expressed in Leydig cells and post-meiotic germ cells, along with ECS enzymes.

Since ECS is involved in reproductive function and data about the effect of cannabis consumption on reproductive health are conflicting, our study aimed to determine whether THC and CBD, alone or in a mixture, directly impact testis steroidogenic function and germ cell lineage using our well-characterized organotypic culture of human adult testis (Desdoits-Lethimonier et al., 2017b; Kristensen et al., 2018b; Matusali et al., 2018b; V Roulet et al., 2006).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

CBD (Axon Medchem, Netherlands) was diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) solution, while THC (Sigma Aldrich; CAS number 1972-08-3, USA) was diluted in ethanol (EtOH) solution. The same amount of DMSO, EtOH, and a mixture of DMSO and EtOH was used as control of CBD, THC, and the mixture of THC and CBD, respectively.

Ethical statement

Testes were obtained from multi-organ donors (n = 13; mean age: 55.15±5.62 years). The protocol was approved by the local ethics committee (Agence de la Biomédecine; authorization no. #####) and informed consent was obtained from the donors' families.

Ex Vivo Organ Model: Testis Explant Assay

To determine the direct effect of CBD and/or THC on human adult testis tissue, we used our previously validated organ model assay (Testis Explant Assay) (V Roulet et al., 2006). After collection of each testis, the organ was placed at 4°C and rapidly processed for experimentation. Testis tissues were systematically examined by transillumination upon receipt. Only tissues displaying spermatogenesis were further processed. Four 3-mm³ testis explants were placed onto a polyethylene terephthalate insert (Falcon Labware, USA) at the interface of air in 1 ml of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo Fisher Scientific). This medium was supplemented with antibiotics, 4 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10µg/ml insulin, 5µg/ml transferrin, 200ng/ml vitamin E, 100 ng/ml vitamin A, 50ng/ml vitamin C, and 1 IU/ml hCG for culture, in a well of a 12-well plate. For the long-term culture, 10% of fetal calf serums without steroids were added to supplemented medium. The explants were exposed to a medium containing either CBD or 0.1% of DMSO (control CBD), THC or 0.1% EtOH (control THC), CBD/THC or 0.2% of DMSO/EtOH [ratio 1:1]. Drugs were used at 10⁻⁵M to 10⁻⁹M. For each condition, testis explants were cultured in three different wells corresponding to technical replicates for 48h with medium replenishment at 24h during the short-term culture. Media from 24 and 48h were stored at -80°C for testosterone measurements. For the longer-term culture, explants were first cultured during the first 24h of culture (D0) without any drug to define a baseline for hormone production in each well. This allows normalization of the explants secretory capacity when the drugs are added.

Media were then changed and collected at 3, 6, and 9 days (D3, D6, and D9, respectively) after the beginning of the treatment. At the end of the exposure, three explants, one of each well of each condition, were randomly collected and either stored at -80°C for RT-qPCR or fixed in Bouin's or paraformaldehyde (PFA) 4% (w/v) solutions and embedded in paraffin. The fixed explants were cut into 5.0µm-thick sections and stored at 4°C until staining.

Histology

Histological sections of human adult testis explants from each treatment condition were performed on Bouin's-fixed tissue and stained with hematoxylin-eosin. The testicular histology was checked under a light microscope (Zeiss microscope).

Hormone measurement

Testosterone levels were assayed in duplicate in the culture medium using a specific radioimmunoassay (RIA, Beckman Coulter, Czech Republic). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 11.6 and 13.5%, respectively. Control testis explants from the short-term culture produced an average of 15.08 ± 2.96 ng/ml testosterone after 24h of culture and 17.37 ± 4.03 ng/ml testosterone after 48h of culture. For the longer-term culture, the testosterone levels in the controls were 9.53 ± 1.79 , 29.95 ± 5.96 , and 166.31 ± 11.42 ng/ml after 24h (D0), D3, and D9, respectively.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on PFA 4%-fixed histological sections of human adult testis explants to observe Leydig cells and estimate the number of testicular cells undergoing apoptosis and proliferation, as previously described (Desdoits-Lethimonier et al., 2017b; Kristensen et al., 2018b; Maamar et al., 2015; Matusali et al., 2018b). Briefly, Leydig cells were labeled with a rabbit primary antibody (1:500; Sigma-Aldrich, Germany) directed against the cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (CYP11A1) followed by biotinylated polyclonal goat anti-rabbit secondary antibody (1:200; Dako, Denmark) (Maamar et al., 2015). For apoptosis assessment, histological sections were labeled with a polyclonal rabbit primary antibody directed against cleaved caspase-3 (1:100; Asp175, Cell Signaling Technology, Ozyme, France) and then with the secondary antibody as previously described (Desdoits-Lethimonier et al., 2017b; Kristensen et al., 2018b; Matusali et al.,

2018b). For proliferation assessment, histological sections were labeled with a monoclonal mouse primary antibody directed against Ki-67 (1:100; Dako, Denmark) and then a biotinylated polyclonal goat anti-mouse secondary antibody (1:200, Dako, Denmark). To quantify the number of cells in apoptosis (Caspase-3 positive cells) or proliferation (Ki-67 positive cells), positive cells were counted in the seminiferous tubules and interstitial tissue in 10 histological sections of each condition using a light microscope (Bh2 Olympus Microscope) coupled to Mercator Expert Software (Explorer NOVA). The surface area of each section was measured and the data are presented as cell number per surface area.

RT-qPCR

RNA was extracted from the frozen explants using RNeasy[®] Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen) according to the protocol provided. RT-qPCR was performed as described previously (Kristensen et al., 2018b) using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and 5.7ng cDNA template in a CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). RPLP0 and RPS20 mRNAs were used as internal controls for normalization. Used primers are listed in the **Supplementary Table 1**. Results were calculated by the $\Delta\Delta CT$ method as *n*-fold differences in target gene expression with respect to the reference gene and the calibration sample.

Statistical analyses

The data normality was checked by Shapiro-Wilk test. More than two groups were compared using one-way ANOVA followed by Holm-Sidak post hoc comparison test (parametric data) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test (nonparametric data). For comparing only two groups, we used the unpaired Mann-Whitney test. The statistical significance threshold was set at 0.05. All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 6 software.

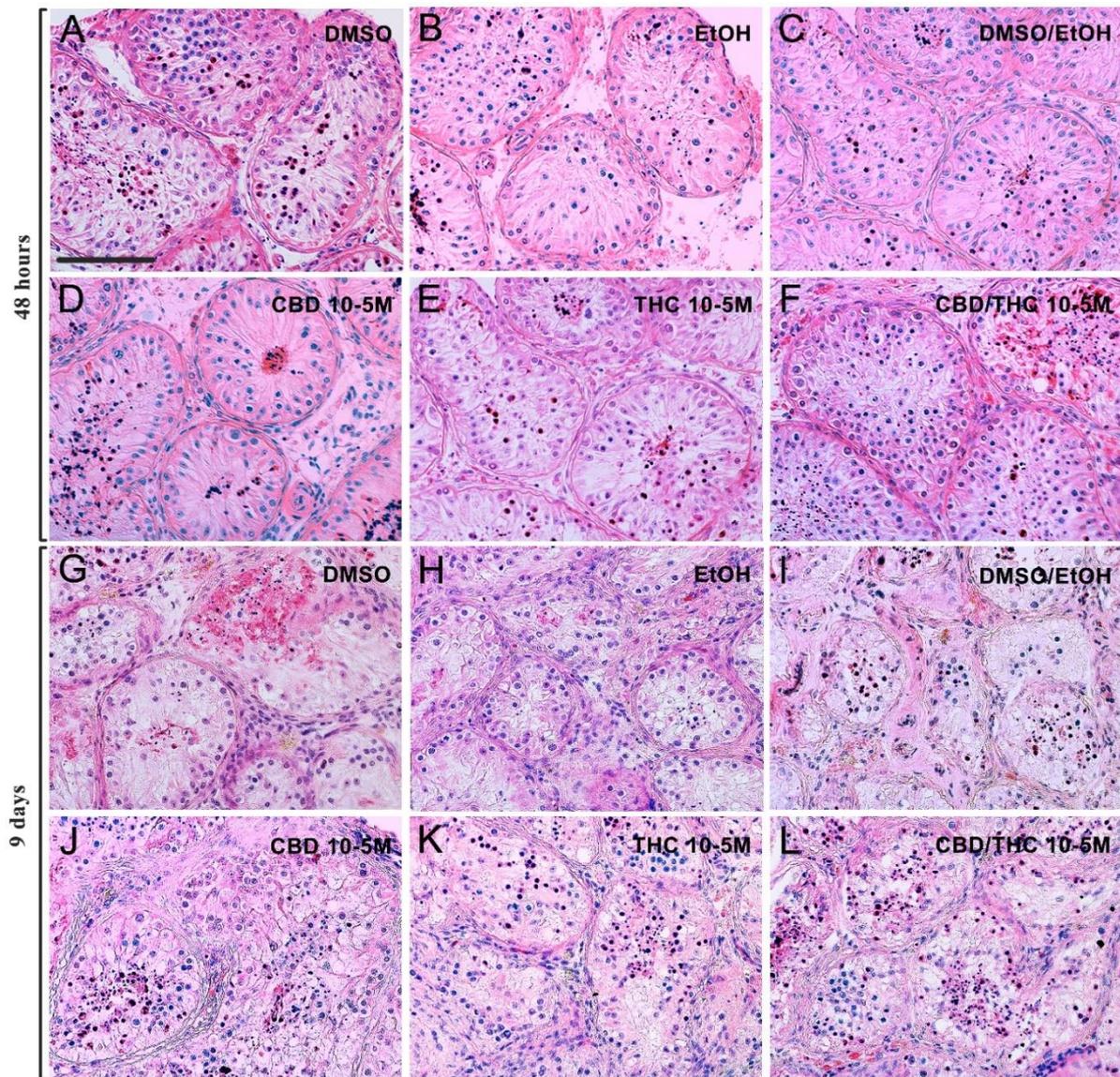


Figure 1. CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the morphology of human adult testis explants. H&E staining of the histological sections of human adult testis explants cultured for 48h (A-F) or 9 days (G-L) in the presence of (A, G) DMSO (Control CBD), (B, H) EtOH (Control THC), (C, I) DMSO/EtOH (Control CBD/THC), (D, J) CBD, (E, K) THC, or (F, L) CBD/THC (1:1 ratio). Pictures showed are representative of all tested cannabinoid concentrations performed on 6 donors for the short-term culture and 5 donors for the longer-term culture. Bar = 100 μ m.

RESULTS

THC and/or CBD do not affect the morphology of human adult testis explants

We first determined the effects of a broad range of concentrations of CBD, THC, and CBD/THC mixture on the testis morphology following either a 48h or 9 day exposure, in an attempt to reflect various cannabis usages, i.e. single or more regular exposure to different administration modes. The analysis of the sections stained with hematoxylin/eosin showed the overall structure of the testis explants upon exposure to different concentrations of cannabinoids were not impacted by either a 48h (**Fig. 1 A-F**) or 9 days treatment (**Fig. 1 G-L**). However, because of the difficulties to maintain germ cell differentiation in culture, the seminiferous tubules appeared smaller and with fewer cells 9 days after treatment, in both control and exposed conditions.

THC and/or CBD have no effect on the secretion of testosterone, spatial distribution and gene expression of Leydig cells

After assessing the endocrine function of cultured testis explants exposed to the cannabinoids, our data show that neither THC, CBD, nor the mixture of the two significantly modified the secretion of testosterone in the culture media after 24h, 48h, 3 days, or 9 days of exposure (**Fig. 2A,B**). Also, immunohistochemistry of the testis sections using CYP11A1, a specific marker of Leydig cells, did not highlight any change in Leydig cell density in treated conditions compared to controls 48h and 9 days after the beginning of the treatment (**Fig. 2C**). In line, the quantitative measure of genes specifically expressed by Leydig cell (*INSL3*, *CYP19A1*) did not reveal any significant changes upon drug exposures (**Fig. 2D**).

THC and/or CBD do not affect the number of apoptotic and proliferating cells in human adult testis explants

Since we did not detect any obvious morphological changes after THC, CBD, or THC/CBD exposure, we focused on early signs of cell death in the exposed testis explant. After quantification of the number of positive cells to cleaved Caspase-3, a specific marker of apoptosis, per surface area in both seminiferous tubules and interstitial space compartments, our results showed that neither CBD, THC, nor CBD/THC impacted germ cells, Sertoli cells,

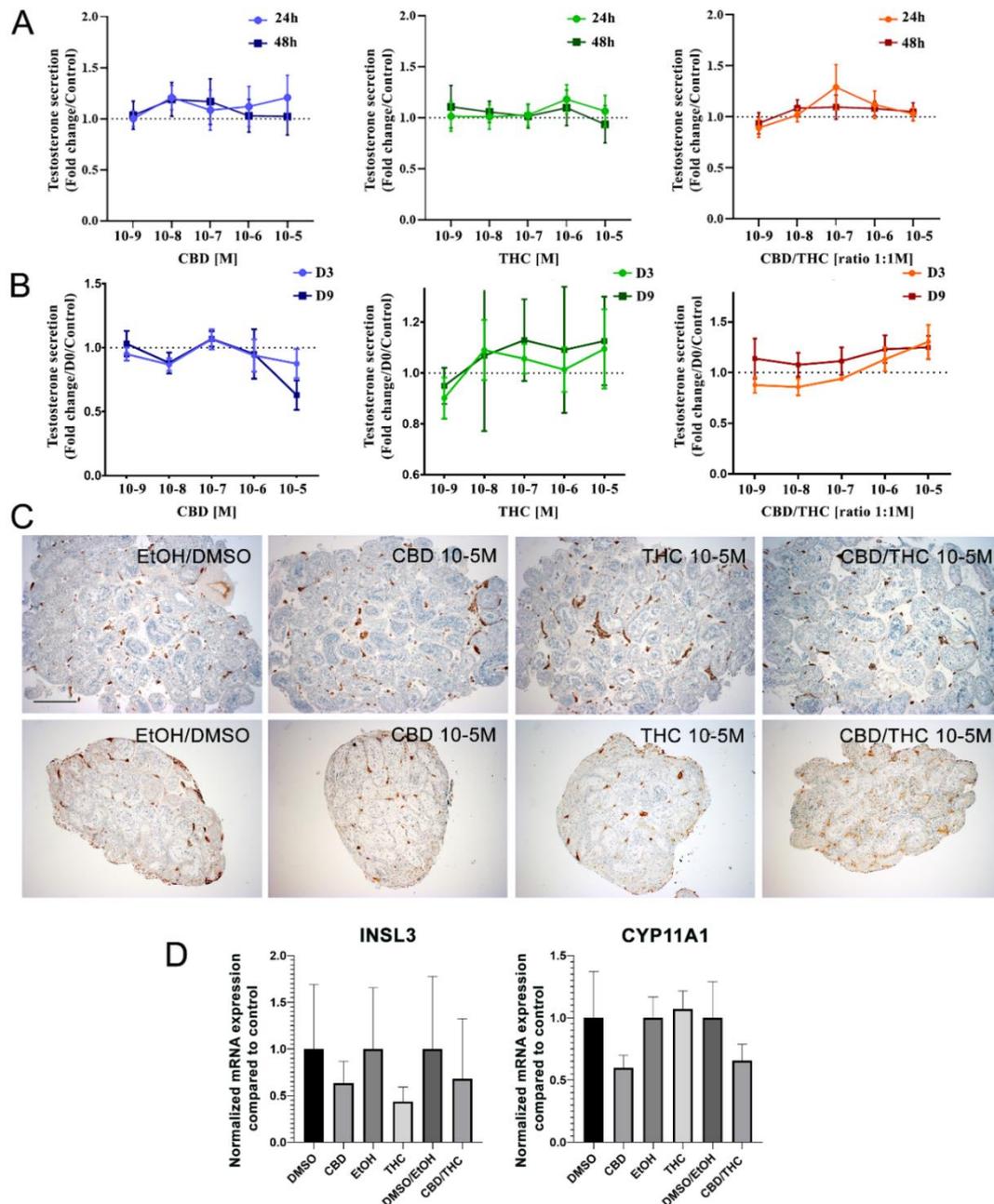


Figure 2. CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the secretion of testosterone by human testis in organotypic culture. Amount of testosterone in the supernatants of human adult testis explants cultured for 24h or 48h (A) and 3 or 9 days (B) in presence of CBD (in blue), THC (in green), and CBD/THC (in orange) at 10^{-9} to 10^{-5} M. There was no significant difference (i.e. $p > 0.05$) among the groups by ANOVA followed by Holm-Sidak test (parametric data) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test (nonparametric data). Data presented as mean \pm SEM divided by their respective controls. Testosterone released by testis explants from 8 donors for the short-term culture and 5 donors for the longer-term culture. (C) Immunostaining using an anti-CYP11A1 antibody on histological sections of whole explants cultured for 48h or 9 days in the presence of CBD, THC, or CBD/THC (1:1 ratio) at 10^{-5} M. Pictures showed are representative of minimum 3 independent experiments performed on 3 donors for the short-term and longer-term culture. Bar = $500\mu\text{m}$. (D) RT-qPCR analysis using testis explants cultured for 48h in the presence of CBD, THC, or CBD/THC (1:1 ratio) at 10^{-5} M. The effect of the treatments was investigated on *INSL3* and *CYP11A1* gene expression. No significant difference (i.e. $p > 0.05$) among the groups by ANOVA followed by Holm-Sidak test. Presented data are normalized on 2 reference genes (*RPLP0* and *RSP20*) and control condition (as mean \pm SEM). *INSL3* - insulin like 3; *CYP19A1* - cytochrome P450 family 19 subfamily a member 1.

Leydig cells or other interstitial cells' viability in the range of concentrations used 48h after the beginning of the treatment (**Fig. 3**).

In the longer-term culture, we also verified that the treatment with CBD, THC, nor CBD/THC at 10^{-5} M during 9 days did not impact the number of apoptotic cells, as compared with control condition (**Supplementary Fig. 1**).

As proliferation is more active at the beginning of the culture, we next evaluated the short-term effect of CBD and/or THC on the proliferating rate in human adult testis explants, using the specific marker Ki-67. After quantification of the number of Ki-67 positive cells per surface area in both seminiferous tubules and interstitial space compartments, our results showed that neither CBD nor THC, alone or in combination, affected the cell's capacity to proliferate (**Fig. 4**).

1. Expression of genes involved in spermatogenesis and Sertoli cell function are not affected by 48h exposure of testis explants to CBD and/or THC

To investigate the potential effects of CBD and/or THC exposure on gene expression of human adult testis, we performed RT-qPCR on a range of genes markers of germ cell populations and Sertoli cells. Testis explants treated with the highest dose of CBD and/or THC and their related controls were used. For the analysis, we chose genes encoding proteins involved in germ cell differentiation (*DAZL*, *LIN28A*, *POU5F1*), meiosis (*SYCP3*, *STRA8*, *REC8*), and Sertoli cell function (*INHBB*, *SOX9*, *FSHR*). Our results show that exposure to CBD and/or THC at the highest dose (10^{-5} M) did not significantly affect the expression of any of the genes verified in our experiment 48h after the beginning of the treatment (**Fig. 5**).

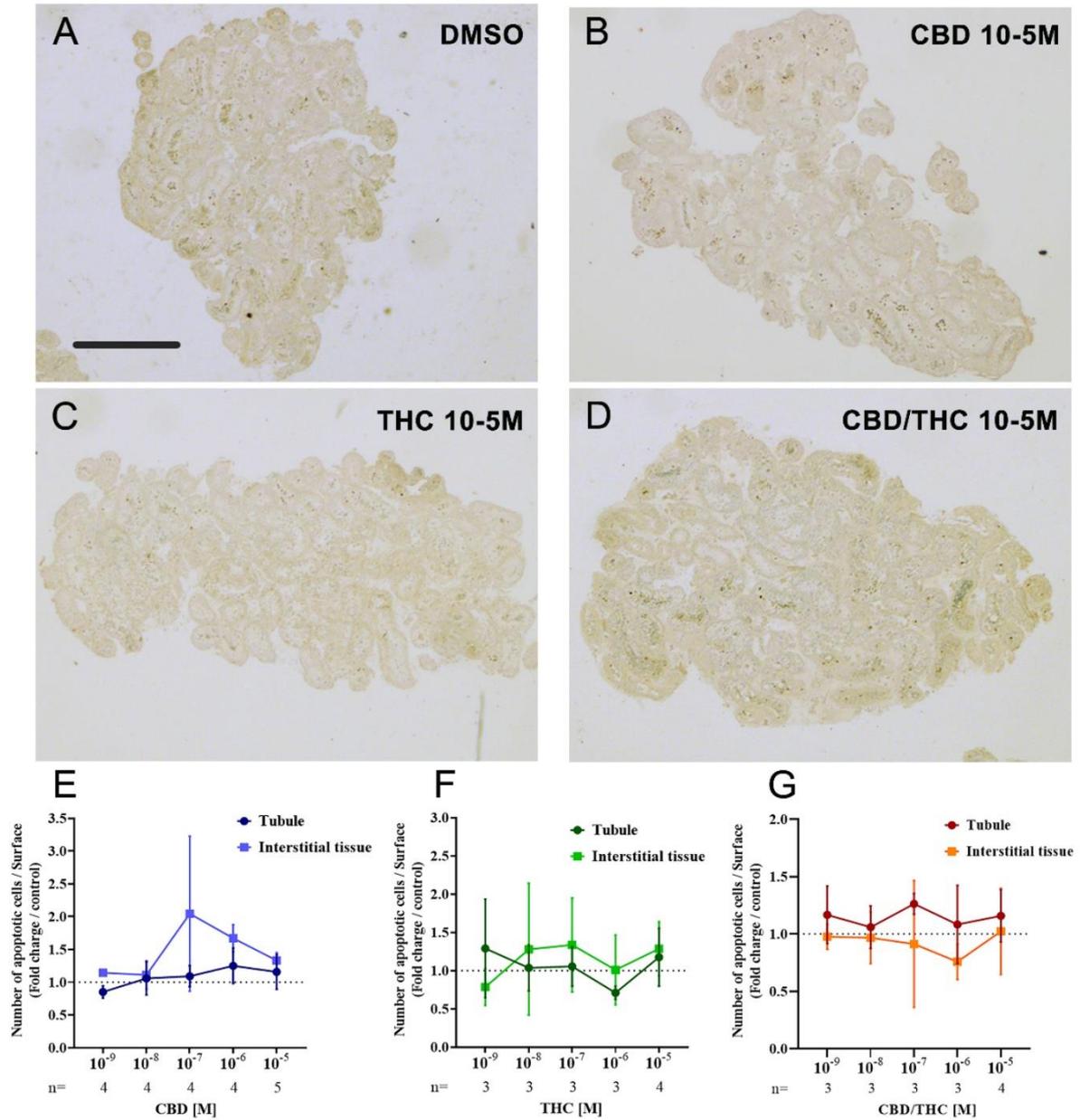


Figure 3. CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the number of apoptotic cells in human adult testis explants after 48h of culture. Immunostaining using an anti-cleaved Caspase-3 antibody on histological sections of testis explants cultured for 48h in the presence of CBD, THC, or CBD/THC (1:1 ratio). (A-D) Panels show whole explants stained with cleaved-caspase 3 (apoptotic cells in brown). Pictures showed are representative of minimum 3 independent experiments performed on 5 donors. Bar = 500 μ m. (E-G) Quantification of positive cells per surface area in both tubule and interstitial compartments after CBD (E), THC (F), and CBD/THC (G) exposure from 10^{-9} to 10^{-5} M. No significant difference (i.e. $p > 0.05$) among the groups by ANOVA followed by Holm-Sidak test. Data presented as mean \pm SEM divided by their respective controls. Quantification performed in at least 3 donors (the exact n for each dose is indicated at the bottom of the graph).

DISCUSSION

This study is the first to investigate the direct impact of the plant-extract cannabinoids CBD and THC, alone or in a combination, on the human adult testis. Using our validated model of human adult testis in organotypic culture (Desdoits-Lethimonier et al., 2017b; Kristensen et al., 2018b; Matusali et al., 2018b; V Roulet et al., 2006), we investigated whether exposure to cannabinoids used for recreational and therapeutic purposes may directly impact testis functions. We provide evidence that 48h or 9 day exposures of testis explants to CBD and THC alone or in a mixture - which duration spans the 1.3 days half-life of cannabis measured in infrequent users (Huestis and Research, 1996), for the range of cannabinoid concentrations used, has no major effect on steroidogenic function and germ cell lineage.

The ECS has been previously described as a critical regulator of male vertebrate reproduction, notably through the modulation of the secretion of male hormones (Bovolín et al., 2014b). At the central level, the ECS regulates the release of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH), a key neuropeptide for reproductive physiology, and lowers the levels of the follicle-stimulating hormone (FSH) and the luteinizing hormone (LH) released by the anterior pituitary. FSH and LH are respectively involved in the function of Sertoli cells, the somatic testicular cells that nurse the germ cells and are essential for their differentiation, and in the production of testosterone by Leydig cells (Corradi et al., 2016b). However, the available clinical data on the relationship between cannabis and male reproductive hormone production are inconsistent. Thus, while some studies showed a decrease in the levels of LH (Vescovi et al., 1992b) and FSH (Feiby L Nassan et al., 2019) in cannabis users versus non-users, others did not find any differences (Cushman, 1975b; Kolodny et al., 1974b). Kolodny and colleagues (Kolodny et al., 1974b) observed a modification of plasma testosterone level associated to a chronic and intensive use of cannabis (at least four days a week for a minimum of six months), whereas other studies did not observe any alteration (Jack H Mendelson et al., 1974; Jack E. Thistle et al., 2017). An explanation for these heterogeneous results could be related to the temporal and reversible effects of cannabis on hormone levels. Indeed, the effect of cannabis consumption on testosterone level is related to the recency of use (Jack E. Thistle et al., 2017). Nevertheless, the dosage of testosterone production by the human adult testis explants after CBD, THC, or

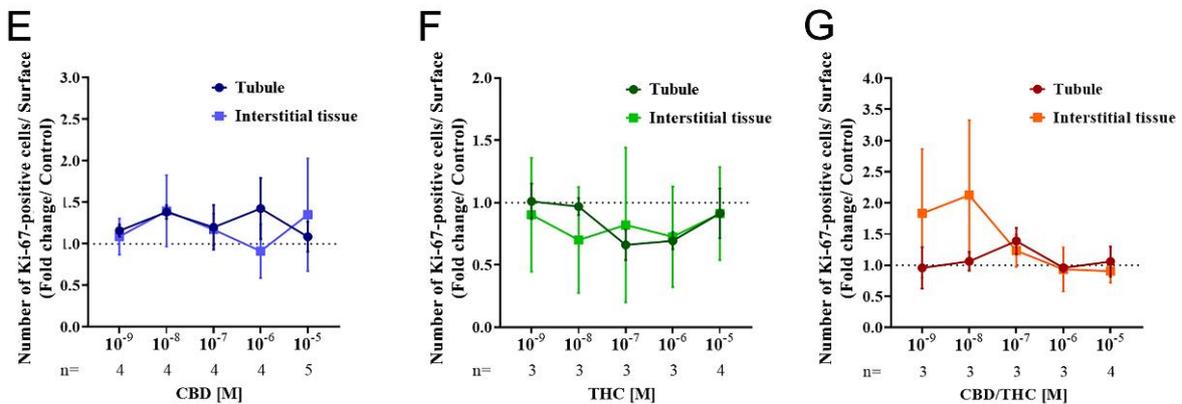
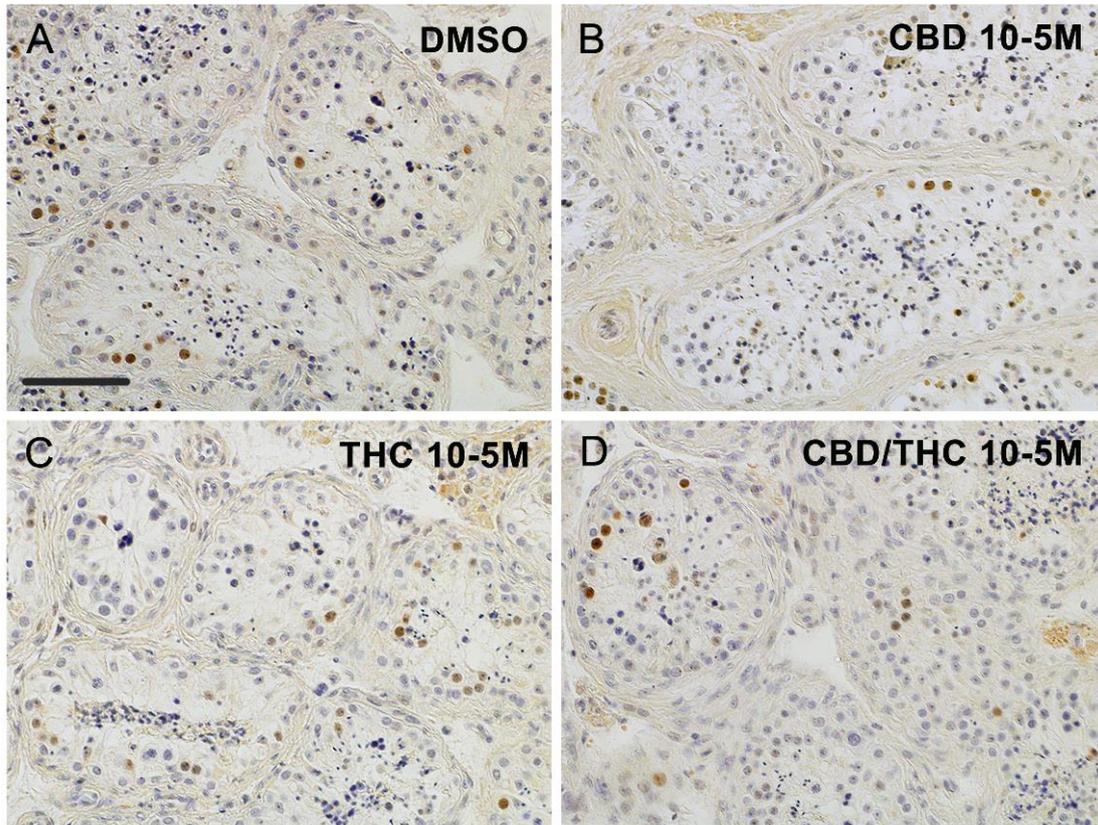


Figure 4. CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the number of proliferating cells in human adult testis explants. Immunostaining using an anti-Ki-67 antibody on histological sections of testis explants cultured for 48h in the presence of CBD, THC, or CBD/THC (1:1 ratio). **(A-D)** Ki-67 positive cells appear in brown and in most of the cases are on the peripheral site of the seminiferous tubules. Pictures showed are representative of minimum 3 independent experiments performed on 5 donors. Bar = 100 μ m. **(E-G)** Quantification of positive cells per surface area in both tubule and interstitial compartments after CBD **(E)**, THC **(F)**, and CBD/THC **(G)** exposure at 10^{-9} to 10^{-5} M. No significant difference (i.e. $p > 0.05$) among the groups by ANOVA followed by Holm-Sidak test. Data presented as mean \pm SEM divided by their respective controls. Quantification performed in at least 3 donors (the exact n for each dose is indicated at the bottom of the graph).

CBD/THC exposure did not show any time-related effect as no alteration were observed for either exposure times. Our results are consistent with that of a recent meta-analysis (Belladelli et al., 2021b), and suggest that exposure to CBD and THC does not modify testosterone production by Leydig cells. However, we cannot rule out an indirect effect through a modification of the gonadotropins released by the pituitary, and in turn a disruption of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG axis), nor a direct effect on testis after longer/repeated exposures.

Over 90% of testicular cancers are TGCT (Skakkebaek et al., 2016b). TGCT are believed to be primarily caused by a deregulation of gonocyte differentiation during development, resulting in the formation of germ cell neoplasia *in situ* (GCNIS) in adult testis. GCNIS corresponds to a precursor lesion that may develop into TGCT after exposure to risk factors (Skakkebaek et al., 2016b). TGCT incidence has been associated with cannabis consumption (Ghasemiesfe et al., 2019b; Gurney et al., 2015b; Song et al., 2020b). Thus, TGCT cases have been observed in frequent cannabis users, and the risk of developing this cancer was reported to increase with years of use, speculating that cannabis is able to affect the state of differentiation and proliferation of testicular germ cells. Ki-67, a proliferation marker, has been used for the evaluation and prognosis of TGCT (Datta et al., 2000a). After quantifying the Ki-67 positive cells in the explants, we did not observe a change after 48h of cannabinoids' exposure. To date, the mechanisms that may explain cannabis-TGCT association are unknown and further studies are required.

Since we did not observe any impact at cellular and histophysiological levels, we performed RT-qPCR analyses to determine whether phytocannabinoid exposure could affect the expression of a range of key genes for the testis functions. We showed that the mRNA levels of genes involved in steroidogenesis, Sertoli cell function, and germ cell differentiation, including those recently identified as driver genes for initiation of GCNIS, such as POU5F1 or LIN28A (von Eyben and Parraga-Alava, 2020b) were not affected. Therefore, this outcome confirms the lack of effect of cannabis on testis function in our *ex vivo* model.

Our model has however limitations. For instance, we cannot rule out a discrete effect of the cannabinoid compounds tested on a restricted number of testicular cells, which could have been missed in our bulk molecular analyses. In that respect, an analysis at single cell level would be useful. The impact of the 9 day culture of testis explant on germ cells' death

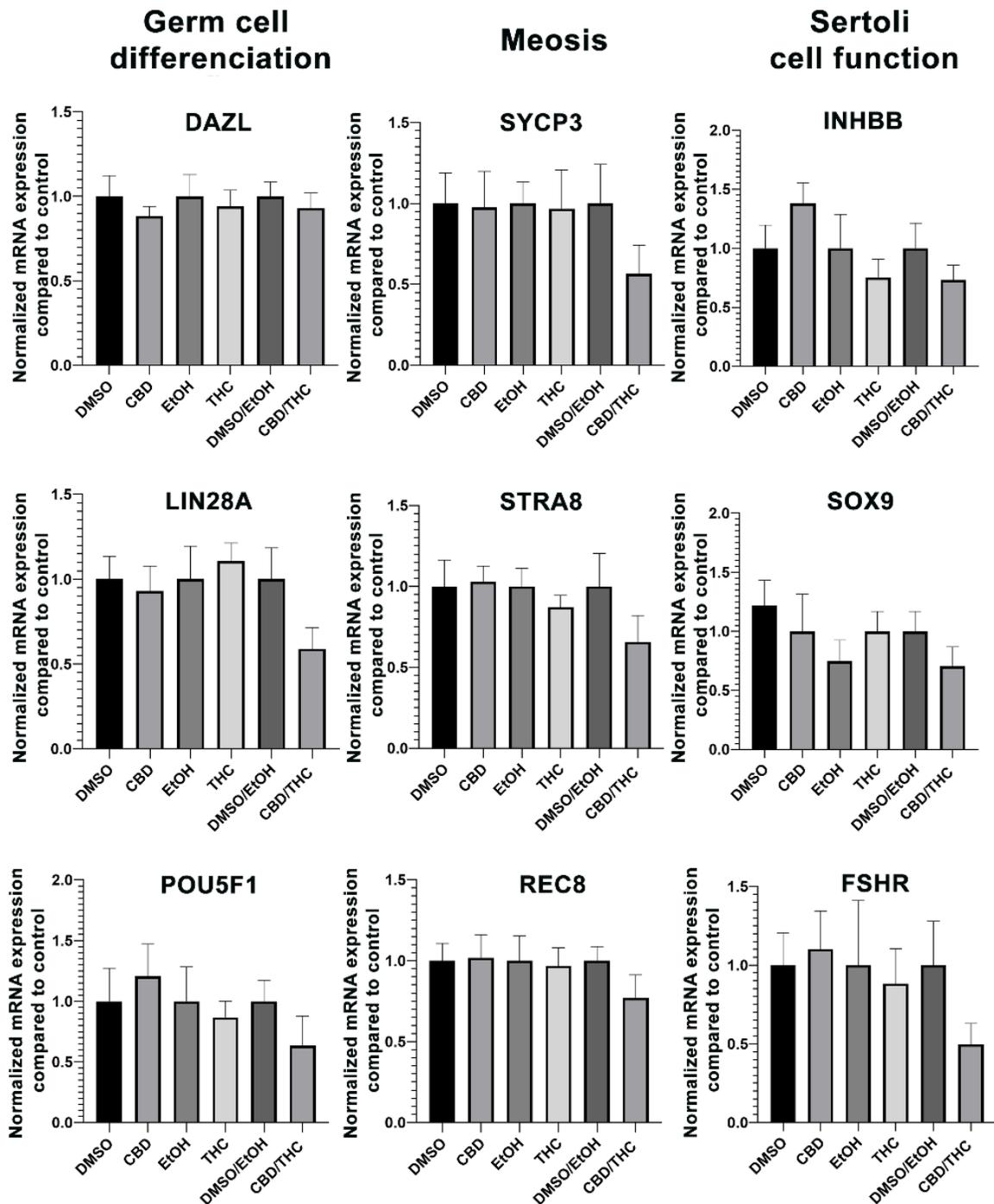


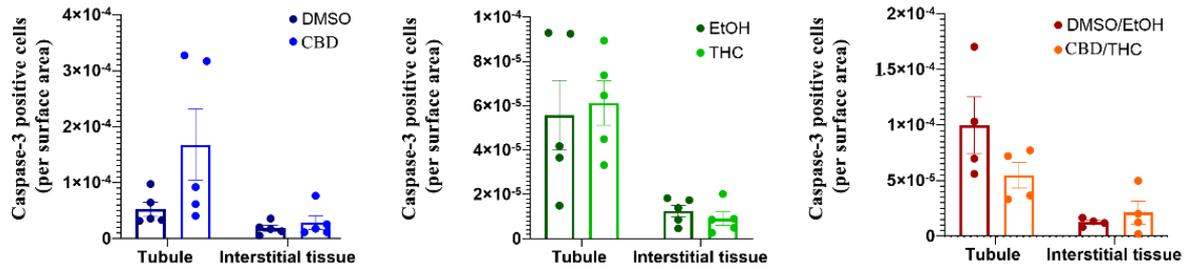
Figure 5: CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the expression of genes specific to germ cells and Sertoli cells in human adult testis explants. RT-qPCR analysis using testis explants from 5-6 donors cultured for 48h in the presence of CBD, THC, or CBD/THC (1:1 ratio) at 10^{-5} M. From the left to the right column, the effect of the treatments was investigated on genes involved in germ cell differentiation (*DAZL*, *LIN28A*, *POU5F1*), meiosis (*SYCP3*, *STRA8*, *REC8*) and Sertoli cell function (*INHBB*, *SOX9*, *FSHR*). No significant difference (i.e. $p > 0.05$) among the groups by ANOVA followed by Holm-Sidak test. Presented data are normalized on 2 reference genes (*RPLP0* and *RSP20*) and control condition (as mean \pm SEM). *DAZL* - deleted in azoospermia 1; *LIN28A* - lin-28 homolog A; *POU5F1* - POU class 5 homeobox 1; *SYCP3* - synaptonemal complex protein 3; *STRA8* - stimulated by retinoic acid 8; *REC8* - REC8 meiotic recombination protein; *INHBB* - inhibin subunit beta; *SOX9* - SRY-box transcription factor 9; *FSHR* - follicle-stimulating hormone receptor; *RPLP0* - ribosomal protein lateral stalk subunit P0; *RPS20* - ribosomal protein S20.

could also impair the detection of an impact of the drugs on a small germ cell population. Moreover, and as mentioned above, our model can only mimic a direct exposure of the testis outside its body environment and therefore without external hormonal regulations.

CONCLUSIONS

Overall, our study indicates that there are no direct effects of a 48h or 9 day exposure to cannabis-derived cannabinoids CBD and THC on steroidogenesis and testicular cells, including germ cell lineage in the human testis *ex vivo*. These data provide important complementary evidence to the heterogeneous studies performed in cannabis users and further suggest that there is no association between cannabis and a decrease in testosterone levels.

However, while our findings show no evidence to support the notion that direct exposures to the phytocannabinoids CBD and THC have harmful effects on testosterone production and human male reproductive health, a better understanding of the link between cannabis consumption and TGCT development is required, as well as that of the effect of regular/continuous exposures.



Suppl. Figure 1. A longer-term exposure to CBD and THC, alone or in a mixture, do not affect the number of apoptotic cells in human adult testis explants. A quantification of positive cells per surface area stained with an anti-cleaved Caspase-3 antibody in both tubule and interstitial compartments of 5 donors after 9 day exposure to CBD, THC at 10^{-5} M. No significant difference (i.e. $p>0.05$) among the groups by Mann-Whitney test. Data presented as mean \pm SEM

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon length (bp)
CYP19A1	CCAGGTCCTGGCTACTGCAT	GATCCCCATCCACAGGAATCT	69
DAZL	GAAGGCAAATCATGCCAAACAC	CTTCTGCACATCCACGTCATTA	186
FSHR	TGCCATTGAACTGAGGTTTG	GGTCCCCAAATCCTGAAAAT	74
INHBB	GCGTTTCCGAAATCATCAG	GCCTTCGTTGGAGATGAAGA	86
INSL3	CCCAGAGATGCGTGAGAAGT	CCAGCCACTGTAGCAACTC	229
LIN28A	AAGCTGCACATGGAAGGGTT	CCGCCTCTCACTCCCAATAC	138
POU5F1	TACTCTCGGTCCCTTTCC	CAAAAACCCTGGCACAAACT	131
REC8	TTTGGGATGATGTCTGTGGA	CTGGGATTGCAGCCTCTAAG	85
SOX9	AACGCCTTCATGGTGTGG	TCTCGCTCTCGTTCAGAAGTC	124
STRA8	GAGGGCAGCGTGAAGGACAG	GCAGCTGGCAAGCACTGAAC	165
SYCP3	TGCTGGAAGGAGTTGGAGTTGA	TCCCACTGCTGAAACAAAGTCA	193
Reference genes			
RPLP0	TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT	CAATCTGCAGACAGACACTGG	167
RPS20	AACAAGCCGCAACGTAATA	ACGATCCCACGTCTTAGAA	96

Supplementary Table 1. Primers used in RT-qPCR in human adult testis explants.

Primers used in the RT-qPCR to determine the expression of genes involved in Leydig cell function (*CYP11A1*, *INSL3*), germ cell differentiation (*DAZL*, *LIN28A*, *POU5F1*), meiosis (*SYCP3*, *STRA8*, *REC8*), and Sertoli cell function (*INHBB*, *SOX9*, *FSHR*) upon CBD and/or THC 48h exposure. RPLP0 and RPS20 genes were used as housekeeping genes to normalize the expression of the genes of interest. RT-qPCR was performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). *CYP19A1* - cytochrome P450 family 19 subfamily a member 1; *DAZL* - deleted in azoospermia 1; *FSHR* - follicle-stimulating hormone receptor; *INHBB* - inhibin subunit beta; *INSL3* - insulin like 3; *LIN28A* - lin-28 homolog A; *POU5F1* - POU class 5 homeobox 1; *REC8* - REC8 meiotic recombination protein; *SOX9* - SRY-box transcription factor 9; *STRA8* - stimulated by retinoic acid 8; *SYCP3* - synaptonemal complex protein 3; *RPLP0* - ribosomal protein lateral stalk subunit P0; *RPS20* - ribosomal protein S20.

REFERENCES

1. UNODC UN publication. World Drug Report 2022 [Internet]. Austria; 2022. Available from: https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr-2022_booklet-3.html
2. Payne KS, Mazur DJ, Hotaling JM, Pastuszak AW. Cannabis and Male Fertility: A Systematic Review. *J Urol*. 2019;202(4):674–81.
3. Nassan FL, Arvizu M, Mínguez-Alarcón L, Williams PL, Attaman J, Petrozza J, et al. Marijuana smoking and markers of testicular function among men from a fertility centre. *Human Reprod*. 2019;34(4):715–23.
4. Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marijuana use. *N Engl J Med*. 1974;290(16):872–4.
5. Belladelli F, Fallara G, Pozzi E, Corsini C, Cilio S, Raffo M, et al. Effects of recreational cannabis on testicular function in primary infertile men. *Andrology*. 2022;10(6):1172–80.
6. Belladelli F, Chen T, Basran S, Greenberg DR, Del Giudice F, Mulloy E, et al. The Association between Monthly, Yearly, and Lifetime Cannabis Use, and Semen Parameters in Asian-American Men. *World J Mens Health*. 2022;40:e61.
7. Mendelson JH, Kuehnle J, Ellingboe J, Babor TF. Plasma testosterone levels before, during and after chronic marijuana smoking. *N Engl J Med*. 1974;291(20):1051–5.
8. Thistle JE, Graubard BI, Braunlin M, Vesper H, Trabert B, Cook MB, et al. Marijuana use and serum testosterone concentrations among U.S. males. *Andrology*. 2017;5(4):732–8.
9. Cushman P. Plasma Testosterone Levels in Healthy Male Marijuana Smokers. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 1975;2(2):269–75.
10. Maccarrone M, Rapino C, Francavilla F, Barbonetti A. Cannabinoid signalling and effects of cannabis on the male reproductive system. *Nat Rev Urol*. 2021;18(1):19–32.
11. Belladelli F, Del Giudice F, Kasman A, Kold Jensen T, Jørgensen N, Salonia A, et al. The association between cannabis use and testicular function in men: A systematic review and meta-analysis. *Andrology*. 2021;9(2):503–10.
12. Gurney J, Shaw C, Stanley J, Signal V, Sarfati D. Cannabis exposure and risk of testicular cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2015;15(1):897.
13. Ghasemiesfe M, Barrow B, Leonard S, Keyhani S, Korenstein D. Association Between Marijuana Use and Risk of Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2019;2(11):e1916318.
14. Song A, Myung NK, Bogumil D, Ihenacho U, Burg ML, Cortessis VK. Incident testicular cancer in relation to using marijuana and smoking tobacco: A systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Urol Oncol*. 2020;38(7):642.e1-642.e9.
15. Alghobary M, Mostafa T. Addiction and human male fertility: A systematic review and a critical appraisal. *Andrology*. 2022;10(6):1073–95.
16. Cohen K, Weizman A, Weinstein A. Positive and Negative Effects of Cannabis and Cannabinoids on Health. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105(5):1139–47.
17. Kilaru A, Chapman KD. The endocannabinoid system. Harwood J, Lloyd-Evans E, editors. *Essays Biochem*. 2020;64(3):485–99.

18. Bovolín P, Cottone E, Pomatto V, Fasano S, Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R. Endocannabinoids are Involved in Male Vertebrate Reproduction: Regulatory Mechanisms at Central and Gonadal Level. *Front Endocrinol.* 2014;5(54):1–8.
19. Nielsen JE, Rolland AD, Rajpert-De Meyts E, Janfelt C, Jørgensen A, Winge SB, et al. Characterisation and localisation of the endocannabinoid system components in the human adult testis. *Sci Rep.* 2019;9(1):12866.
20. Roulet V, Denis H, Staub C, Tortorec AL, Delaleu B, Satie AP, et al. Human testis in organotypic culture: application for basic or clinical research. *Hum Reprod.* 2006;21(6):1564–75.
21. Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Gaudriault P, Zalko D, Antignac JP, Deceuninck Y, et al. Parallel assessment of the effects of bisphenol A and several of its analogs on the human adult testis. *Human Reprod.* 2017;32(7):1465–73.
22. Kristensen DM, Desdoits-Lethimonier C, Mackey AL, Dalgaard MD, De Masi F, Munkbøl CH, et al. Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(4).
23. Matusali G, Houzet L, Satie AP, Mahé D, Aubry F, Couderc T, et al. Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. *J Clin Invest.* 2018;128(10):4697–710.
24. Maamar MB, Lesné L, Desdoits-Lethimonier C, Coiffec I, Lassurguère J, Lavoué V, et al. An Investigation of the Endocrine-Disruptive Effects of Bisphenol A in Human and Rat Fetal Testes. Nadal A, editor. *PLoS ONE.* 2015;10(2):e0117226.
25. Huestis MA, Research Ia. Urinary Excretion Profiles of 11-Nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Humans after Single Smoked Doses of Marijuana. *J Anal Toxicol.* 1996;20:12.
26. Corradi PF, Corradi RB, Greene LW. Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. *Urol Clin North Am.* 2016;43(2):151–62.
27. Vescovi PP, Pedrazzoni M, Michelini M, Maninetti L, Bernardelli F, Passeri M. Chronic effects of marijuana smoking on luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin levels in human males. *Drug Alcohol Depend.* 1992;30(1):59–63.
28. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson AM, Eisenberg ML, et al. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev.* 2016;96(1):55–97.
29. Datta MW, Renshaw AA, Dutta A, Hoffman MA, Loughlin KR. Evaluation of Cyclin Expression in Testicular Germ Cell Tumors: Cyclin E Correlates with Tumor Type, Advanced Clinical Stage, and Pulmonary Metastasis. *Mod Pathol.* 2000;13(6):667–72.
30. Von Eyben FE, Parraga-Alava J. Meta-Analysis of Gene Expressions in Testicular Germ Cell Tumor Histologies. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4487.

D) Discussion et perspectives

1. Discussion des résultats

Il a été montré chez l'homme que le système des ECB est exprimé dans le testicule (Nielsen et al., 2019a) et qu'il intervient dans la régulation de mécanismes primordiaux comme la survie des cellules de Sertoli (Maccarrone et al., 2003; Rossi et al., 2007; Grimaldi et al., 2009b), la spermatogenèse (Grimaldi et al., 2013) et les fonctions spermatiques, jusqu'à la fécondation de l'ovocyte. De plus, les récepteurs spécifiques des cannabinoïdes, CB1 et CB2, et les enzymes de synthèse et de dégradation des ligands endogènes du système sont exprimés par les cellules de Leydig (Nielsen et al., 2019a), suggérant que la signalisation des ECB peut réguler leur activité. Nous avons fait l'hypothèse qu'une exposition du testicule humain adulte à des ligands exogènes du système ECB, comme les phytocannabinoïdes, peut entraîner des altérations de la physiologie testiculaire.

L'objectif principal de ce travail expérimental était d'évaluer les conséquences sur la physiologie testiculaire d'une exposition directe du testicule adulte humain aux deux principaux composants du cannabis, le Δ 9-THC et le CBD, également utilisés en thérapie, à des doses se rapprochant d'une exposition récréationnelle ou thérapeutique *in vivo*. Pour discriminer les effets d'une exposition relativement aiguë à ces deux phytocannabinoïdes d'une exposition plus chronique, deux durées de traitement ont été étudiées : une exposition dite « courte » (48 heures) et une exposition dite « longue » (9 jours).

La testostérone est un facteur majeur de l'activité testiculaire (pour revue : Tyagi et al., 2017; Zhou et al., 2019) et les résultats de la littérature étant conflictuels sur l'effet d'une exposition au cannabis sur la sécrétion de testostérone entre les études *in vitro* et *in vivo* chez l'homme et les espèces modèles (pour revue : Belladelli et al., 2021), nous avons évalué la sécrétion de ce facteur par les explants testiculaires humains adultes exposés à différentes doses de Δ 9-THC et/ou de CBD. L'exposition à du Δ 9-THC et du CBD, seuls ou en mélange, à des doses allant de 10^{-9} à 10^{-5} M pendant 48 heures ou 9 jours n'a pas significativement altéré la sécrétion de testostérone par les explants testiculaires humains adultes. De façon cohérente, les densités des cellules en prolifération ou en apoptose dans le tissu interstitiel,

où se trouvent les cellules de Leydig, n'ont pas révélé de différences entre les différentes conditions et la surface occupée par les cellules de Leydig n'est qualitativement pas modifiée par les différents traitements. L'analyse transcriptomique des explants testiculaires humains adultes n'a quant à elle pas révélé d'altérations dans l'expression de gènes codants pour des protéines impliquées dans la stéroïdogénèse, contrairement à ce qui avait été rapporté dans des études chez le rat *in vitro* (Funahashi et al., 2005) et la souris *in vivo* (Banerjee et al., 2011b). Enfin, les différents traitements ne semblent pas avoir altéré la sensibilité des cellules de Leydig à la LH/hCG comme il avait été rapporté dans une étude *in vitro* chez la souris (Banerjee et al., 2011b) dans notre modèle car l'expression du gène codant pour le récepteur à la LH est apparue similaire dans toutes les conditions.

Dans la littérature consacrée à l'homme, la diminution de la testostérone plasmatique suite à une exposition au cannabis est controversée et une méta-analyse a récemment conclu à une absence de corrélation entre ces deux paramètres (Belladelli et al., 2021a). Si le $\Delta 9$ -THC et du CBD n'altèrent apparemment pas la capacité stéroïdogène des cellules de Leydig dans notre modèle après 48 heures ou 9 jours d'exposition, on ne peut exclure qu'une exposition au-delà de 9 jours puisse avoir un effet perturbateur sur ce paramètre. En effet, parmi trois études ayant observé une diminution de la testostérone plasmatique chez des hommes consommateurs de cannabis, deux d'entre elles l'ont observé après une exposition chronique de plus de 4 semaines (Kolodny et al., 1974a; Cohen, 1976).

Un effet central sur l'hypothalamus ou l'hypophyse du $\Delta 9$ -THC et du CBD doit être envisagé. En effet, une diminution de la sécrétion de GnRH et de LH pourrait induire une perturbation de la sécrétion de testostérone par le testicule. Il a été observé que l'injection *in vitro* de 10^{-6} M de $\Delta 9$ -THC dans le cerveau de rats mâles adultes entraîne une diminution de la sécrétion de GnRH et de LH (Wenger et al., 1987). De même, l'exposition *in vivo* au $\Delta 9$ -THC chez la souris (Dalterio et al., 1978; Mandal and Das, 2010) et chez le rat (Steger et al., 1990; Murphy et al., 1990) entraîne une diminution de la concentration de LH plasmatique. Une étude a également mis en évidence que le CBD est capable de faire apparaître plus tôt cet effet du $\Delta 9$ -THC sur la sécrétion de LH, et de le prolonger (Murphy et al., 1990). Chez l'homme, des études ont mis en évidence une diminution des taux de LH plasmatiques après une consommation aigue de cannabis (Cohen, 1976; Cone et al., 1986) et chez des consommateurs de cannabis chroniques ou fréquents (Cohen, 1976; Vescovi et al., 1992) par

rapport à des hommes non consommateurs. Cependant, cet effet négatif d'une exposition au cannabis sur les niveaux de LH plasmatiques n'est pas retrouvé dans toutes les études chez l'homme (Kolodny et al., 1974a; Block et al., 1991; Feiby L. Nassan et al., 2019) et une méta-analyse a récemment conclu sur l'absence d'altération de la LH plasmatique après une exposition au cannabis (Belladelli et al., 2021a). D'autres analyses *in vivo* et *in vitro* chez l'homme sont nécessaires pour pouvoir conclure sur une altération endocrine de l'axe HHT après une exposition au Δ^9 -THC et/ou au CBD.

Notre étude est en partie basée sur l'observation d'une corrélation entre la consommation de cannabis et le développement de TGCT (Gurney et al., 2015a; Ghasemiesfe et al., 2019a; Song et al., 2020a), qui résultent d'une altération de la différenciation des cellules germinales. Nous avons donc ensuite étudié la capacité du Δ^9 -THC et du CBD à perturber l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules germinales par qPCR. L'expression de DAZL, LIN28A et POU5F1 n'est modifiée par aucun traitement. Ki67 est un marqueur de prolifération, utilisé pour le diagnostic de la progression des TGCT séminomateuses (Due et al., 1988; Datta et al., 2000b) et non séminomateuses (Albers et al., 1995; Heidenreich et al., 1997). Le comptage de cellules Ki67-positives dans les tubes séminifères, contenant entre autres les cellules germinales, n'a pas révélé de différence entre les conditions traitées et témoins. Ces résultats montrent, dans notre modèle, l'absence apparente d'effets du Δ^9 -THC et/ou du CBD sur les cellules germinales en lien avec une transformation cancéreuse.

N'ayant pas mis en évidence une dérégulation de la prolifération ou de la différenciation des cellules germinales, nous nous sommes intéressés à leur viabilité. Chez le rat, le singe et la souris, des altérations histologiques des tubes séminifères, associées avec des perturbations de la spermatogenèse ont été observées après un traitement à différents phytocannabinoïdes, dont le Δ^9 -THC et le CBD (Rosenkrantz and Hayden, 1979; Rosenkrantz et al., 1981; Mandal and Das, 2010). Nous avons donc quantifié l'apoptose dans les tubes séminifères, contenant entre autres les cellules germinales, et les résultats se sont montrés similaires dans toutes les conditions. De plus, l'expression des gènes *Synaptonomal complex protein 3* (SYCP3), *Stimulated by retinoic acid gene 8 protein homolog* (STRA8) et *Meiotic recombination protein REC8 homolog* (REC8), qui sont spécifiques de la méiose, n'a pas montré de modifications après exposition aux différents traitements.

Les tubes séminifères contiennent également les cellules de Sertoli. Ces cellules étant indispensables au bon déroulement de la spermatogenèse (Chojnacka et al., 2016; França et al., 2016; O'Donnell et al., 2022) et une étude ayant mis en évidence que le traitement de cellules de Sertoli humaines *in vitro* avec du CBD dès $7 \times 10^{-6} \text{M}$ pendant 24 heures a un effet cytotoxique sur les cellules de Sertoli (Li et al., 2022), nous avons étudié leur physiologie. Comme décrit plus haut, l'exposition des explants testiculaires à du CBD et/ou du THC de 10^{-9}M à 10^{-5}M n'altère pas significativement le nombre de cellules prolifératives ou en apoptose dans les tubes séminifères. De plus, l'analyse par qPCR de l'expression des gènes codant pour l'inhibine B (IHNB), SOX9 et *Tight junction protein ZO-1* (ZO1), spécifiques de l'activité des cellules de Sertoli, n'a pas révélé de différence entre les conditions traitées et témoins. Ces résultats sont cohérents avec une étude qui a mis en évidence l'absence apparente d'effets sur l'activité des cellules de Sertoli humaines d'une exposition *in vitro* avec du $\Delta 9$ -THC ou du CBD à $6,36 \times 10^{-7} \text{M}$, allant jusqu'à 30 jours de culture (Holmes et al., 1983).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'exposition du testicule humain au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD n'affecte pas la physiologie des tubes séminifères et le bon déroulement de la spermatogenèse. De façon cohérente, deux études chez la souris ont montré que l'exposition chronique au $\Delta 9$ -THC n'altère pas la spermatogenèse (Berryman et al., 1992; López-Cardona et al., 2018).

En conclusion, nos résultats suggèrent l'absence d'effets d'une exposition testiculaire directe à du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD sur deux fonctions principales du testicule, la stéroïdogénèse et la spermatogenèse, à court-terme (48 heures) et à plus long-terme (9 jours).

Il a été montré chez la souris qu'une exposition *in vivo* à de l'extrait de cannabis peut entraîner une modification de la quantité protéique des récepteurs CB1 et CB2 dans le testicule (Banerjee et al., 2011a). Nous avons donc analysé par qPCR l'expression du système des ECB dans les explants testiculaires traités avec un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD à 10^{-5}M pendant 48h. L'expression des enzymes de synthèse et de dégradation principales et du

récepteur CB1 n'est modifiée par aucun traitement (données non publiées). Cette observation suggère qu'un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD n'altère pas la signalisation du système ECB. Les niveaux d'expression de CB2 étant trop faibles, nous n'avons pas été capables de détecter le récepteur CB2 dans les explants testiculaires.

2. Les perspectives

a) Perspectives méthodologiques

(1) Origine des prélèvements

Dans le cadre de notre étude, l'accès à des prélèvements humains s'est révélé avantageux, nous permettant de nous affranchir des différences, parfois conséquentes, qu'il existe entre les espèces.

Cependant, une limite de l'utilisation de ces prélèvements a été leur rareté. En effet, sur mes trois années de présence au laboratoire, nous avons inclus pour cette étude les testicules de 13 patients défunts. L'âge parfois avancé des individus au moment de leur décès et l'exposition de chacun à divers facteurs au cours de leur vie, dont certains ayant des effets toxiques sur la fonction reproductive, ont pu altérer le tissu testiculaire, nous privant de certains échantillons. Il est intéressant de noter que pour certains patients dont les tissus testiculaires nous étaient parvenus, une consommation de cannabis a été rapportée au cours de la vie par la famille au personnel médical. Le protocole expérimental de l'étude présentée ici nécessitant un contrôle précis des doses d'exposition des explants testiculaires humains, supposément vierges d'une exposition au cannabis, ces tissus n'ont donc pas été inclus dans nos analyses. Ils ont cependant été gardés pour un projet annexe, afin d'étudier l'effet d'une consommation *in vivo* de cannabis sur la physiologie testiculaire. Les données issues de ces prélèvements exposés « *in vivo* » seront certainement difficilement interprétables, du fait de leur rareté d'une part mais aussi du manque d'informations précises sur le mode, la période, la fréquence et de la chronicité de la consommation, ainsi que les doses de $\Delta 9$ -THC et de CBD employées.

L'âge très variable entre les patients (le plus jeune étant âgé de 18 ans au moment du décès et le plus vieux âgé de 85 ans) et les différents exposomes de chacun pendant leur vie, ont contribué à une variabilité inter-individuelle importante pour les paramètres investigués au cours de cette étude. Pour atténuer ces deux phénomènes, une stratégie expérimentale reste l'augmentation du nombre d'individus inclus dans l'étude, obligeant une prolongation du projet sur une durée indéterminée.

(2) Culture organotypique

Une des qualités indéniables de ce modèle est sa ressemblance avec la physiologie testiculaire *in vivo*. L'architecture testiculaire et les communications intercellulaires sont préservées, permettant une modélisation plus exacte que d'autres modèles tels que la culture de cellules primaires ou de lignées.

Cependant, son utilisation possède des limites. L'ajout des molécules d'intérêt dans le milieu de culture avec un changement de milieu toutes les 24 heures entraîne une distribution de ces dernières dans le tissu testiculaire potentiellement très différente de la réalité *in vivo*. Le milieu de culture étant statique, il est probable que seule une partie des molécules d'intérêt diffuse dans le tissu, comme il a précédemment été montré dans une étude de notre équipe avec d'autres composés (Desdoits-Lethimonier et al., 2012). De plus, cette approche expérimentale ne permet pas de prendre en compte leur métabolisation *in vivo* par différents organes, dont le foie particulièrement (pour revue : Dinis-Oliveira, 2016) avant d'atteindre le testicule. En outre, si les explants testiculaires humains peuvent être gardés en culture jusqu'à 14 jours, passé cette période, les tissus commencent à dégénérer (Roulet et al., 2006).

Dans le cadre de notre problématique, la possibilité de maintenir les tissus testiculaires humains bien au-delà de 9 jours, paraît pertinente afin de voir les effets du Δ^9 -THC et du CBD à long terme. Plusieurs systèmes alternatifs de culture de tissus testiculaires humains existent désormais (Ibtisham et al., 2017; Sakib et al., 2019; Richer et al., 2020). Une méthode de culture récemment décrite, la microfluidique (Sharma et al., 2022) semble constituer un choix particulièrement approprié pour notre étude. Ce système de culture permet notamment de maintenir le tissu testiculaire viable et fonctionnel pendant une

longue période, jusqu'à 6 mois chez la souris (Komeya et al., 2016; Yamanaka et al., 2018). D'autre part, en reproduisant les caractéristiques d'une circulation sanguine, il permet une diffusion des molécules testées aux tissus lente et continue, donc plus représentative de la réalité physiologique. Enfin, ce système de culture permet d'étudier en temps réel les effets d'une molécule sur plusieurs paramètres, comme la sécrétion de facteurs par exemple. La mise en place de cette méthode est actuellement en cours de mise au point par notre équipe au sein de notre laboratoire sur des explants testiculaires humains adultes. La microfluidique donne également la possibilité de cultiver sur une même puce plusieurs organes, dont les sécrétions sont donc reliées (Ronaldson-Bouchard and Vunjak-Novakovic, 2018; Wu et al., 2020; Picollet-D'hahan et al., 2021). Cette méthode serait particulièrement pertinente pour notre modèle. Afin d'intégrer les effets potentiels de la métabolisation hépatique du $\Delta 9$ -THC et du CBD, il serait par exemple intéressant de pouvoir mettre en place un circuit où le milieu de culture contenant les molécules passe tout d'abord par un fragment de foie avant d'atteindre les explants testiculaires.

(3) Les traitements

Afin de mimer au mieux une exposition *in vivo*, il serait pertinent de déterminer avec précision chez l'homme adulte quelles sont les doses de $\Delta 9$ -THC et de CBD qui atteignent le testicule après une consommation de cannabis, ainsi que leurs différents métabolites, dont certains ont montré des effets reprotoxiques (Jakubovic et al., 1979; Li et al., 2022). Des études se penchant sur la pharmacocinétique de ces deux molécules sont encore nécessaires chez l'homme *in vitro* et *in vivo*.

Au cours de notre étude, des doses de 10^{-9} à 10^{-5} M de $\Delta 9$ -THC et de CBD ont été utilisées. Comme dans toute étude toxicologique, il serait judicieux de doser de façon régulière au cours du projet les différentes concentrations de $\Delta 9$ -THC et CBD ajoutées dans le milieu de culture afin de constater si elles correspondent bien aux concentrations définies.

Il a été montré chez des usagers chroniques ou fréquents de cannabis, que le $\Delta 9$ -THC peut s'accumuler dans les tissus adipeux et être redistribué progressivement (Johansson et al., 1989), entraînant l'augmentation de sa C_{max} plasmatique ainsi qu'une prolongation de sa demi-vie (Toennes et al., 2008; Mason et al., 2021). On peut donc considérer que les

testicules d'hommes consommateurs de cannabis réguliers, en particulier les consommateurs chroniques, sont exposés à des doses plus fortes de phytocannabinoïdes que les consommateurs occasionnels.

D'autre part, il a été observé que la co-administration du CBD avec le $\Delta 9$ -THC pouvait entraîner des modifications de la pharmacocinétique de ce dernier. Chez l'homme, la majorité des études existantes à ce jour n'ont pas mis en évidence d'influence significative du CBD sur la pharmacocinétique du $\Delta 9$ -THC (Hunt et al., 1981; Agurell et al., 1981; Bhattacharyya et al., 2010; E L Karschner et al., 2011; Erin L Karschner et al., 2011b; Englund et al., 2013). Cependant, deux études ont montré que la co-administration de CBD et de $\Delta 9$ -THC entraînent une augmentation du $\Delta 9$ -THC plasmatique selon un ratio CBD/ $\Delta 9$ -THC égal à 0,6 (Nadulski et al., 2005), égal à 1,3 (van de Donk et al., 2019a) ou égal à 1 (Arkell et al., 2019). Une des hypothèses avancées pour expliquer ce résultat est que le CBD est capable d'inhiber le métabolisme hépatique du $\Delta 9$ -THC (Paton and Pertwee, 1972; Bornheim et al., 1995; Bornheim and Grillo, 1998; Nadulski et al., 2005 ; pour revue : Bansal et al., 2020; Nasrin et al., 2021). L'inhibition du métabolisme hépatique du $\Delta 9$ -THC plasmatique entraîne en conséquence son augmentation plasmatique dans des études chez le rongeur (Bornheim et al., 1995; Klein et al., 2011; Hložek et al., 2017) et certaines études chez l'homme (Nadulski et al., 2005; van de Donk et al., 2019b; Arkell et al., 2019).

Enfin, il n'est pas impossible que les phytocannabinoïdes étudiés au cours de ce projet adoptent une pharmacocinétique particulière, comme il est observé avec certains perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire à ne pas présenter d'effet-dose linéaire.

Une perspective de ce projet pourrait donc être l'étude de doses plus et moins élevées de $\Delta 9$ -THC et de CBD que celles testées au cours de cette étude ainsi que des ratios différents.

La majorité des études chez l'homme ayant observé des effets négatifs d'une consommation de cannabis sur la fonction reproductive, sont des études épidémiologiques. Les études investiguant l'effet d'un ou plusieurs composants spécifiques du cannabis chez l'homme restent largement minoritaires. Nos observations des effets du $\Delta 9$ -THC et du CBD ne permettent pas d'exclure des effets potentiels négatifs d'autres composants du cannabis sur le testicule, comme les terpènes, qui sont capables de moduler certains effets des

phytocannabinoïdes (Russo, 2011; Singh and Sharma, 2015; Booth and Bohlmann, 2019; Sommano et al., 2020; Gonçalves et al., 2020).

(4) Evaluation de la physiologie testiculaire

Au vu de l'extrême variabilité inter-individuelle existante dans notre modèle, il serait pertinent d'augmenter le nombre de réplicats biologiques dans nos analyses. Des effets discrets d'une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD pourraient alors être révélés sur certains paramètres physiologiques testiculaires étudiés au cours de ce projet.

La sécrétion d'autres facteurs importants pour la physiologie testiculaire comme l'activine A et de l'inhibine B par les cellules de Sertoli (de Kretser et al., 2004a; Hedger and Winnall, 2012) ou l'INSL3 par les cellules de Leydig (Ivell et al., 2013), pourrait également être investiguée.

Pour compléter les résultats de qPCR, il serait intéressant d'obtenir des données de l'impact de nos différents traitements sur un plus grand nombre de gènes, impliqués dans la différenciation, l'auto-renouvellement, la survie et l'activité biologique des différents types cellulaires, pour éventuellement détecter des effets des traitements qui ne seraient pas encore visibles au niveau histologique et endocrine. Une approche moins contraignante et plus exploratoire que d'effectuer de multiples qPCR serait d'étudier nos échantillons par *Bulk RNA Barcoding and sequencing* (BRB-seq), une méthode de séquençage des ARN du génome entier que nous avons employé dans notre étude sur le testicule humain fœtal. Les effets du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD pourraient n'affecter qu'un nombre restreint de cellules dans le tissu testiculaire. L'analyse de l'expression d'un grand nombre de gènes selon chaque type cellulaire, par single-cell RNA-seq serait pertinente.

Enfin, deux études ont observé que l'exposition au cannabis de rongeurs entraînait l'induction d'un stress oxydant chez les animaux (Mandal and Das, 2010; Alagbonsi et al., 2016). Ce stress oxydant a été corrélé avec des altérations de la physiologie testiculaire, telles que la diminution significative du poids testiculaire, une réduction du nombre de spermatogonies, des altérations tubulaires et un arrêt de la spermatogenèse (Mandal and

Das, 2010). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de gènes impliqués dans des mécanismes antioxydants et d'investiguer la production des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species*, ROS) dans les explants testiculaires exposés aux différents traitements de phytocannabinoïdes. L'augmentation de leur quantité après 48 heures ou 9 jours de traitements pourrait constituer un signe annonciateur d'une altération tissulaire prochaine.

b) Pour aller plus loin : relation entre cannabis et TGCT

Afin d'investiguer de façon mécanistique la corrélation qui a été établie entre la consommation de cannabis et le développement de TGCT dans des études épidémiologiques chez l'homme, il serait intéressant de caractériser l'expression du système des ECB dans les TGCT. Des différences d'expression des récepteurs et/ou des différentes enzymes de ce système entre les TGCT et des tissus testiculaires sains pourraient apporter des pistes de réflexion sur l'implication du système dans l'apparition et la progression tumorale dans ce tissu.

Les TGCT dont la fréquence d'apparition est corrélée avec la consommation de cannabis, dériveraient de lésions pré-cancéreuses formées au cours de la vie fœtale, les GCNIS (Skakkebaek, 1972). Ces GCNIS resteraient en quiescence pendant la vie fœtale et l'enfance des individus, pouvant accumuler des mutations supplémentaires, jusqu'à une ré-activation à partir de la puberté, qui mèneraient à une progression maligne des GCNIS en TGCT (Looijenga et al., 2011). L'exposition à du Δ^9 -THC et/ou au CBD pourrait constituer ce signal de ré-activation des GCNIS. L'observation de l'expression du système des ECB dans les GCNIS nous permettrait d'établir dans quelle mesure ce système peut être acteur de la formation des GCNIS et même éventuellement de leur transformation en TGCT. Pour investiguer ces hypothèses, une collaboration a récemment été mise en place avec Niels Skakkebaek et son équipe à Copenhague, le laboratoire recevant de façon régulière des biopsies testiculaires et des prélèvements provenant d'orchidectomies contenant des TGCT et des GCNIS.

Un modèle particulièrement pertinent pour notre projet serait d'ailleurs la possibilité de cultiver des GCNIS. Pour tester notre hypothèse selon laquelle une exposition de ces

tissus avec certains composants du cannabis entraîne leur réactivation et leur transformation en TGCT, une méthode pourrait s'agir de les traiter avec les conditions employées dans notre étude (Δ^9 -THC et/ou CBD) et d'étudier plusieurs paramètres endocrines, paracrines, histologiques et transcriptomiques. Si ce modèle a récemment été décrit dans une étude (Andreassen et al., 2022), le temps de culture possible est cependant encore limité.

CHAPITRE II. CARACTERISATION DU SYSTEME DES ENDOCANNABINOIDES ET EFFETS DE L'EXPOSITION DU TESTICULE HUMAIN FŒTAL AU Δ 9-THC ET/OU AU CBD

Le second chapitre de ce travail de thèse est d'une part, consacré à la caractérisation du système des ECB dans le testicule humain au cours du développement, et d'autre part décrit les effets de l'exposition du testicule humain fœtal à du Δ 9-THC et du CBD en utilisant un modèle de culture organotypique *ex vivo*.

A) Résumé en français

La légalisation du cannabis à des fins récréatives ou thérapeutiques fait l'objet de débat dans de nombreux pays. La consommation régulière de cannabis chez l'homme a été associée avec l'augmentation de l'incidence des tumeurs des cellules germinales testiculaires (*Testicular germ cell tumors*, TGCT), qui constituent le cancer le plus fréquent chez l'homme entre 15 et 40 ans. Les TGCT, proviendraient d'une altération de la différenciation des cellules germinales au cours de la vie fœtale, entraînant l'apparition de lésions pré-cancéreuses, qui seraient ré-activées à partir de la puberté par l'exposition à des substances environnementales (par exemple des médicaments ou des produits chimiques). Le cannabis est la drogue la plus consommée chez la femme enceinte et cette consommation est en augmentation dans le monde ces dernières années. Dans ce contexte, nous avons cherché à savoir si l'exposition au cannabis peut affecter la physiologie et plus particulièrement la différenciation des cellules germinales dans le testicule fœtal. Les cannabinoïdes endogènes et exogènes agissant sur un système endogène appelé le système des endocannabinoïdes (ECB), nous avons d'abord investigué la présence de l'expression de ce système dans le testicule fœtal humain, de 6 à 17 semaines de développement (SD). Nos résultats mettent en évidence l'expression de récepteurs et d'enzymes du système des ECB dans ce tissu, et la présence des deux ligands endogènes les mieux caractérisés, le 2-arachidonylglycérol (2-AG) et à moindre niveau,

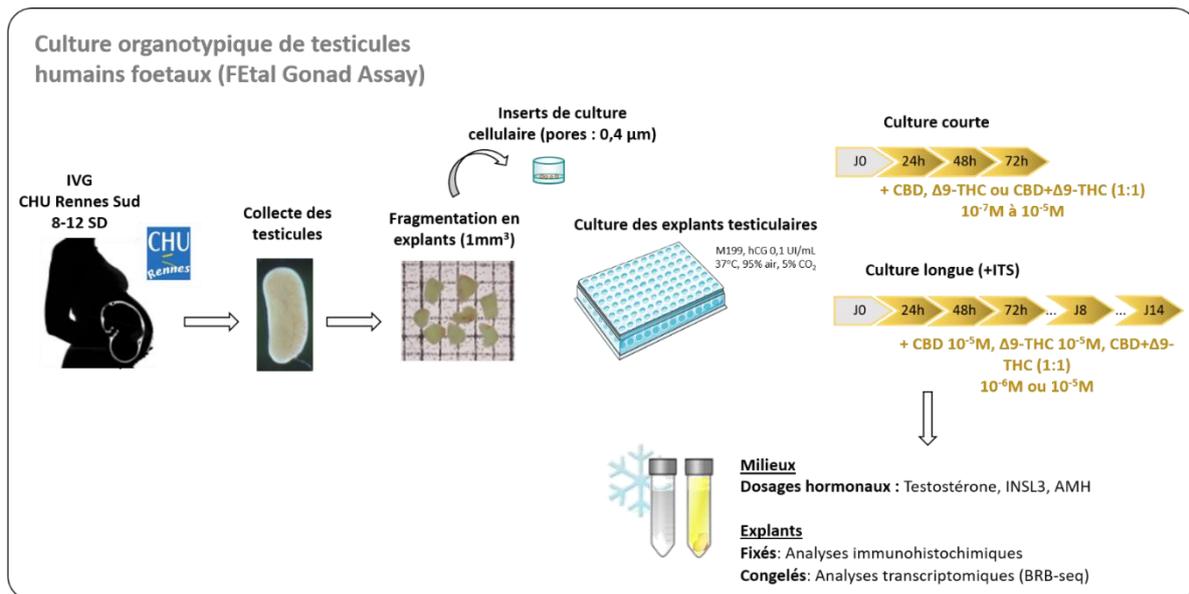


Figure 33 : Procédures expérimentales relatives au modèle d'explants testiculaires humains foetaux *ex vivo*

Des explants testiculaires humains foetaux ont été exposés à du CBD seul, du Δ9-THC seul et un mélange équimolaire de CBD et de Δ9-THC (CBD+Δ9-THC 1 :1), à des doses allant de 10⁻⁷M à 10⁻⁵M pendant 72 heures (h) (culture courte) ou à une dose de 10⁻⁵M pour le CBD et le Δ9-THC seuls et à des doses de 10⁻⁶M et 10⁻⁵M pour le CBD+Δ9-THC 1 :1 pendant 14 jours (D) (culture longue). Lors des cultures courtes et longues, les explants ne sont pas exposés aux drogues pendant les 24 premières heures (J0), permettant d'obtenir des valeurs basales de sécrétions hormonales et paracrines pour chaque puit. Un mélange d'insuline, de transferrine et de sélénium (ITS) est ajouté dans le milieu de culture des cultures longues. Les milieux de culture sont collectés et changés toutes les 24 heures, et les explants sont récupérés à la fin de la culture et analysés.

l'anandamide (AEA). Nous avons ensuite étudié les effets des deux principaux composants du cannabis, le (-)- Δ 9-trans-tétrahydrocannabinol (Δ 9-THC) et le cannabidiol (CBD) sur le testicule foetal humain. Des explants testiculaires humains du premier trimestre, recueillis après des interruptions volontaires de grossesse, ont été cultivés en culture organotypique et exposés à du CBD, du Δ 9-THC ou à un mélange équimolaire de Δ 9-THC et de CBD à des concentrations allant de 10^{-7} M à 10^{-5} M pendant 72 heures et 14 jours. L'exposition des explants testiculaires au Δ 9-THC et/ou au CBD a altéré la prolifération et la viabilité des cellules dans ce tissu, la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig et la sécrétion d'AMH par les cellules de Sertoli. L'analyse transcriptomique réalisée par Bulk RNA barcoding and sequencing sur des explants testiculaires exposés au Δ 9-THC et/ou au CBD par rapport aux explants non exposés a montré l'expression différentielle de 187 gènes, dont certains impliqués dans le métabolisme du cholestérol, la réponse aux substances toxiques et la régulation de la prolifération. A ce stade, nos résultats ne montrent pas d'altérations de la différenciation des cellules germinales dans les conditions testées dans cette étude. Nous avons caractérisé pour la première fois la présence du système des ECB dans le testicule humain foetal et nos résultats révèlent l'effet potentiellement négatif de la consommation de cannabis chez les femmes enceintes sur le développement de la fonction reproductive chez le mâle.

B) Matériel et méthodes

Le protocole expérimental utilisé dans cette étude est illustré en **Figure 33**.

La collaboration avec le centre d'interruptions volontaires de grossesse (IVG) de l'Hôpital Sud de Rennes permet à notre équipe de recueillir presque quotidiennement des prélèvements foetaux, âgés de 5 à 14 SD depuis la loi du 2 mars 2022 (12 SD avant cette date), après consentement éclairé des femmes et conformément aux directives de l'Agence de la biomédecine.

L'ensemble des expérimentations relatives à la description du système des ECB dans le testicule humain foetal s'est déroulé sur des testicules foetaux non cultivés. Dans cette partie, des données de RNA-sequencing (RNA-seq) de testicules foetaux entiers (*bulk RNA-*

seq) ou selon chaque type cellulaire (*single cell RNA-seq*) acquises dans le cadre d'autres projets ont été réinterrogées afin d'étudier l'expression de plusieurs composants du système des ECB dans des testicules fœtaux âgés de 6 à 17 SD. La localisation *in situ* du récepteur CB1 dans le testicule fœtal humain a été observée par immunohistochimie réalisée sur un individu âgé de 9,2 SD. Le dosage des ligands endogènes, l'AEA et le 2-AG a été réalisé par chromatographie en phase liquide à haute performance (*High performance liquid chromatography*, HPLC) sur des testicules entiers provenant de plusieurs individus âgés de 7 à 12 SD. La détection *in situ* de l'AEA et du 2-AG dans le testicule humain fœtal a été permise par une technique de spectrométrie de masse spécifique, la désorption-ionisation laser assistée par matrice (*Matrix assisted laser desorption ionisation*, MALDI) sur un individu âgé de 11 SD.

La seconde partie de cette étude a consisté à étudier les effets d'une exposition au Δ 9-THC et du CBD sur le testicule humain fœtal. Pour ceci, nous avons utilisé un modèle de culture organotypique d'explants testiculaires fœtaux humains (*Fetal gonad assay*, FEGA), décrit dans de nombreux papiers (Lambrot et al., 2006b, 2006a, 2009; Habert et al., 2010; N'Tumba-Byn et al., 2012; Tartarin et al., 2012; Eladak et al., 2018) et standardisée au sein de notre laboratoire (Mazaud-Guittot et al., 2013; Ben Maamar et al., 2015, 2017). Nous avons travaillé, lors de cette étude, sur des prélèvements fœtaux âgés de 8 à 12 SD, une fenêtre définie comme étant particulièrement importante pour le développement testiculaire et sensible à l'exposition aux molécules environnementales (Welsh et al., 2008; van den Driesche et al., 2017). La physiologie testiculaire étant différente selon l'âge au cours du développement fœtal, nous avons distingué deux classes d'âges : les testicules fœtaux âgés de 8 à 10 SD et de 10 à 12 SD. Pour réaliser ces cultures, le testicule fœtal est fragmenté en explants de 1mm³ qui sont placés sur des inserts, à raison de 3 explants par inserts pour chaque condition pour les études immunohistochimiques ou de 4 explants par inserts pour les études transcriptomiques.

Dans cette étude, les effets du Δ 9-THC et du CBD seuls ou en mélange équimolaire ont été étudiés. N'ayant que peu d'informations sur le transfert materno-fœtal chez l'humain, les doses testées sont basées sur les données de pharmacocinétique obtenues sur l'homme adulte. Nous avons traité les explants testiculaires avec des concentrations de Δ 9-THC et et/ou de CBD allant de 10⁻⁷ à 10⁻⁵M afin d'observer d'éventuels effets doses. Nous avons

étudié l'impact d'une exposition dite « courte » au $\Delta 9$ -THC et au CBD, en traitant les explants testiculaires fœtaux pendant 72 heures, ce qui nous a permis de modéliser une consommation maternelle aiguë de ces phytocannabinoïdes. La mise au point d'un nouveau protocole expérimental nous a récemment permis le maintien en culture des explants testiculaires fœtaux pendant 14 jours. Cette exposition dite « longue » permet de s'approcher d'une consommation maternelle chronique de $\Delta 9$ -THC et de CBD, un mode de consommation potentiellement plus représentatif de la réalité.

Les effets d'une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD sur la capacité de sécrétion des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig a été étudié par le dosage de plusieurs facteurs dans les milieux de culture. Pour chaque individu, les explants ont été récupérés en fin de culture et ont été utilisés, soit pour étudier l'impact des différents traitements sur l'expression d'un grand nombre de gènes par BRB-seq, soit pour étudier par immunohistochimie la prolifération et l'apoptose dans le tissu et les types cellulaires principaux du testicule - les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les gonocytes. En immunohistochimie, on distingue le compartiment dit intracordonal, qui correspond aux cordons séminifères, et le compartiment extracordonal, qui correspond au tissu interstitiel.

C) Article rédigé

Exposure of embryonic human testis tissue to cannabinoids THC and CBD impact biological processes required for germ cell differentiation during development

J. Dochez-Arnault¹, C. Desdoits-Lethimonier¹, I. Matias², M. Lagarrigue-Reboutier¹, F. Chalmel¹, B. Evrard¹, A. Lardenois¹, C. Lindskog Bergström³, S. Mazaud-Guittot¹, N. Dejuq-Rainsford^{1#}, A. Gely-Pernot^{1##} (#Co-last Authors)

¹Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France.

²Neurocentre Magendie - Inserm U1215 - Bordeaux, France.

³Uppsala University, Disciplinary Domain of Medicine and Pharmacy, Faculty of Medicine, Department of Immunology, Genetics and Pathology, Clinical and experimental pathology.

*Correspondence address: Inserm (Institut National de la santé et de la recherche médicale), Irset - Inserm UMR 1085 (Institut de recherche en santé, environnement et travail), 9 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35000 Rennes, CEDEX, France. Tel: +33 (0) 6 24 10 86 67; E-mail: aurore.gely-pernot@ehesp.fr

N. Dejuq-Rainsford and A. Gely-Pernot contributed equally to this work

Abstract

The regular use of cannabis by young men has been associated with an increased incidence of testicular germ cell tumors (TGCT). TGCT, the most common cancer in young adults, is believed to arise from an alteration of testicular fetal germ cells differentiation during development, with a possible subsequent environmental trigger (e.g. drugs or other chemicals) during puberty or adulthood leading to cancer. Cannabis consumption by pregnant women is currently increasing worldwide, and legalization for its recreational and therapeutic purposes is debated in numerous countries. In this context, we aimed to determine whether cannabis exposure can affect germ cells development in the fetal testis. Since cannabinoids act on an endogenous system called the endocannabinoid system (ECS), we first investigated the presence of these signaling pathways in the human fetal testis, from 6 to 17 developmental weeks. Our results highlight the expression by the fetal testis of components of the ECS with the presence in this organ of two key endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol (2-AG) and to a lower level, anandamide (AEA). We next investigated the effects of the two main components of cannabis, (-)- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), on the whole human fetal testis ex vivo. To this end, human fetal testicular explants collected from first trimester legal abortions were exposed to CBD, THC or CBD/THC [ratio 1:1] at concentrations ranging from 10^{-7} to 10^{-5} M during 72h to 14 days. Phytocannabinoids treatments affected fetal testicular cell proliferation and viability, as well as testosterone secretion by Leydig cells and AMH secretion by Sertoli cells. Transcriptomic analysis performed by BRB-seq on exposed versus unexposed fetal testis explants showed 187 differentially expressed genes (DEGs), some of which involved in toxic substances

response and steroid synthesis. In conclusion, our study provides the first evidence of the presence of ECS in human fetal testis and support a potential adverse effect of cannabis consumption in pregnant women on the male reproductive function development.

Introduction

Cannabis is the most widely used drug in the world. It is also the most commonly consumed drug by pregnant women. In western countries, up to 20% of pregnant women consume cannabis during pregnancy (Young-Wolff et al. 2019). In the United States, while fetal exposure to tobacco decreases, the cannabis use during pregnancy increases along with the enhanced perception that there are no risks with cannabis consumption during pregnancy (Jarlenski et Spencer 2022). Studies have described an increase of cannabis use from 3.4 to 7% among pregnant women in the US during this last decade (Volkow et al. 2019). To date, data on pregnant women consumption remain rare and the use of self-reported questionnaires does not always reflect the real exposure. Thus a study investigating the presence of cannabinoids in the meconium of newborns highlighted the presence of cannabis compounds in 5.3% of the samples, whereas 1.7% of mothers self-reported cannabis use (Lozano et al. 2007).

The main components of recreational cannabis are the D9-tetrahydrocannabinol (THC) and the cannabidiol (CBD). These compounds have been found to cross the placental barrier (Blackard et Tennes 1984; Falcon et al. 2012; Monfort et al. 2022) and THC, which is responsible for the psychoactive effects of marijuana, is measured in fetal blood after maternal ingestion at one-third to one-tenth of maternal concentration (Grotenhermen 2003; Hutchings et al. 1989). THC and CBD act on specific cannabinoid receptors called CB1 and CB2. Both of these receptors also respond to naturally synthesized cannabinoids, namely anandamide (AEA) and 2-arachidonyl-glycerol (2-AG), so-called endocannabinoids (eCA). In addition to the eCA and their receptors, this endocannabinoid system (thereafter called ECS) comprises synthesis and degradation enzymes and transporters (Ligresti, De Petrocellis, et Di Marzo 2016).

AEA and 2-AG both derive from membrane phospholipid precursors and arachidonic acid. For the synthesis of AEA, phosphatidylethanolamine and arachidonic acid are transformed into N-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine (NAPE) by the enzyme N-acyltransferase (NAT). Then, the phospholipase NAPE-PLD converts NAPE into AEA and phosphatidic acid. Instead, for 2-AG production, phosphatidylinositol is transformed in 1,2 diacylglycerol (1,2 DAG) by the phospholipase C (PLC), then into 2-AG by the diacylglycerol lipase a or b (DAGL a or b). The levels of eCA are tightly regulated. AEA is metabolized by the fatty acid amide hydrolase (FAAH), whereas 2-AG is inactivated by the monoacylglycerol lipase (MAGL). Both AEA and 2-AG are synthesized and metabolized by alternative pathways involving different enzymes.

THC is a partial agonist with high affinity for both CB1 and CB2. The psychotropic effect of cannabis is solely triggered by THC binding to the CB1 receptor. CBD is the major non-psychotropic compound of cannabis. It has a low affinity and is thought to be a negative allosteric modulator for CB1. CBD displays a weak inverse agonism at CB2 and may also act as an “indirect” CB1/CB2 agonist by weakly inhibiting AEA enzymatic hydrolysis or by increasing the level of 2-AG. CB1 and CB2 receptors are coupled to G proteins and activate a number of intracellular signaling pathways. CB1 and CB2 are the receptors for eCA, which play fundamental physiological role in the brain and peripheral tissues, as well as in many pathological conditions (Ligresti, De Petrocellis, et Di Marzo 2016).

Several studies have now highlighted an association between cannabis consumption and testicular germ cell tumors (TGCTs) development, suggesting that recreational and therapeutic uses of cannabinoids (CA) may represent a risk factor for the development of testis cancer in human (J. Gurney et al. 2015; Callaghan et al. 2017). TGCT, which is the most common cancer in young men, is believed to partly originate from a dysregulation of fetal germ cells (gonocytes or Primordial Germ Cells (PGCs)) differentiation (Rajpert-De Meyts et Høie-Hansen 2007). In adults, ECS is involved in reproductive function at both central and gonadal levels (Grimaldi, Di Giacomo, et Geremia 2013). While we previously described the expression and localization of ECS in the human adult testis (Nielsen et al. 2019b), we failed

to detect a negative effect of cannabis exposure onto this organ *ex vivo* (Da Silva et al. 2022). To date, the expression of the ECS in the human fetal testis has never been investigated and the potential effects of cannabis exposure on the developing testis are unknown.

In this context, the aim of our study was to investigate the expression and localization of the ECS components in the human fetal testis and to determine whether cannabis exposure can affect germ cells development *ex vivo*, in order to unveil a potential role of cannabis consumption during pregnancy in the onset of testis cancer during adulthood.

To this end, we first investigated the expression of ECS transcripts by bulk and single cell RNAseq and analyzed the presence of eCA in fetal testis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and their localization by MALDI imaging. To understand the potential effect of the two main cannabinoid components, i.e. CBD and THC, on gonadal development and the potential role of ECS in embryonic germ cell differentiation, we next used our well characterized organotypic culture of human embryonic testis of the first trimester of pregnancy (Mazaud-Guittot et al. 2013), incubated with a range of an equimolar mixture of CBD and THC or each molecule alone. The tissue morphology, the apoptosis, the proliferation and gene expression of the main cell types of the testis and the endocrine function were investigated. Taken together, our data demonstrate for the first time that the ECS components are present in the human fetal testis and uncover the impact of phytocannabinoids on the development of human fetal germ cell *ex vivo*.

Material and methods

Chemicals

In order to analyze the effects of a maternal consumption of cannabis on the first trimester fetal testis, we tested a range of concentrations of THC and CBD, chosen based on the available data. Pharmacokinetic data indicate that peak plasma concentrations (C_{max}) in adults differ depending on the mode of administration of cannabis. When smoked, which is the most common consumption method, C_{max} usually reaches $10^{-7}M$ (Kauert et al. 2007) depending on the individual. Moreover, cannabinoid pharmacokinetic may differ from occasional to heavy users and according to the user's age (Grant et al. 2018). Since only few studies assessed the quantitative relation between mother consumption and the distribution

of phytocannabinoids in the placental and fetal compartment are available, and in order to investigate potential dose-response effects, we chose to study a large range of concentration from 10^{-7} M to 10^{-5} M.

CBD (Axon Medchem, Netherlands) was diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) solution, while THC (Sigma Aldrich; CAS number 1972-08-3, USA) was diluted in ethanol (EtOH) solution. The same amount of DMSO, EtOH, and a mixture of DMSO and EtOH were used as controls for CBD, THC, and THC/CBD mixture, respectively.

Human fetal testis collection and ethic approval

First trimester (7-12 gestational weeks) human fetuses were obtained from pregnant women following legally induced abortion performed in Rennes Sud Hospital. This age range represents a relevant window of sensitivity for the developing human testis, as crucial testicular functions establish at these ages (Rey, Josso, et Racine 2000). None of the pregnancy terminations were due to fetal abnormalities. All women received information and gave verbal and written informed consent in accordance with national guidelines enacted by the French Agency for Biomedical Research (Agence de la biomédecine, authorization #PFS09-011). The local ethic committee of Rennes hospital (advice #11-48) approved the protocol. The aspiration product was placed at 4°C after collection and rapidly processed. The testes were recovered from the aspiration product under a binocular microscope (Olympus SZX7, Lille, France) and immediately placed in cold phosphate-buffered saline (PBS) solution.

Organotypic cultures

The fetal testes were cut into explants of 1mm^3 and placed in cell culture inserts ($0,4\mu\text{m}$ pores, Falcon, Becton-Dickison, Le Pont de Claix, France) put in 24-well companion culture plates (Falcon, Becton-Dickison) according to a standardized protocol previously described (Mazaud-Guittot et al. 2013; Maamar et al. 2015; Ben Maamar et al. 2017). On each insert, 3 or 4 testicular explants were placed and cultivated in $350\mu\text{l}$ of phenol red-free medium 199 (Invitrogen Life Technologies, Saint-Aubin, France) supplemented with $50\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France) and $2,5\mu\text{g}/\text{mL}$ Fungizone (Sigma-Aldrich). As determined in previous experiments, human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma-Aldrich)

was added to a final concentration of 0,1 IU/mL in order to maintain steroidogenic responsiveness of the testicular tissue (Mazaud-Guittot et al. 2013; Maamar et al. 2015). The cultures were incubated at 37°C for 96h in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. The medium was removed every 24 h and divided into 2 aliquots that were immediately snap-frozen on dry ice and stored at -80°C. Explants were cultured in 199 medium supplemented with hCG for the first 24 h of culture (D0) without any drug, in order to define a baseline for hormone production in each well. This allows normalization of the explants secretory capacity when the drugs are added, as we described (Mazaud-Guittot et al. 2013). After D0, the explants were exposed to treatments by adding CBD and/or THC at concentrations of 10⁻⁵M, 10⁻⁶M or 10⁻⁷M to the medium to assess dose-response effects of the molecules, or to dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and/or ethanol, the solvents of CBD and THC, respectively.

For the 15 day-long culture, insulin, transferin, selenium (ITS, Corning, Ref 354352) were added to the previously described culture medium. In this case, explants were cultured the first 24 h of culture without drugs and then with either control, CBD 10⁻⁵M, THC 10⁻⁵M, CBD/THC 10⁻⁶M or CBD/THC 10⁻⁵M. The medium was changed every 48h and kept frozen at -80°C at day 4 (D4), D8 and D14 for subsequent analysis.

MALDI imaging

At 11 developmental weeks (DW) human fetal testis was embedded in carboxymethylcellulose (M-1 embedding matrix, Thermo Scientific) then frozen on dry ice and stored at -80°C. Sections 10 µm thick were prepared with a CM 3050S cryostat (Leica) at -17°C and thaw-mounted onto a glass slide coated with indium tin oxide (Bruker). The MALDI matrix solution was composed of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) at 50 mg.mL⁻¹ in methanol/water/trifluoroacetic acid (70/30/0.1). An HTX M5 sprayer (HTXImaging) was used to deposit the DHB solution on the slide by performing 8 passes at a spray temperature of 75°C and a flow rate of 0.1 mL.min⁻¹. The tissue section was analyzed in positive ion mode on a 7 T MALDI-FT-ICR SolariX XR mass spectrometer (Bruker). Spectra were acquired in the m/z 150-900 mass range with a resolving power of 130000 at m/z 400 and a lateral

resolution of 10 μm . Every spectrum was calibrated with internal lock masses. MALDI images were reconstructed and normalized on root mean square using the fleximaging 5.0 software.

Endocannabinoids measurements

Testes were removed, flash frozen and stored at -80°C until analysis. Measurements of anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) were carried out as previously described (Lourenço et al., 2011). Briefly, tissues were homogenized and extracted by liquid-liquid extraction with chloroform/methanol/Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (2:1:1, vol/vol) containing internal deuterated standards (AEA-d4, PEA-d4, OEA-d4 and 2-AG-d5). Phase separation was facilitated by centrifugation at 10 000 g for 2 min. The lipid-containing organic phase was concentrated on an N2 stream evaporator, while the protein-containing aqueous phase was treated with trichloroacetic acid (TCA) in order to precipitate the protein. Protein amounts were determined by the Lowry method using the BCA protein Pierce (ThermoScientific, CA) assay with bovine serum albumin (BSA) as standards. The dried lipid extracts were then subjected to isotope-dilution liquid chromatography-chemical ionization-tandem mass spectrometric analysis. Mass spectral analyses were performed on a TSQ Quantum Access triple quadrupole instrument (Thermo-Finnigan) equipped with an APCI source (atmospheric pressure chemical ionisation) and operating in positive ion mode. The TSQ Quantum Access triple quadrupole instrument was used in conjunction with a Surveyor LC Pump Plus (Supelco C18 Discovery Analytical column) and cooled autosampler. The amounts of anandamide, palmitoylethanolamide (PEA), oleoylethanolamide (OEA) and 2-AG were determined by isotope-dilution using a calibration curve and expressed as pmol by mg of proteins.

Hormone measurement

Hormones levels were measured in the culture medium of testis explants at D0 and after 72h of CBD and/or THC exposure and at D0, D4, D8 and D14 for the long-term culture experiments. Each sample was assayed in duplicate for all hormone measurements. Testosterone levels were assayed with a specific radioimmunoassay (RIA) kit (Beckman Coulter, Ref IM1119), according to the kit manufacturer's instructions. Insulin-like factor 3

(Insl3) levels was measured using a specific RIA kit according to the kit manufacturer's instructions (Phoenix, Ref RK-035-27). Anti-Müllerian Hormone (AMH) levels were assayed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (Beckman Coulter, Ref A79765). The hormone assay values are all expressed as fold change compared to the mean of their respective control, after a normalization of hormone production with D0 values for each sample.

Immunohistochemistry and cell counting

Immunohistochemistry (IHC) was performed on Bouin solution-fixed, paraffin-embedded, 5µm-thick sections of testis explants. Each fifth section was used for immunohistochemical analysis with cell-specific labeling, as previously described (Mazaud-Guittot et al, 2013; Ben Maamar et al, 2017). Following dewaxing and rehydration, antigen retrieval was performed for all immunostaining by treating the sections with 10mM citrate buffer (pH 6.0) at 80°C for 45 minutes or Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA buffer (pH 9.0) at 80°C for 30 minutes before cooling them at room temperature. Non-specific sites were then blocked with a 10% BSA or chicken serum treatment for 1 hour at room temperature and sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted in Dako antibody diluent (Dako, Ref S3022) or PBS-Tween 0,01%.

Leydig cells were labeled with a rabbit primary antibody directed against the cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (CYP11a1) (1:250, Sigma-Aldrich, Ref HPA016436). Germ cells were stained with a Lin28 rabbit primary antibody (1:800, Abcam, Ref Ab462020). Sertoli cells were labeled with an AMH goat primary antibody (1/200, Santa-cruz, Ref sc6886). For apoptosis assessment, histological sections were labeled with a polyclonal rabbit primary antibody directed against cleaved caspase-3 (1:100; Cell Signaling Technology, Ref 9661) and then with the secondary antibody as previously described (Desdoits-Lethimonier et al. 2012). For proliferation assessment, histological sections were labeled with a monoclonal mouse primary antibody directed against Ki-67 (1:100; Dako, Ref M7240) and then a biotinylated polyclonal goat anti-mouse secondary antibody (1:500, Dako). Signal corresponding to the secondary antibody binding on its target was amplified by incubation with an avidin and biotinylated enzyme complex (ABC Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories). Sections were developed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Aldrich) and then counterstained with Masson's Hemalun and Lithum

Carbonate before dehydration. Between all steps (except between blocking of non-specific sites and the first antibody incubation), sections were washed using Phosphate Buffer Saline (PBS) with 0,1% of Tween 20 detergent (Sigma-Aldrich).

The number of germ cells (Lin28 positive cells) was determined by counting the positive cells in 8-12 randomly selected histological explant sections of each condition, using a light microscope (Bh2 Olympus Microscope) coupled to Mercator Expert Software (Explorer NOVA). To quantify the number of cells in apoptosis (Caspase-3 positive cells) or proliferation (Ki67 positive cells), positive cells were counted in the seminiferous cords (including germ and Sertoli cells) and interstitial tissue (including Leydig cells) in 8-12 randomly selected histological explant sections of each condition, giving so-called "intracordonal" and "extracordonal" counting values. The surface area of each section was measured and data presented as cell number per surface area unit. Relative Leydig cell area was estimated by relating the surface occupied by Leydig cells (CYP11A1 positive cells) on the total surface of 6-8 randomly selected histological explant sections using ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

CNR1 antibody was provided by C. Lindskog Bergström of the human protein atlas (HPA). IHC of CNR1 was performed on uncultured, 4%-paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded, 5 µm-thick sections of 9,2 DW testis explants and conducted according to the HPA protocol with modifications. Following dewaxing and rehydration, antigen retrieval was performed by treating the sections with 10mM citrate buffer (pH 6.0) at 80°C for 45 minutes before cooling them at room temperature. Endogenous peroxidase was blocked using a 3% H₂O₂ treatment for 10 minutes. Non-specific sites were then blocked with a 10% BSA treatment for 1 hour at room temperature and sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted in Dako antibody diluent (1:100). A goat anti-rabbit biotinylated secondary antibody was then used, and the signal amplified using an ABC solution (ABC Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories). Sections were developed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Aldrich) and then counterstained with Masson's Hemalun and Lithum Carbonate before dehydration. Between all steps (except between blocking of non-specific sites and the first antibody incubation), sections were washed using Phosphate Buffer Saline (PBS) with 0,2% of Tween 20 detergent.

Statistical analyses

Testosterone and AMH measurements after 72h of exposure to the CBD and/or THC treatments were expressed relative to the mean of their respective controls after a normalization with the first untreated 24h of culture (D0) measurement for each well. Immunohistochemistry cell counting was expressed relative to the mean of their respective controls.

The effect on the testosterone secretion of a CBD and/or THC treatment at all concentrations compared to the control was assessed using Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's post hoc comparison tests. For immunohistochemistry cell counting, AMH, Inhibin B and INSL3 measurements, the control condition and the CBD and/or THC 10-5M treatment were compared two by two using Wilcoxon tests.

The statistical significance threshold was set at 0.05. The data are expressed as mean \pm SEM.

RNA-seq experiments and data analysis

The RNA-seq raw data used in this paper to study the dynamic of gene expression of endocannabinoids synthesizing and degrading enzymes have been mined from a dataset previously published by our team (Lecluze et al. 2020).

Single-seq experiments and data analysis

Gene expression profiles at single-cell resolution were extracted from a human gonad developmental cell atlas composed of 123,869 cells isolated from 30 fetal testes and ovaries ranging from 6 to 12 postconceptional weeks (Lardenois et al., in preparation).

Briefly, after quality controls, the expression data were normalized and further analyzed using the Seurat R package version 3.1.5 (Butler et al. 2018).

BRB-seq experiments and data analysis

RNA extraction. Total RNA was extracted using RNA/DNA extraction kit (Qiagen, Germany) following manufacturer's instructions. RNA quantity was assessed using a NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), and RNA quality using a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Only samples with a RIN score >8 were included for further analyses.

Library preparation and sequencing. 3' BRB-seq experiments were performed as previously described (Draskau et al. 2021; Giacosa et al. 2021; Alpern et al. 2019). Briefly, RNAs were distributed onto two 96-well plates. A first step of reverse transcription and template switching reactions was performed using 4 μ L total RNA at 2.5 ng/ μ L and sample-specific barcoded oligo-dT. Then, cDNAs from each plate were pooled together, purified and Double-strand (ds) cDNAs were generated by PCR. The two corresponding sequencing libraries were next built by tagmentation using 50 ng of ds cDNA with the Illumina Nextera XT Kit (Illumina, #FC-131-1024) following the manufacturer's recommendations. The resulting library was finally sequenced on a NovaSeq sequencer as Paired-End 100 base reads, following Illumina's instructions by the IntegraGen Company (<https://integragen.com/fr/>). Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.7 and bcl2fastq 2.17.1.14. Adapter dimer reads were removed using DimerRemover (<https://sourceforge.net/projects/dimerremover/>).

Data preprocessing and normalization. A phred quality score higher than 10 was required for the first reads (R1, 16 bases). Among these, the first 6 bases correspond to the unique sample-specific barcode that is needed to demultiplex the sequencing data, while the following 10 bases correspond to a unique molecular identifier (UMI) that is used for quantification purposes. The second reads (R2) were aligned to the human reference transcriptome from the UCSC website using BWA version 0.7.4.4 with the parameter “-l 24”. Reads mapping to several positions in the genome were filtered out from the analysis. After quality control and data preprocessing, a gene count matrix was generated by counting the number of unique UMIs associated with each gene in lines for each sample in columns. The UMI matrix was further normalized with the regularized log (rlog) transformation package implemented in the DeSeq2 package (Love, Huber, et Anders 2014). Raw and preprocessed data were deposited at the GEO repository under the accession number X1 (Edgar 2002).

Differential gene expression analysis. Principal component analysis (PCA) and Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) were performed with the FactoMineR (Lê, Josse, et Husson 2008) and umap packages implemented in R v4.1.1. Differentially expressed genes (DEGs) were identified by comparing each compound (CBD, THC, CBD+THC) to their corresponding control samples at each developmental stage (10-12GW and 12-14GW). For

each comparison, different filtration steps were applied: i) the median gene expression value (=0.0) of all the samples was used as a background cut-off; ii) a fold-change cut-off of at least

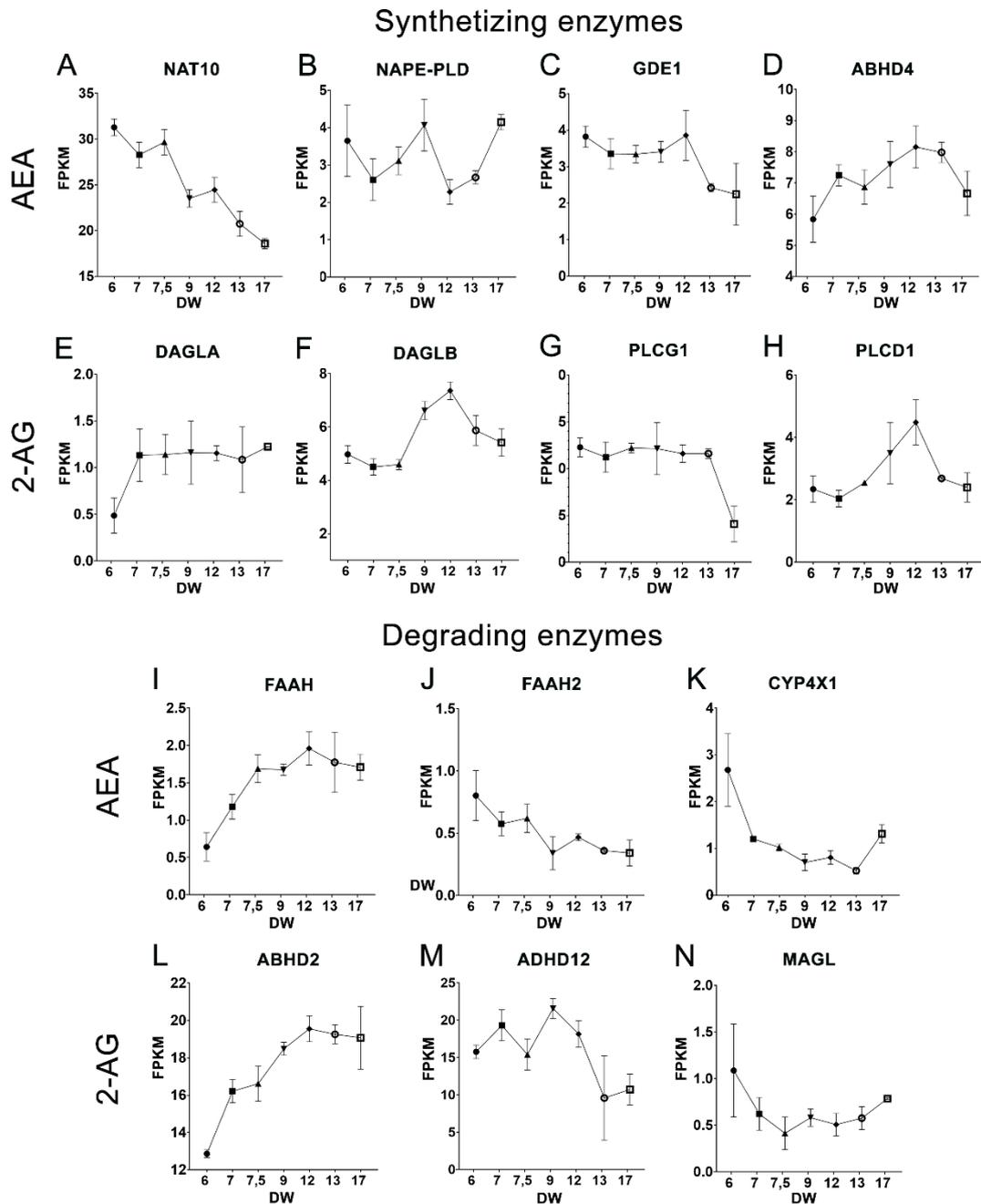


Figure 1: Expression of synthetizing and degrading enzymes in embryonic human testis.

Quantification of the transcript expression by RNAseq of AEA and 2-AG synthetizing and degrading enzymes in bulk embryonic human testis from 6 to 17 developmental weeks (DW). Transcript amount is expressed in Fragments Per Kilobase Million (FPKM). The synthetizing enzymes of AEA are the N-acetyltransferase 10 (NAT10), the N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D (NAPE-PLD), the Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1 (GDE1) and the Abhydrolase domain-containing protein 4 (ABHD4). The synthetizing enzymes of 2-AG are the Diacylglycerol lipase-alpha (DAGLA) and the Diacylglycerol lipase-beta (DAGLB), the Phospholipase C-gamma-1 (PLCG1) and the Phospholipase C-delta-1 (PLCD1). The

degrading enzymes of AEA are the Fatty acid amide hydrolase (FAAH and FAAH2) and the Cytochrome P450 4X1 (CYP4X1). The degrading enzymes of 2-AG are the Abhydrolase domain-containing protein 6 and 12 (ABHD2, 6 and 12) and the Monoglyceride lipase (MAGL).

1.3 ; and, iii) a statistical filtration with a paired samples t-test and a p-value cut-off of 0.05 adjusted with the Benjamini & Hochberg method (Benjamini et Hochberg 1995). The resulting transcriptomic signatures were deposited at the TOXslgN repository under the accession number X¹ (<https://toxsign.genouest.org/>) (Darde et al. 2018).

¹Number to add after paper submission

Clustering and functional analysis. The resulting lists of DEGs were clustered into distinct gene expression patterns with the mclust algorithm (Scrucca et al. 2016). A Gene Ontology term enrichment analysis was performed with the Annotation Mapping Expression and Network (AMEN) suite (Chalmel et Primig 2008). A specific annotation term was considered significantly enriched in a given gene expression pattern when the False Discovery Rate (FDR)-adjusted p-value (Fisher's exact probability) was ≤ 0.05 and the number of associated genes was ≥ 3 .

Results

The endocannabinoid system is dynamically regulated during human fetal testis development

In human, ECS plays an important role in the regulation of reproductive function in adult but its expression and role during fetal development has never been described. The ECS comprises synthesis and degradation enzymes responsible for the regulation of eCA, the AEA and 2-AG and their receptors CB1 and CB2. The expression of synthesizing (**Figure 1 A-H**) and degrading enzymes (**Figure 1 I-N**) of AEA and 2-AG was investigated using a previously published RNA-seq dataset (Lecluze et al. 2020) arising from the analysis of the genome of 6 to 17 DW human testis bulk RNA. Different types of dynamic expression were observed during the gestational period spanned. Thus the expression of the transcripts of the synthesizing enzymes of both endocannabinoids decreased in between 6 to 17 DW for NAT10, were stable for NAPE-PLD, GDE1, DAGLA and PLCG1 or instead increased for ABHD4, DAGLB and PLCD1 (**Figure 1 A-H**). The expression of the transcripts encoding their

degrading enzymes increased for FAAH and ABHD2 and decreased for FAAH2, CYP4X1, ABHD12 and MAGL (Figure 1 I-N).

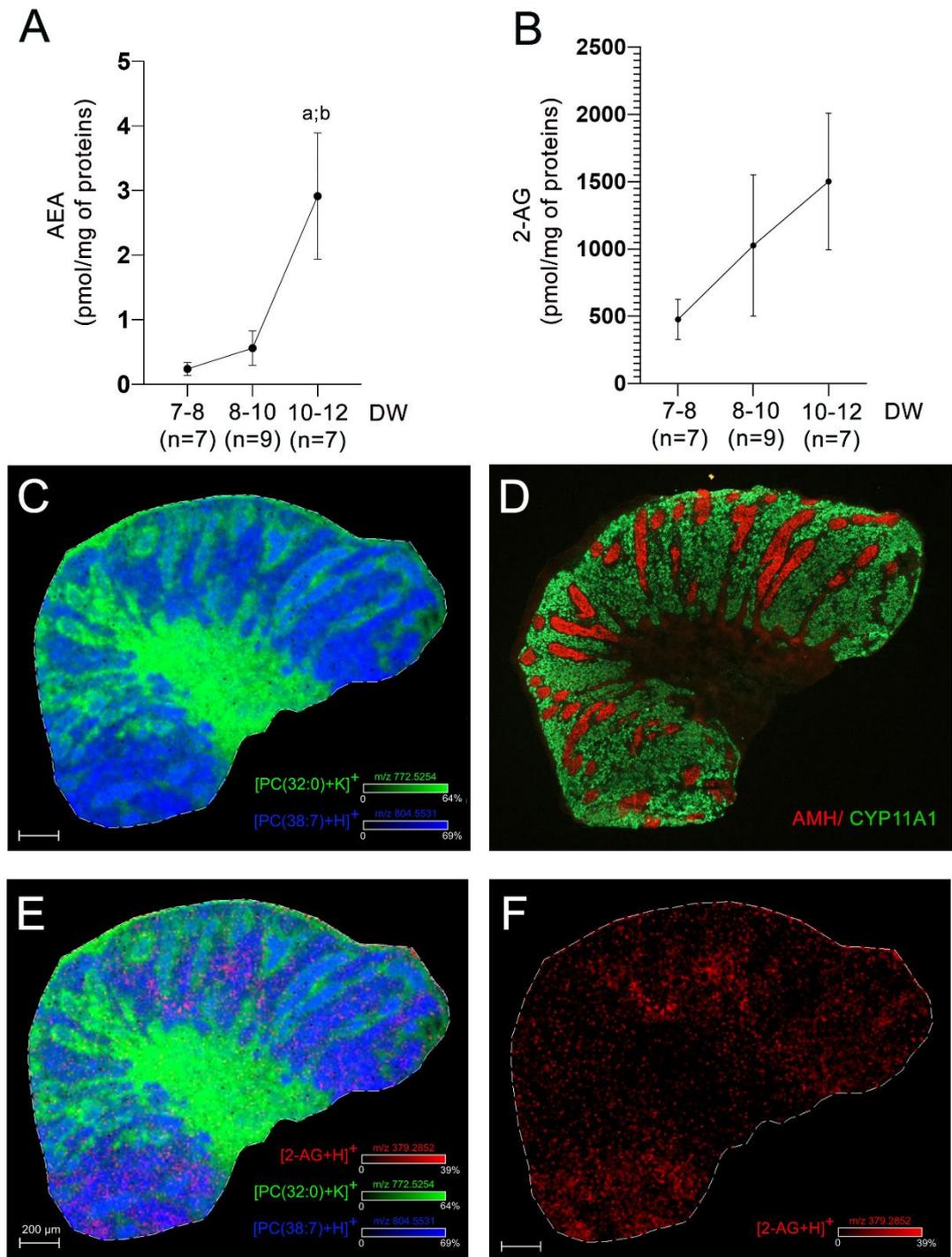


Figure 2: Endocannabinoids synthesis by human fetal testis. AEA **(A)** and 2-AG **(B)** concentration in human fetal testis from 7-8 (n=7), 8-10 (n=9), 10-12 (n=7) developmental weeks (DW). Data are given in pmol per mg of proteins in the tissue as mean +/- SEM. **(C)** MALDI images showing the distribution of two lipids [PC(32:0)+K]⁺ (m/z 772.5254 in green) and [PC(38:7)+H]⁺ (m/z 804.5531 in blue) located in the interstitial tissue and in the cords, respectively of a 11 DW testis. Lateral resolution = 10 μm, m/z window = 3 ppm, scale bars = 200 μm. PC = phosphatidylcholine. **(D)** Immunohistochemistry performed in adjacent section using Cyp11A1 (in red or green) and AMH (in red or green) antibodies, markers of Leydig and Sertoli cells respectively. Detection of 2-AG (m/z 379.2582 in red) in merge with [PC(38:7)+H]⁺ and [PC(32:0)+K]⁺ **(E)** or alone **(F)**.

After detecting the presence of the transcript of endocannabinoid synthesizing enzymes, the presence of key endocannabinoids, AEA and 2-AG, was investigated by HPLC in bulk human testis of 7-8, 8-10 and 10-12 DW (n= 7 to 9 for each age). Embryonic human testis only contained a low amount of AEA, between 0.239 +/- 0.0996 and 2.913 +/- 0.977 pmol of AEA per milligram of protein (**Figure 2A**). Of note however, AEA synthesis significantly increased between 7-8 and 10-12 DW and 8-10/ 10-12 DW. In contrast, the embryonic human testis contained an important amount of 2-AG, between 477.05 +/- 149.64 and 1502.10 +/- 508.20 pmol of 2-AG per milligram of protein (**Figure 2B**). The increase of 2-AG secretion during development did not reach significance.

The location of AEA and 2-AG was next investigated by MALDI imaging methodology. To validate the methodology, we first investigated the distribution of two lipids with a known localization in the compartments of an 11 DW testis tissue. The PC (32:0) lipid (PC=Phosphatidylcholine; m/z 772.5254 in green) was located in the testis cords and the PC (38:7) lipid (m/z 804.5531 in blue) in interstitial tissue (Figure 2C). To further validate the localization of these lipids, an immunohistochemistry was performed on adjacent sections using specific markers of Leydig and Sertoli cells, in order to discriminate interstitial tissue and testis cords, respectively (**Figure 2D**). In agreement with the above HPLC result, the low amount of AEA was not detectable by MALDI Imaging, as opposed to 2-AG, which was clearly identified in the tissue co-localizing with lipid corresponding to the seminiferous tissue (**Figure 2E-F**).

Endocannabinoids act on cannabinoid receptors, CB1 and CB2, and induce signaling pathways involved in many cellular processes. The expression of the transcript of CB1 (CNR1) and CB2 (CNR2) proteins were investigated using our previously published RNA-seq dataset (Lecluze et al. 2020), as above (Figure 3A). The expression of CB1 and CB2 receptors varied in the embryonic human testis during 6 to 17 DW but without significant variation from one DW to another. Gene expression profiles at a single-cell resolution extracted from embryonic testis from 8 to 12 DW showed the expression of CNR1 mainly in germ and Sertoli cells (with an expression in Leydig cells restricted to 8 DW) and the expression of CNR2 in germ cells and Leydig cells (with an expression in Sertoli cells restricted to 11 DW) (**Figure 3B**). The expression of CB1 protein was detected in a 9 DW human embryonic testis by immunohistochemistry in

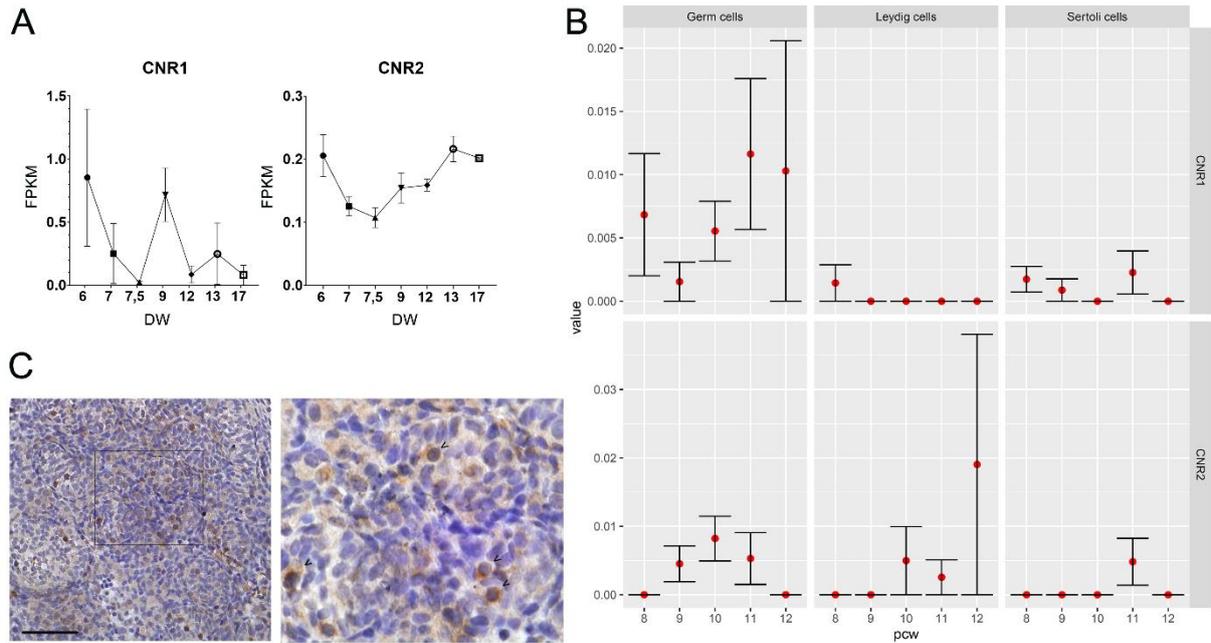


Figure 3: Expression on cannabinoid receptors in embryonic human testis. (A) Quantification of the transcript expression by RNAseq of CNR1 (CB1) and CNR2 (CB2) in bulk embryonic human testis from 6 to 17 DW. Transcript amount is expressed in Fragments Per Kilobase Million (FPKM). **(B)** Dotplots representing normalized expression at a single-cell resolution levels of CNR1 and CNR2 in germ cells, Leydig cells and Sertoli cells from 8 to 12 PCW. The red dots show the mean expression and error bars represent the standard deviation. **(C)** Immunostaining of CB1 in a 9,2 DW human fetal testis. CB1 appears brown in the cytoplasm of the germ cell in intracordonal tissue. Sections were counterstained with hematoxylin (in blue).

testis cord, in cells with a typical morphology of germ cell (**Figure 3C**). We failed to detect CB2 using commercial antibodies on tissue slides.

CBD and/or THC exposure impacts the number of proliferating and apoptotic cells in human fetal testis explants

ECS being present in embryonic human testis and cannabis the most consumed drug in pregnant women, we investigated the effect of CBD and/or THC on embryonic human testis physiology.

To first decipher the effect of cannabinoids at the cell level, the number of proliferating (Ki67-positive cells) and apoptotic cells (cleaved-Caspase 3 positive cells) was investigated in the two compartments of the fetal testis, i.e. extra-cordal (which contains Leydig cells, immune cells and fibroblasts) and intra-cordal (which contains Sertoli and germ cells).

In the extra-cordal compartment, the number of Ki67-positive cells significantly decreased in 8-10 DW testis explants treated with THC or with CBD+THC at the concentration of 10^{-5} M compared to controls ($p=0.0469$ and $p=0.0469$ respectively) (**Figure 4A**). In 10-12 DW testis explants, THC alone had no effect on the number of proliferating cells, whereas it induced their decrease in a mixture with CBD ($p=0.0117$). CBD alone did not affect the capacity of cells to proliferate in either 8-10 WD or 10-12 DW testes. A 72h treatment with CBD and/or THC did not modify the number of apoptotic cells in either 8-10 or 10-12 DW testis explants, as compared with controls (**Figure 4B**).

In the intra-cordal compartment, only THC at 10^{-5} M induced a significant decrease of the number of Ki67-positive cells when compared with control in organotypic culture of 10-12 DW testis explants ($p=0.0391$) (**Figure 4C**). The number of proliferating cells was not affected in other conditions. In 8-10 DW testis explants, a significant increase in the number of cleaved-caspase 3-positive cells inside the seminiferous cords was counted upon a 72h treatment with 10^{-5} M of either THC ($p=0.0313$), CBD ($p=0.0469$) or CBD/THC ($p=0.0313$) (**Figure 4D**). In 10-12 DW testis explants, THC and CBD/THC at 10^{-5} M for 72h also increased cell apoptosis ($p=0.0078$ and $p=0.117$ respectively), while the impact of CBD treatment induced more inter-individual variations and did not reach significance.

We next assessed the short-term impact of cannabinoid treatment on the number of germ cells in fetal testis cords through the quantification of positive cells for Lin28, a specific germ

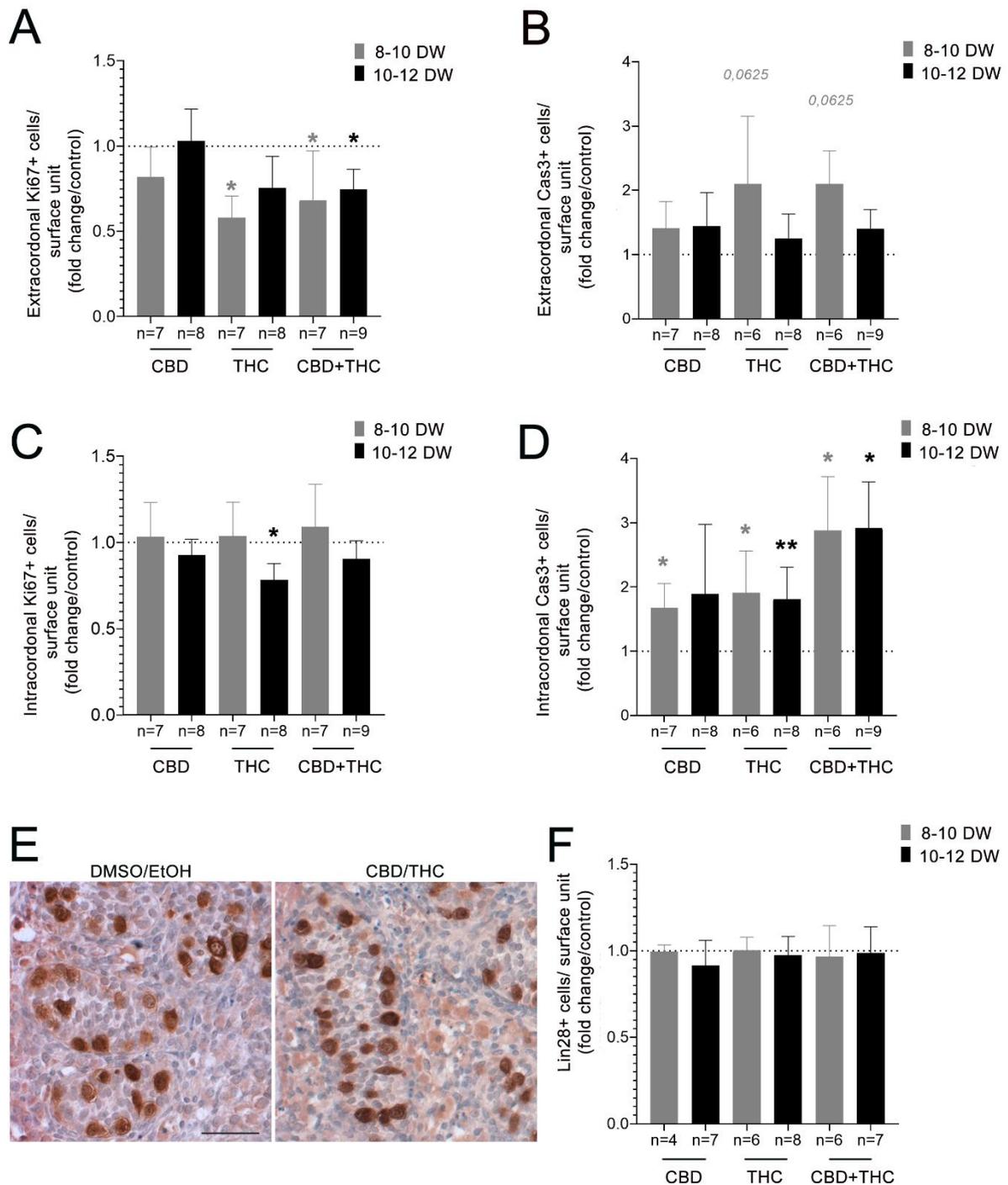


Figure 4: Effect of CBD and/or THC on proliferation, apoptosis and germ cell biology. Quantification of the number of (A) proliferating (Ki67 positive cells, Ki67+) and (B) apoptotic (Cleaved-caspase3 positive cells, Cas3+) per surface unit of (A-B) extracordal and (C-D) intracordal tissue after CBD and/or THC treatment at 10-5M compared to respective control in 8-10 (grey bar) and 10-12 (black bar) DW embryonic testis. Data are means +/- SEM. An ANOVA test was performed followed by a Kruskal-Wallis test for pair comparisons (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). (E) Representative immunostaining of Lin28, a specific marker of germ cell in a 10-12 DW human fetal testis. Lin28 appears dark (3,3-diaminobenzidinetetrahydrochloride staining) in the nucleus of germ cell in intracordal tissue. Sections were counterstained with hematoxylin (in blue). No change in terms of germ cell morphology was observed. (F) Quantification of the number of Lin28 positive cells (Lin28+) per surface of intracordal tissue after CBD and/or THC treatment at 10-5M compared to respective control in 8-10 (grey bar) and 10-12 (black bar) DW embryonic testis.

cell marker (**Figure 4E**). No significant changes in the number of Lin28-positive germ cells was observed after a 72h exposure of fetal testis explants to either CBD, THC or CBD/THC at 10-5M (**Figure 4F**).

CBD and/or THC decrease testosterone secretion by Leydig cells in the fetal testis ex vivo

Hormones secretion during development by human testis is a crucial event necessary for the maturation of germ cells. To investigate the effect of CBD and/or THC on the endocrine function of embryonic human testis, organotypic cultures from 8-10 and 10-12 DW testes were performed. In order to cover various recreational and medical modes of exposure, CBD and THC were used alone or in mixture in an equimolar ratio from 10-7 to 10-5M.

In the 10-12 DW CBD-treated testis, no significant effect was observed on testosterone level compared to control condition, whereas a significant decrease of the level of testosterone was observed after 72h of exposure of CBD at 10-5M in 8-10 DW treated testis ($p=0.0427$) (**Figure 5A**). In contrast, THC had no effect at 8-10 DW but significantly decreased testosterone level in 10-12 DW testis after 72h of exposure at 10-5M ($p=0.0421$) (**Figure 5B**). Interestingly, treatment with a mixture of CBD and THC (ratio 1:1) induced a dose-dependent testosterone decrease (**Figure 5C**). The pairwise comparisons versus the control condition evidenced a significant decrease starting at 10-6M in the 10-12 DW testis, with an even more pronounced impact at 10-5M ($p=0.0005$), as well as a highly significant decrease at 10-5M at 8-10 DW ($p=0.0004$) (**Figure 5C**).

To investigate whether the effect on testosterone secretion was due to a modification of the number of Leydig cells, immunohistochemistry was performed using a specific Leydig cell marker, Cyp11A1. The overall distribution of Cyp11A1+ cells was similar in both 8-10 and 10-12 DW explants treated with 10-5M CBD/THC or untreated, and no specific change in terms of Leydig cell morphology was observed (Figure 5 D-G). In line, the area occupied by Cyp11A1-positive cells was not modified in 8-10 and 10-12 DW testis treated with 10-5 M of either CBD, THC or CBD and TGC (**Figure 5H**).

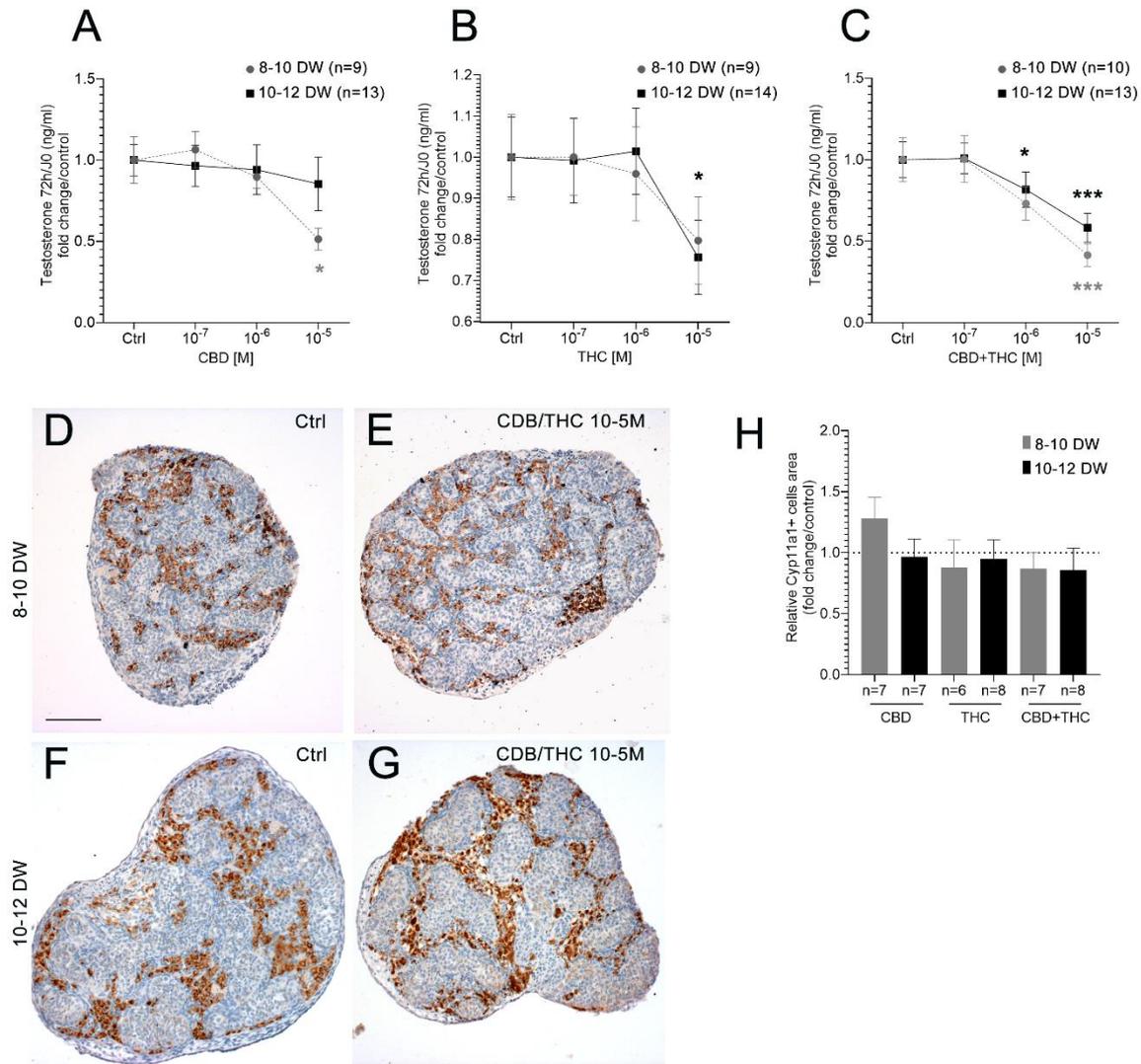


Figure 5: Effect of CBD and/or THC on Leydig cell biology. Amount of testosterone in the supernatants of fetal human testis explants of 8-10 (grey line) or 10-12 (black line) DW cultured for 72h in presence of solvent control (DMSO and/or EtOH) or 10⁻⁷ to 10⁻⁵ M of (A) CBD, (B) THC and (C) a mixture of CBD/THC (ratio 1:1). Results are expressed related to the amount of testosterone produced during the first day of the culture and as fold from the respective control. Data are means +/- SEM. An ANOVA test was performed followed by a Kruskal-Wallis test for pair comparisons (*, p<0.05; ***, p<0.001). (D-G) Representative immunostaining of Cyp11A1 in a (D-E) 8-10 and a (F-G) 10-12 DW human fetal testis in (D-F) Ctrl (DMSO/EtOH) and (E-G) CBD/THC (ratio 1:1) conditions. Cyp11A appears dark (3,3-diaminobenzidinetetrahydrochloride staining, DAB) in extracordonal tissue, and sections were counterstained with hematoxylin (in blue). No change in terms of Leydig cell morphology was observed. (H) Quantification of the surface area occupied by Cyp11A1 positive cells (Cyp11A1+) after CBD and/or THC treatment at 10-5M compared to respective control in 8-10 (grey bar) and 10-12 (black bar) DW embryonic testis.

CBD and/or THC decrease AMH secretion by Sertoli cells in the fetal testis ex vivo

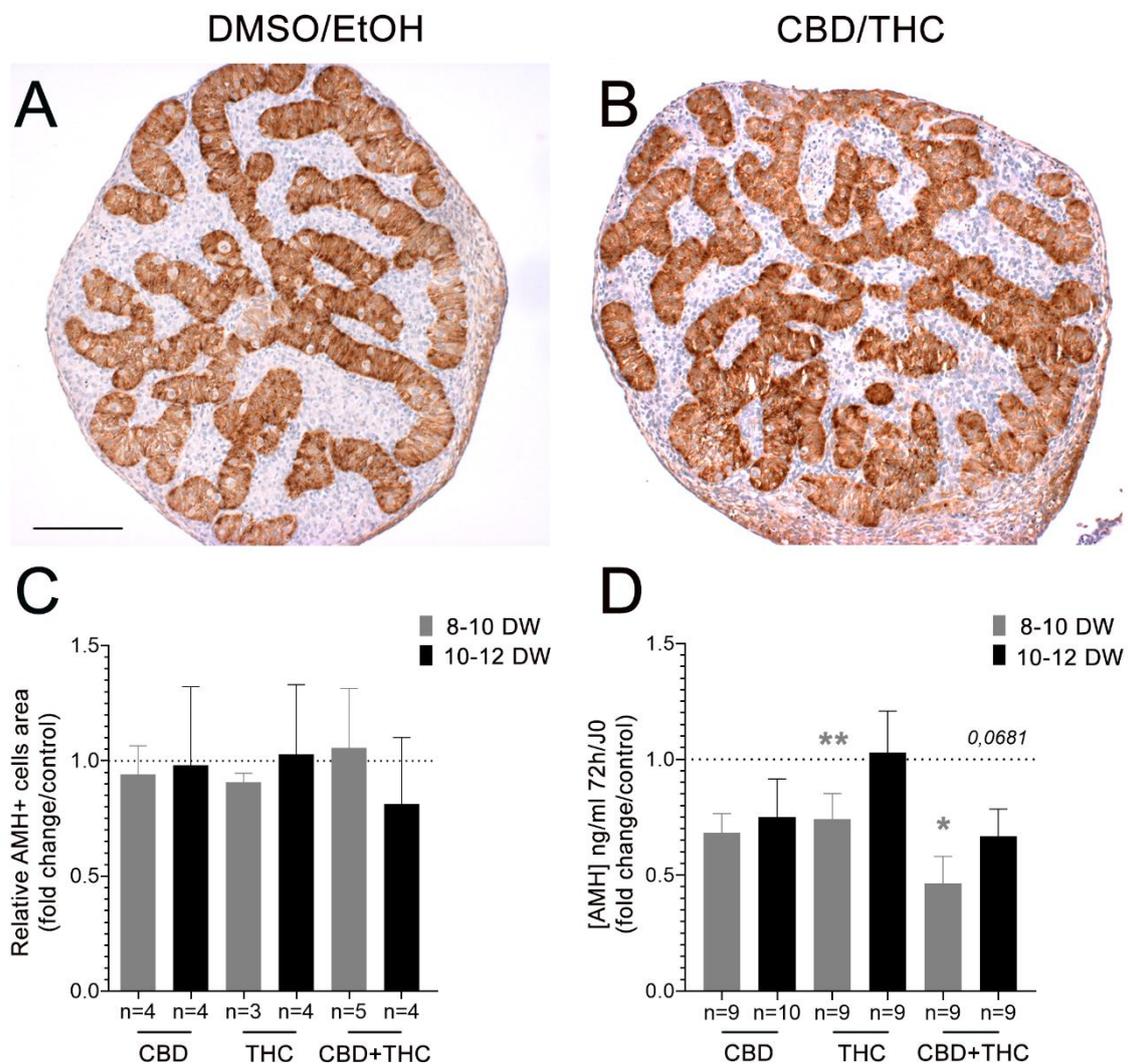
We then focused on Sertoli cells, which nurse germ cells during their development. Morphological analysis of Sertoli cells did not show any apparent changes after CBD/THC treatment at 10⁻⁵M versus control, based on immunohistochemistry using AMH, a specific marker of Sertoli cells (**Figure 6A-B**). The quantification of the surface area occupied by AMH-positive Sertoli cells did not show any modification in the density of Sertoli cells in testis explants after CBD and/or THC treatment at 10⁻⁵M when compared with controls (**Figure 6C**).

To test the effect of cannabinoids treatment on the endocrine function of Sertoli cells, AMH secretion was measured in the culture media of organotypic culture. AMH secretion by testis explants was significantly decreased at 8-10 DW upon treatment with 10⁻⁵M of THC ($p=0.0078$) or CBD/THC ($p=0.0195$) but was not affected in CBD-treated testis culture. In 10-12 DW testis culture, only CBD/THC treatment induced a borderline, non-significant decrease in AMH secretion ($p=0,0681$) (**Figure 6D**).

Multiple signaling pathways including those involved in steroid biosynthesis are modified in the human fetal testis exposed to CBD and/or THC treatment

To understand the adverse effects induced by phytocannabinoids in the fetal testis, we performed 3' BRB-seq experiments on RNA extracted from 8-10 and 10-12 DW testis explants cultured with either CBD and/or THC at 10⁻⁵M during 72h. Following library preparation and sequencing, and the preprocessing and the normalization of the data, over 15703 genes were detected in all conditions (**Figure 7A**). After comparing each condition with their own control, genes with a fold change ≥ 1.3 and a p-value ≤ 0.05 were selected. In CBD conditions, 61 genes were up- and 58 down-regulated in 8-10 DW testis compared with controls, against 1 and 2 genes in 10-12 DW testis. In THC conditions, 12 genes were up- and 22 down-regulated in 8-10 DW testis compared with controls, against 3 and 1 genes in 10-12 DW testis. In CBD/THC condition, 16 genes were up- and 18 down-regulated in 8-10 DW testis compared with controls and 21 genes were up- and 21 down-regulated in 10-12 DW testis. In total, the expression of 187 genes was modified by the treatments (**Supplemental Table 1**).

The resulting lists of differential expressed genes (DEGs) were then clustered into distinct gene expression patterns with the mclust algorithm (Scrucca et al. 2016). The analysis



resulted in

Figure 6: Effect of CBD and/or THC on Sertoli cell biology. Representative immunostaining of AMH, a specific marker of Sertoli cell, in an 8-10 DW human fetal testis in (A) DMSO/EtOH and (B) CBD/THC 10-5M conditions. AMH appears dark (DAB staining) in intracordal tissue, and sections were counterstained with hematoxylin (in blue). (C) Quantification of the surface area occupied by AMH positive cells (AMH+) after CBD and/or THC treatment at 10-5M compared to respective control in 8-10 (grey bar) and 10-12 (black bar) DW embryonic testis. (D) Amount of AMH in the supernatants of fetal human testis explants of 8-10 (grey line) or 10-12 (black line) DW cultured for 72h in presence of solvent control (DMSO and/or EtOH) or 10⁻⁵M of CBD and/or THC.

the identification of nine clusters from P1 (25 genes) to P9 (5 genes) (**Figure 7A**). The clusters P1 to P4 corresponded mainly to down-regulated genes and the clusters from P5 to P9 to up-regulated genes (**Figure 7B**). A Gene Ontology term enrichment analysis was then performed with the Annotation Mapping Expression and Network (AMEN) (Chalmel and Primig 2008) and a list of enriched terms was significantly identified for patterns P1, P2 and P5 (**Supplemental Table 2**). Expression genes belonging to P1 cluster globally significantly decreased in CBD and CBD/THC conditions. Expression genes belonging to P2 cluster globally significantly decreased in CBD conditions. The genes of these clusters are involved in steroid metabolic process (12 genes; $p=2.41E-13$ for P1 and 8 genes; $p=4.97E-6$ for P2) or cholesterol biosynthesis (11 genes; $p=3.37E-17$ for P1); metabolic processes (7 genes; $p=1.14E-05$ for P2), lipid metabolic (12 genes; $p=5.88E-5$ for P1) or biosynthetic process (11 genes; $p=2.93E-05$ for P2). The mevalonate and cholesterol biosynthesis pathway (6 genes; $p=2.59E-12$) and alcohol biosynthetic process (11 genes; $p=9.76E-14$) were altered in P1, whereas secondary alcohol metabolic process (7 genes; $p=1.55E-05$) and activation of gene expression by SREBF (5 genes; $p=4.42E-05$) were altered in P2. P3 corresponded to genes mainly down-regulated in THC condition compared with controls in 8-10 DW testis. P4 corresponded to genes deregulated in THC and CBD/THC conditions at both ages. In these two groups, no significant enriched pathways were highlighted. The P5 cluster corresponded to genes up-regulated in all conditions that belonged to signaling pathways involved in response to toxic substances (6 genes; $p=1.46E-03$), in cellular response to metal ion (5 genes; $p=6.99E-03$), detoxification of inorganic compounds (5 genes; $p=5.49E-07$), stress response to metal ion (5 genes; $p=5.49E-07$), cellular transition metal ion homeostasis (7 genes; $p=3.38E-06$), mineral absorption (7 genes; $2.17E-08$) and zing homeostasis (4 genes; $7.21E-06$).

The P6 cluster was highly up-regulated in the 8-10 DW testis exposed to CBD, the P7 in the 8-10 DW testis exposed to THC, the P8 in the 10-12 DW testis exposed to CBD/THC and the P9 in the 10-12 DW testis exposed to CBD. In these 4 last patterns, genes were not significantly associated to signaling pathways.

Altogether, these data show that cannabinoids mainly negatively impact the expression of fetal testis genes involved in steroid biosynthesis pathway, as well as those involved in mevalonate and cholesterol biosynthesis, both necessary to the biosynthesis of steroids

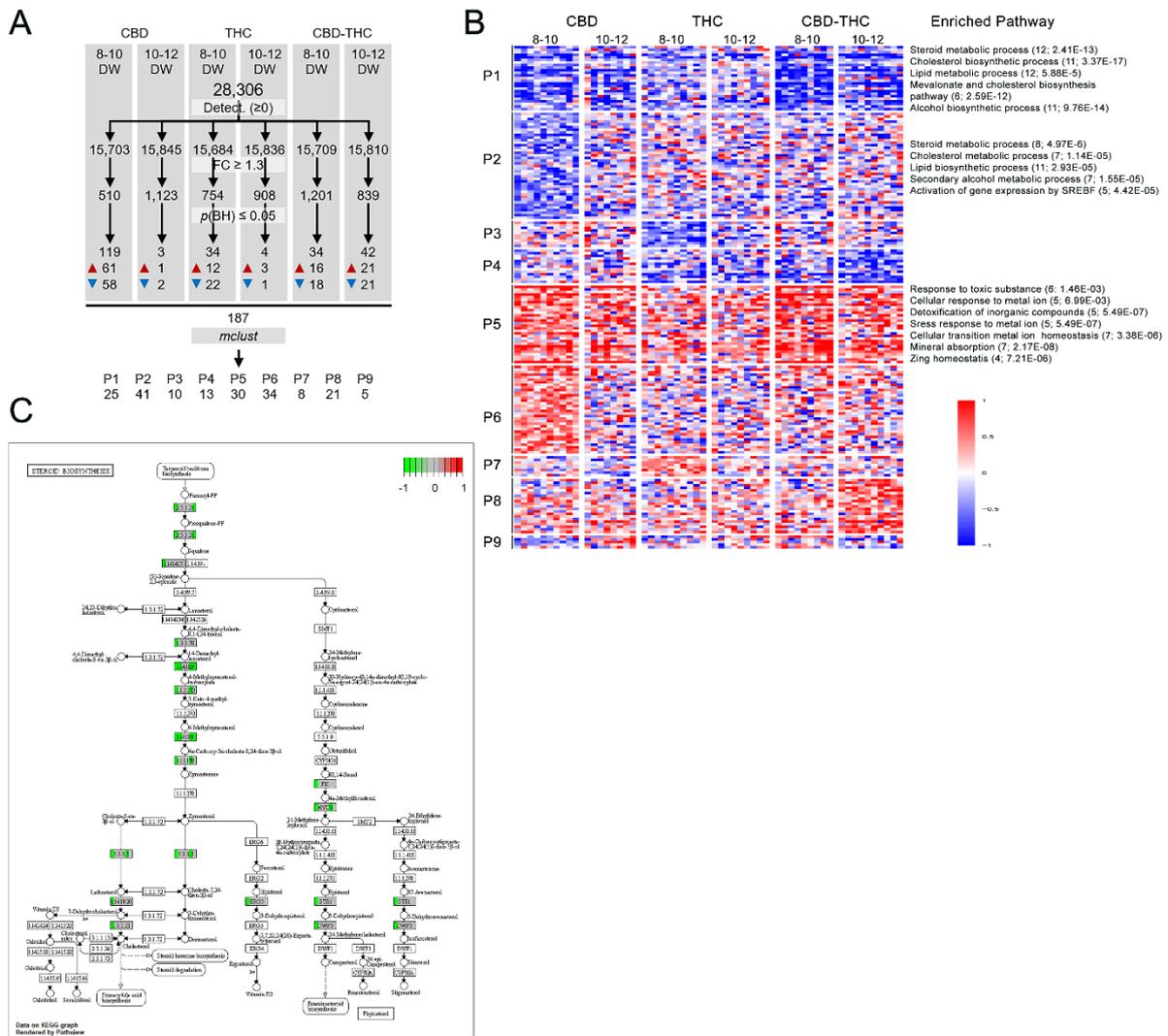


Figure 7: Effect on CBD and THC alone or in mixture on the transcriptome of human fetal testis. (A) Analysis of differentially expressed genes (DEG) in 8-10 and 10-12 developmental weeks (DW) embryonic testis in after CBD, THC and CBD/THC exposure at 10-5M compare to control. Data statistical analysis highlights 187 DEGs in total, some upregulated (red triangle), and some downregulated (blue triangle). These DEGs are distributed in 9 patterns (P) of expression, from P1 to P9. **(B)** Heatmap representation of transcriptional changes in 8-10 and 10-12 DW embryonic human testis after CBD, THC and CBD/THC exposure at 10-5M compare to control. Heatmap represents the 9 patterns of gene depleted (down regulated in blue) or enriched (up regulated in red). Genes belonging to enriched pathway are found in P1, P2 and P5 indicated on the right column of the panel. The number of genes belonging to the pathways and p-value for each pathway is indicated in parenthesis. **(C)** Kegg pathway of the Steroid biosynthesis where are in green genes down-deregulated after CBD and/or THC treatments. Each name gene is divided in 6 parts, from the left to the right corresponding to CBD 8-10, CBD 10-12; THC 8-10, THC 10-12, CBD-THC 8-10 and CBD-THC 10-12 treatments.

(Figure 7C). In addition, cannabinoids stimulate the expression of genes involved in the cell responses to toxic substances and inorganic compounds in the human fetal testis.

The deleterious effects of cannabinoids exposure on cell apoptosis and testosterone secretion are amplified upon a 14 day-exposure of human fetal testis ex vivo

To mimic a regular/chronic use of cannabis during development and try to identify further damages on human embryonic testis, 15 day-cultures of fetal testes were performed. Because of the sample rarity, we focused this experiment on 10-12 DW embryonic testis treated with control, THC 10-5M, CBD 10-5M, CBD/THC 10-6M and CBD/THC 10-5M during 14 days. The treatment was initiating following a 24h of culture without drugs in order to define a baseline for hormones' secretion. Control conditions showed a good maintenance of the testis explants morphology during the 15 day of culture, as evidenced by normal histology and lack of signs of abnormal necrosis or apoptosis. To evaluate the effect of 14 day of cannabinoid treatments on cell death, immunohistochemistry was performed using antibodies against cleaved-caspase3. A massive increase in apoptosis was obvious in fetal testis explants exposed to CDD/THC at 10-5M **(Figure 8A)**.

The impact of a prolonged cannabinoid treatment on endocrine function of the testis was investigated at 4 (D4), 8 (D8) and 14 (D14) days after treatment initiation. CBD significantly decreased testosterone levels at all time points, with a more pronounced effect at D14, whereas THC only significantly affected the secretion of testosterone at D14 **(Figure 8B)**. The mixture of CBD and THC induced a time and dose-dependent decrease of testosterone, which reached significance at D8 and was completely abolished by D14 for the 10-5M concentration, whereas the 10-6M concentration had no significant effect at any time point (Figure 8B).

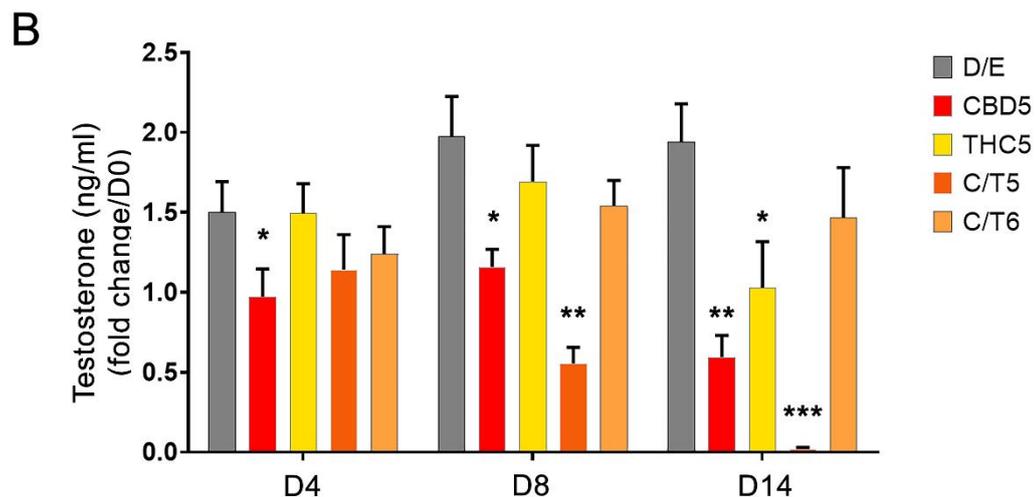
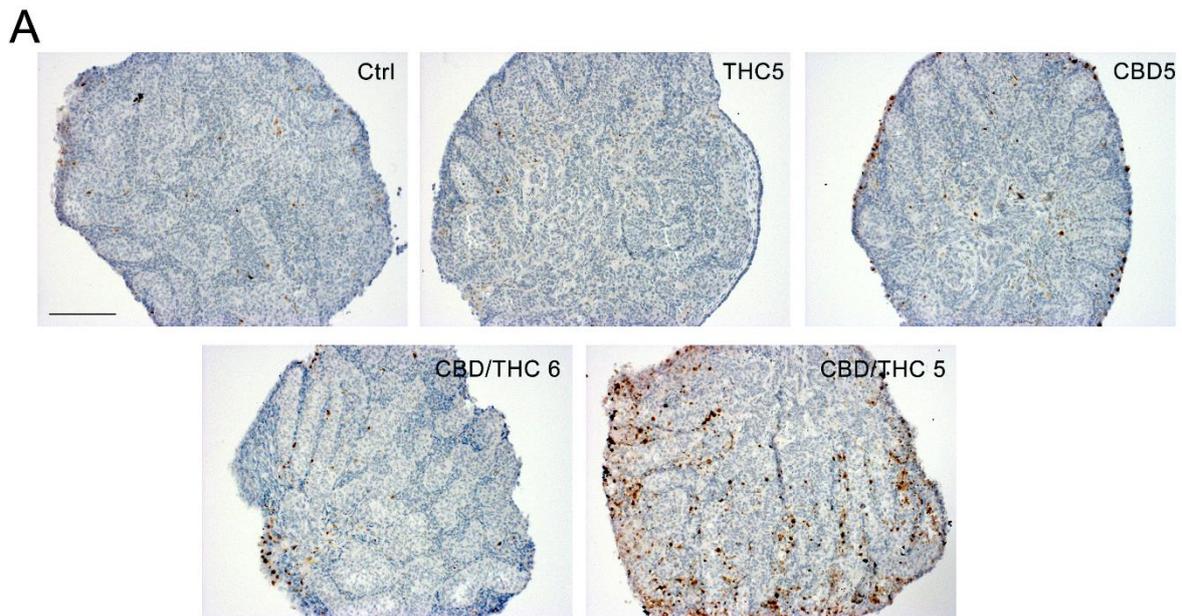


Figure 8: Long term effect of CBD and/or THC on Leydig cell biology. (A) Representative immunostaining of cleaved-caspase3 in a 10-12 DW testis. Cleaved-caspase3-positive cells appear in dark (3,3-diaminobenzidinetetrahydrochloride staining). Sections were counterstained with hematoxylin (in blue). A massive apoptosis is observed in CBD/THC treatment compare to control condition. **(B)** Amount of testosterone in the supernatants of fetal human testis explants of 10-12 DW cultured for 4 (D4), 8 (D8) and 14 (D14) days in presence of solvent control (DMSO and EtOH, grey bar) or 10^{-5} M of CBD (red bar), THC (yellow bar) or a mixture of CBD/THC (orange bar, ratio 1:1) and a mixture of CBD/THC at the concentration of 10^{-6} (light orange bar, ratio 1:1). Results are expressed related to the amount of testosterone produced during the first day of the culture. Data are means \pm SEM. An ANOVA test was performed followed by a Kruskal-Wallis test for pair comparisons (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$).

Discussion

This study uncovers for the first time the presence of ECS components in the human fetal testis and the direct impact of cannabinoids on testis physiology in short and longer-term organotypic culture.

HPLC dosages evidenced the presence of the two best-described endogenous ligands of the ECS in 7-12 DW fetal testis, AEA and 2-AG. AEA levels significantly increased between 7 and 12 DW, which might indicate a greater need for this factor for the physiology of the human fetal testis at the end of the first trimester. Although noticeable, the increase of 2-AG levels between 7 and 12 DW was not significant, likely because of the high inter-individual expression variability. From 7 to 12 DW, 2-AG levels were significantly higher than AEA levels. In the mouse brain, quantities of 2-AG were similarly much higher (up to 1000 times) than that of AEA (Schurman et al. 2019). The respective roles of AEA and 2-AG in the human fetal testis are currently unknown. The high level of 2-AG in the fetal testis suggest it might play a fundamental role in the development of this organ. 2-AG being an important metabolite in prostaglandin synthesizing pathway (Nomura et al. 2011), it could have an ECS-independent mode of action, such as inflammation regulation. 2-AG in situ detection by MALDI imaging in 11 DW human fetal testis demonstrated its presence in seminiferous cords, which contain germ and Sertoli cells. This localization is similar to that previously described in the human testis (Nielsen et al. 2019a). Similarly to adult testis, AEA detection was unsuccessful in fetal testis, probably due to its low levels of secretion (Nielsen et al. 2019a).

In line with the detection of AEA and 2-AG, our analysis of human fetal testis bulk RNA-seq data demonstrated that 6-17 DW testis express synthesizing and degrading enzymes of AEA and 2-AG. AEA main synthesizing enzymes NAT10 and NAPE-PLD were detected, as well as its main degrading enzymes, FAAH. The decreased expression of NAT10 and NAPE-PLD between 9 and 12 DW, and the increased expression of FAAH between 7 and 12 DW, at a time when AEA levels significantly increased, suggest that AEA synthesis and degradation occurs through alternative pathways during this period. Indeed, we detected the expression

of two AEA alternative synthesizing enzymes, ABHD4 and GDE1 (Simon et Cravatt 2006; 2010), which expression was stable or increased between 7 and 12 DW, respectively. Moreover, the expression of two AEA alternative degrading enzymes, FAAH2 (Wei et al. 2006) and CYPXN1 (Snider, Walker, et Hollenberg 2010; Urquhart, Nicolaou, et Woodward 2015) decreased between 7 and 12 DW. The first step for AEA synthesis is mediated by PLC enzymes (Ueda et al. 2011; Murataeva, Straiker, et Mackie 2014), which isoforms PLCG1 and PLCD1 were detected between 7 and 12 DW.

Likewise, we demonstrated the expression of the 2-AG main synthesizing and degrading enzymes, DAGLA and B and MAGL, respectively. Levels of 2-AG rose between 7 and 12 DW but did not reach significance, consistent with the stable expression of DAGLA and PLCG1 and the increased expression DAGLB and PLCD1. Logically, the expression of MAGL was stable and the expression of another 2-AG degrading enzyme, ABDH12 (Blankman, Simon, et Cravatt 2007) decreased from 9 to 12 DW. ABHD2 is an alternative degrading enzyme of 2-AG (Miller et al. 2016), expressed by adult testicular germ cell, in which it may regulate meiosis entry (Nielsen et al. 2019a). The increase of its expression between 7 and 12 DW suggest that this enzyme is not primarily involved in 2-AG degradation in fetal testis at this time.

The analysis of RNA-seq data highlighted the expression in the human fetal testis of the two main cannabinoid receptors, CB1 and CB2. CB1 expression was highly variable between 7 and 17 DW and overall higher than CB2 expression. Single-cell RNA-seq data analysis showed an expression of CB1 mainly in gonocytes and Sertoli cells between 8 and 12 DW, while IHC of CB1 in a 9 DW fetal testis localized CB1 protein in cells morphologically typical of gonocytes. The lack of CB1 protein detection in Sertoli cells by IHC could reflect an absence of CB1 translation. This result is coherent with CB1 localization in the germ cell (pachytene spermatocyte) of adult testis (Nielsen et al. 2019a). CB2 detection by immunohistochemistry was not successful, likely because of its low expression level. The localization of CB1 in gonocytes along with the intra-cordonal localization of 2-AG, which is a highly effective agonist of CB1 (Hillard 2000), suggest that 2-AG/CB1 signaling could be implicated in these cells.

The detection of specific cannabinoid receptors, endogenous ligands and their respective synthesizing and degrading enzymes suggests that ECS signaling is implicated in the regulation of the fetal testis physiology.

We evaluated the effects on human fetal testis of the main components of cannabis, CBD and THC, using 8-12 DW human testicular explants in organotypic cultures. We provide evidence that 72h and 14 day-exposures of testis explants to cannabinoids induce a range of deleterious effects on the human fetal testis. Thus fetal testicular cell proliferation was affected and the number of apoptotic cells increased in extra and intra-cordal compartments, while testosterone secretion by Leydig cells and AMH secretion by Sertoli cells were decreased. Transcriptomic analysis performed by BRB-seq on cannabinoid exposed testis explants revealed 187 differentially expressed genes (DEGs) upon treatment, including genes key for steroids synthesis and involved in the response to toxic substances.

Exposure for 72 hours of 8-10 DW testicular explants with CBD alone or in a mixture with THC at 10^{-5} M led to a significant decrease of their testosterone secretion, as did exposure of 10-12 DW testicular explants with THC alone at 10^{-5} M or in a mixture with CBD at 10^{-6} M or 10^{-5} M. After 14 days of CBD/THC exposure at 10^{-5} M, the secretion of testosterone was completely suppressed, showing the importance to take into account the chronicity of exposure. The variation of effects observed in function of the molecules, CBD or THC, and in function of the age of the tissue is probably due to the complexity of interaction between ligands and cannabinoid receptors (Ligresti, De Petrocellis, et Di Marzo 2016). As showed by our data, alteration of testosterone secretion was not due to a modification of Leydig cell density after 72 hours, as it remained unchanged by cannabinoids treatment. Moreover, CBD alone did not induce a significant decrease of proliferating cell density in extra-cordal tissue of 8-10 DW nor did THC in 10-12 DW – while these compounds affected testosterone levels at these respective ages. These data suggest that the effect of CBD and THC alone on testosterone secretion occurred at the molecular rather than cell level. Nevertheless, the increased effect of the THC/CBD mix on androgens might be due to a combination of both molecular and cellular effect, since a decrease proliferation was observed upon exposure to

CBD/THC in D8-10 and D10-12 testis. In line with the hypothesis of a specific impact of cannabinoids on testicular production by the fetal testis, anti-androgenic effect of CBD and THC alone have been demonstrated in embryonic rodent in vivo (S. Dalterio et Bartke 1981; S. L. Dalterio et deRooij 1986; Murphy, Gher, et Szary 1995). Here we provide the first evidence that direct human testicular exposure to CBD and/or THC is harmful to testosterone secretion, probably as a result of the alteration of steroid biosynthesis by Leydig cells. This hypothesis is supported by our transcriptomic analysis of testis explants after cannabinoid treatments, which highlighted a down-regulated expression of numerous genes involved in lipid, steroids and cholesterol synthesis after a CBD/THC exposure. For instance, the expression of cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1 (CYP17A1), a key testosterone biosynthesis enzyme, was significantly decreased after exposure of 10-12 DW testicular explants to CBD/THC mixture. In parallel, the expression of genes involved in the response to toxic substance, detoxification and cellular stress significantly increased. Cell metabolism alterations might be responsible for cell toxicity in longer term culture, as suggested by the massive apoptosis observed in fetal testis exposed to CBD/THC for 14 days.

Of note, the overall absence of gene expression alteration with THC alone exposure could be due to the chosen BRB-seq fold change threshold impairing the detection of more discrete gene expression modification, or, alternatively, to post-translational mechanisms.

Surprisingly, in contrast to 8-10 DW testis, the exposure of 10-12 DW testicular explants with CBD or THC alone at 10-5M for 72 hours led to very few variations of gene expression, suggesting that 8-10 DW testicular explants are more sensitive to cannabinoid effects at the transcriptional level than 10-12 DW testis. This might be due to differences in cell metabolism between these two developmental ages (Pelliniemi et Niemi 1969). Unfortunately, we were not able to determine the precise mechanisms behind the effects of molecules alone or in an equimolar mixture in these bulk analyses. We noted however that for the majority of investigated parameters, exposure of testicular explants to CBD or THC alone also led to effects with CBD/ THC mixture, and that the effects observed with the mixture were enhanced when compared with the individual molecules. This indicates an additive effect of cannabis compounds in our model, consistent with their interactions on the same receptors (Ligresti, De Petrocellis, et Di Marzo 2016).

Our results additionally demonstrate an effect of cannabinoids on AMH secretion without any alteration of Sertoli cell density. As the number of apoptotic cells increased in the intra-cordonal tissue, we hypothesize that the cannabinoid treatments affected the microenvironment necessary to the homeostasis of germ cell and Sertoli cell populations. The increased cell death in intra-cordonal tissue is consistent with the results of a study that highlighted an alteration of human adult Sertoli cells viability after an in vitro exposure to CBD from $7 \times 10^{-6} \text{M}$ (Li et al. 2022). While THC alone did not show a negative impact on Sertoli cell activity in another study, the highest dose tested ($6.4 \times 10^{-7} \text{M}$) was lower than the 10^{-5}M used here (Holmes, Lipshultz, et Smith 1983). We investigated the expression of genes involved in AMH synthesizing pathways in testicular explants exposed with CBD and/or THC at 10^{-5}M for 72 hours by BRB-seq but failed to observe any significant modification of gene expression. This may suggest a post-translational effect of cannabinoids on AMH secretion linked to a globally altered Sertoli cell metabolism, since an alteration of genes involved in cell metabolism was observed in BRB seq experiments on whole testis explants. Altogether our data show that CBD and/or THC at 10^{-5}M for 72 hours decrease AMH secretion without altering the genes involved in its biosynthesis.

In conclusion, our study demonstrates for the first time the expression of the ECS in fetal human testis and show that direct gonadic exposures to CBD and/or THC have a negative impact on several testicular cellular types' activity and viability. 8-12 DW has been shown to be a critical period of testicular development, particularly sensitive to environmental exposures (Welsh et al. 2008; Scott, Mason, et Sharpe 2009; van den Driesche et al. 2017). An alteration of testicular cell metabolism by cannabinoids, as suggested by our data, could induce a decrease in the number of Sertoli cells, Leydig cells and gonocytes in the long term. Sertoli and germ cell numbers at the end of testicular development is directly correlated to the sperm production capacity of the individual from puberty onward (Orth 1982; Sharpe et al. 2003). Therefore a decrease of their number could lead to hypofertility in the adult. Moreover, testosterone and AMH are essential to urogenital tract masculinization (Hannema et Hughes 2007; Moses et Behringer 2019). Testosterone is also a critical factor for testicular descent (Hutson, Thorup, et Beasley 2016). Thus any alteration of these hormones secretion during development may cause urogenital tract defects, which can in turn lead to

malformations such as cryptorchidism (J. K. Gurney et al. 2017) and/or hypospadias (Cunha et al. 2015), while hypofertility constitutes a risk factor for TGCT (Baroni et al. 2019). While cannabis consumption by pregnant women has risen worldwide over the past decades, an understanding of the potential adverse effects of exposures to cannabis components on the establishment of the male reproductive functions during development is urgently required. Our study points at several deleterious effects of cannabinoids on the developing testis *ex vivo* and paves the way for further deciphering of the impact of cannabinoids at the molecular and cell levels in the fetus. Based on our results, large-scale multi-countries mother-child cohorts to study the impact of maternal cannabis consumption and the occurrence of reproductive pathologies in individual from birth to advanced adulthood are warranted.

Acknowledgements

The authors would like to thank all the staff of the Department of Obstetrics and Gynecology and the Department of Pediatric Surgery of the Rennes Sud Hospital (Rennes, France) and the participating women, without whom this study would not have been possible. We also thank our financial supports: Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), University of Rennes 1, EHESP – School of Public Health, and La Ligue contre le cancer. This paper is dedicated to the memory of Bernard Jégou, who prompted this research and passed away prematurely.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Author's roles

AGP and NDR designed the research. JDA, AGP, SMG, CDL, BE, IM, MLR performed the experiments. FC, AR and AL performed Brbseq, RNAseq and single cell analysis respectively. CLB provides us with the CB1 antibodies. AGP and NDR wrote the manuscript. All authors participated in manuscript drafting and critical discussion. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References List

- Alpern, Daniel, Vincent Gardeux, Julie Russeil, Bastien Mangeat, Antonio C. A. Meireles-Filho, Romane Breysse, David Hacker, et Bart Deplancke. 2019. « BRB-Seq: Ultra-Affordable High-Throughput Transcriptomics Enabled by Bulk RNA Barcoding and Sequencing ». *Genome Biology* 20 (1): 71. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1671-x>.
- Baroni, Tiziano, Iva Arato, Francesca Mancuso, Riccardo Calafiore, et Giovanni Luca. 2019. « On the Origin of Testicular Germ Cell Tumors: From Gonocytes to Testicular Cancer ». *Frontiers in Endocrinology* 10 (juin): 343. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00343>.
- Ben Maamar, Millissia, Laurianne Lesné, Kristin Hennig, Christèle Desdoits-Lethimonier, Karen R. Kilcoyne, Isabelle Coiffec, Antoine D. Rolland, et al. 2017. « Ibuprofen Results in Alterations of Human Fetal Testis Development ». *Scientific Reports* 7 (1): 44184. <https://doi.org/10.1038/srep44184>.
- Benjamini, Yoav, et Yosef Hochberg. 1995. « Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing ». *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57 (1): 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.
- Blackard, C, et K Tennes. 1984. « Human Placental Transfer of Cannabinoids ». *New England Journal of Medicine* 311 (12): 797-797. <https://doi.org/10.1056/NEJM198409203111213>.
- Blankman, Jacqueline L., Gabriel M. Simon, et Benjamin F. Cravatt. 2007. « A Comprehensive Profile of Brain Enzymes That Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol ». *Chemistry & Biology* 14 (12): 1347-56. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.006>.
- Butler, Andrew, Paul Hoffman, Peter Smibert, Efthymia Papalexi, et Rahul Satija. 2018. « Integrating Single-Cell Transcriptomic Data across Different Conditions, Technologies, and Species ». *Nature Biotechnology* 36 (5): 411-20. <https://doi.org/10.1038/nbt.4096>.
- Callaghan, Russell C., Peter Allebeck, Olof Akre, Katherine A. McGlynn, et Anna Sidorchuk. 2017. « Cannabis Use and Incidence of Testicular Cancer: A 42-Year Follow-up of Swedish Men between 1970 and 2011 ». *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 26 (11): 1644-52. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0428>.
- Chalmel, Frédéric, et Michael Primig. 2008. « The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) Suite of Tools for Molecular Systems Biology ». *BMC Bioinformatics* 9 (1): 86. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-86>.
- Cunha, Gerald R., Adriane Sinclair, Gail Risbridger, John Hutson, et Laurence S. Baskin. 2015. « Current Understanding of Hypospadias: Relevance of Animal Models ». *Nature Reviews Urology* 12 (5): 271-80. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2015.57>.
- Da Silva, Janaina, Juliette Dochez-Arnault, Chritèle Dedoist-Letimonier, Nathalie Dejuq-Rainsford, et Aurore Gely-Pernot. 2022. « The Exposure of Human Adult Testis Tissue to Cannabinoids THC and CBD Does Not Impact Testosterone Production ». *The World Journal of Men's Health*, 2022, Submitted édition.

Dalterio, S., et A. Bartke. 1981. « FETAL TESTOSTERONE IN MICE: EFFECT OF GESTATIONAL AGE AND CANNABINOID EXPOSURE ». *Journal of Endocrinology* 91 (3): 509-14. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0910509>.

Dalterio, S. L., et D. G. deRooij. 1986. « Maternal Cannabinoid Exposure Effects on Spermatogenesis in Male Offspring ». *International Journal of Andrology* 9 (4): 250-58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00888.x>.

Darde, Thomas A, Pierre Gaudriault, Rémi Beranger, Clément Lancien, Annaëlle Caillarec-Joly, Olivier Sallou, Nathalie Bonvallot, et al. 2018. « TOXsIgN: A Cross-Species Repository for Toxicogenomic Signatures ». Édité par Jonathan Wren. *Bioinformatics* 34 (12): 2116-22. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty040>.

Desdoits-Lethimonier, C, O Albert, B Le Bizec, E Perdu, D Zalko, F Courant, L Lesne, F Guille, et N Dejuq-Rainsford. 2012. « Human Testis Steroidogenesis Is Inhibited by Phthalates ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 27 (5): 1451-59.

Draskau, Monica Kam, Aurélie Lardenois, Bertrand Evrard, Julie Boberg, Frédéric Chalmel, et Terje Svingen. 2021. « Transcriptome Analysis of Fetal Rat Testis Following Intrauterine Exposure to the Azole Fungicides Triconazole and Flusilazole Reveals Subtle Changes despite Adverse Endocrine Effects ». *Chemosphere* 264 (février): 128468. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128468>.

Driesche, Sander van den, Karen R. Kilcoyne, Ida Wagner, Diane Rebourcet, Ashley Boyle, Rod Mitchell, Chris McKinnell, et al. 2017. « Experimentally Induced Testicular Dysgenesis Syndrome Originates in the Masculinization Programming Window ». *JCI Insight* 2 (6). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91204>.

Edgar, R. 2002. « Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository ». *Nucleic Acids Research* 30 (1): 207-10. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207>.

Falcon, M., S. Pichini, J. Joya, M. Pujadas, A. Sanchez, O. Vall, O. García Algar, et al. 2012. « Maternal Hair Testing for the Assessment of Fetal Exposure to Drug of Abuse during Early Pregnancy: Comparison with Testing in Placental and Fetal Remains ». *Forensic Science International* 218 (1-3): 92-96. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.022>.

Giacosa, Sofia, Catherine Pillet, Irinka Séraudie, Laurent Guyon, Yann Wallez, Caroline Roelants, Christophe Battail, et al. 2021. « Cooperative Blockade of CK2 and ATM Kinases Drives Apoptosis in VHL-Deficient Renal Carcinoma Cells through ROS Overproduction ». *Cancers* 13 (3): 576. <https://doi.org/10.3390/cancers13030576>.

Grant, Kimberly S., Rebekah Petroff, Nina Isoherranen, Nephi Stella, et Thomas M. Burbacher. 2018. « Cannabis Use during Pregnancy: Pharmacokinetics and Effects on Child Development ». *Pharmacology & Therapeutics* 182 (février): 133-51. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.014>.

Grimaldi, Paola, Daniele Di Giacomo, et Raffaele Geremia. 2013. « The Endocannabinoid System and Spermatogenesis ». *Frontiers in Endocrinology* 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00192>.

- Grotenhermen, Franjo. 2003. « Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids »: *Clinical Pharmacokinetics* 42 (4): 327-60. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00003>.
- Gurney, J., C. Shaw, J. Stanley, V. Signal, et D. Sarfati. 2015. « Cannabis Exposure and Risk of Testicular Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *BMC Cancer* 15 (1): 897. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1905-6>.
- Gurney, Jason K., Katherine A. McGlynn, James Stanley, Tony Merriman, Virginia Signal, Caroline Shaw, Richard Edwards, Lorenzo Richiardi, John Hutson, et Diana Sarfati. 2017. « Risk Factors for Cryptorchidism ». *Nature Reviews Urology* 14 (9): 534-48. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.90>.
- Hannema, Sabine E., et leuan A. Hughes. 2007. « Regulation of Wolffian Duct Development ». *Hormone Research in Paediatrics* 67 (3): 142-51. <https://doi.org/10.1159/000096644>.
- Hillard, Cecilia J. 2000. « Biochemistry and Pharmacology of the Endocannabinoids Arachidonylethanolamide and 2-Arachidonylglycerol ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 61 (1-2): 3-18. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(00\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(00)00051-4).
- Holmes, S. D., L. I. Lipshultz, et R. G. Smith. 1983. « Effect of Cannabinoids on Human Sertoli Cell Function In Vitro ». *Archives of Andrology* 11 (3): 245-51. <https://doi.org/10.3109/01485018308987489>.
- Hutchings, Donald E., Billy R. Martin, Zoi Gamagaris, Nancy Miller, et Theresa Fico. 1989. « Plasma Concentrations of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in Dams and Fetuses Following Acute or Multiple Prenatal Dosing in Rats ». *Life Sciences* 44 (11): 697-701. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90380-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90380-9).
- Hutson, John M., Jørgen M. Thorup, et Spencer W. Beasley. 2016. *Descent of the Testis*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25910-9>.
- Jarlenski, Marian, et Noelle Spencer. 2022. « Perceptions of Safety Around Use of Cannabis and Nicotine/Tobacco in Pregnancy ». *Clinical Obstetrics & Gynecology* 65 (2): 319-33. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000692>.
- Kauert, G. F., J. G. Ramaekers, E. Schneider, M. R. Moeller, et S. W. Toennes. 2007. « Pharmacokinetic Properties of 9-Tetrahydrocannabinol in Serum and Oral Fluid ». *Journal of Analytical Toxicology* 31 (5): 288-93. <https://doi.org/10.1093/jat/31.5.288>.
- Lê, Sébastien, Julie Josse, et François Husson. 2008. « FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis ». *Journal of Statistical Software* 25 (1). <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>.
- Lecluze, Estelle, Antoine D Rolland, Panagiotis Filis, Bertrand Evrard, Sabrina Leverrier-Penna, Millissia Ben Maamar, Isabelle Coiffec, et al. 2020. « Dynamics of the Transcriptional Landscape during Human Fetal Testis and Ovary Development ». *Human Reproduction* 35 (5): 1099-1119. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa041>.
- Li, Yuxi, Qiangen Wu, Xilin Li, Linda S. Von Tungeln, Frederick A. Beland, Dayton Petibone, Lei Guo, Patrick Cournoyer, Supratim Choudhuri, et Si Chen. 2022. « In Vitro Effects of Cannabidiol and Its Main Metabolites in Mouse and Human Sertoli Cells ». *Food and Chemical Toxicology* 159 (janvier): 112722. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112722>.

- Ligresti, Alessia, Luciano De Petrocellis, et Vincenzo Di Marzo. 2016. « From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology ». *Physiological Reviews* 96 (4): 1593-1659. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2016>.
- Love, Michael I, Wolfgang Huber, et Simon Anders. 2014. « Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2 ». *Genome Biology* 15 (12): 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Lozano, Jaime, Oscar García-Algar, Emilia Marchei, Oriol Vall, Toni Monleon, Rita Di Giovannandrea, et Simona Pichini. 2007. « Prevalence of Gestational Exposure to Cannabis in a Mediterranean City by Meconium Analysis ». *Acta Paediatrica* 96 (12): 1734-37. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00535.x>.
- Maamar, Millissia Ben, Laurianne Lesné, Christèle Desdoits-Lethimonier, Isabelle Coiffec, Julie Lassurgère, Vincent Lavoué, Yoann Deceuninck, et al. 2015. « An Investigation of the Endocrine-Disruptive Effects of Bisphenol A in Human and Rat Fetal Testes ». Édité par Angel Nadal. *PLOS ONE* 10 (2): e0117226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117226>.
- Mazaud-Guittot, Séverine, Christophe Nicolas Nicolaz, Christèle Desdoits-Lethimonier, Isabelle Coiffec, Millissia Ben Maamar, Patrick Balaguer, David M. Kristensen, et al. 2013. « Paracetamol, Aspirin, and Indomethacin Induce Endocrine Disturbances in the Human Fetal Testis Capable of Interfering With Testicular Descent ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (11): E1757-67. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2531>.
- Miller, Melissa R., Nadja Mannowetz, Anthony T. Iavarone, Rojin Safavi, Elena O. Gracheva, James F. Smith, Rose Z. Hill, Diana M. Bautista, Yuriy Kirichok, et Polina V. Lishko. 2016. « Unconventional Endocannabinoid Signaling Governs Sperm Activation via the Sex Hormone Progesterone ». *Science* 352 (6285): 555-59. <https://doi.org/10.1126/science.aad6887>.
- Monfort, Anaëlle, Ema Ferreira, Grégoire Leclair, et Gregory Anton Lodygensky. 2022. « Pharmacokinetics of Cannabis and Its Derivatives in Animals and Humans During Pregnancy and Breastfeeding ». *Frontiers in Pharmacology* 13 (juillet): 919630. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.919630>.
- Moses, Malcolm M, et Richard R Behringer. 2019. « A Gene Regulatory Network for Müllerian Duct Regression ». Édité par Mike Skinner. *Environmental Epigenetics* 5 (3): dvz017. <https://doi.org/10.1093/eep/dvz017>.
- Murataeva, N, A Straiker, et K Mackie. 2014. « Parsing the Players: 2-Arachidonoylglycerol Synthesis and Degradation in the CNS: 2-AG Synthesis and Degradation in the CNS ». *British Journal of Pharmacology* 171 (6): 1379-91. <https://doi.org/10.1111/bph.12411>.
- Murphy, L. L., J. Gher, et A. Szary. 1995. « Effects of Prenatal Exposure to Delta-9-Tetrahydrocannabinol on Reproductive, Endocrine and Immune Parameters of Male and Female Rat Offspring ». *Endocrine* 3 (12): 875-79. <https://doi.org/10.1007/BF02738892>.
- Nielsen, John E., Antoine D. Rolland, Ewa Rajpert-De Meyts, Christian Janfelt, Anne Jørgensen, Sofia B. Winge, David M. Kristensen, et al. 2019a. « Characterisation and Localisation of the Endocannabinoid System Components in the Adult Human Testis ». *Scientific Reports* 9 (1): 12866. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49177-y>.

———. 2019b. « Characterisation and Localisation of the Endocannabinoid System Components in the Adult Human Testis ». *Scientific Reports* 9 (1): 12866. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49177-y>.

Nomura, Daniel K., Bradley E. Morrison, Jacqueline L. Blankman, Jonathan Z. Long, Steven G. Kinsey, Maria Cecilia G. Marcondes, Anna M. Ward, et al. 2011. « Endocannabinoid Hydrolysis Generates Brain Prostaglandins That Promote Neuroinflammation ». *Science* 334 (6057): 809-13. <https://doi.org/10.1126/science.1209200>.

Orth, Joanne M. 1982. « Proliferation of Sertoli Cells in Fetal and Postnatal Rats: A Quantitative Autoradiographic Study ». *The Anatomical Record* 203 (4): 485-92. <https://doi.org/10.1002/ar.1092030408>.

Pelliniemi, Lauri J., et Mikko Niemi. 1969. « Fine Structure of the Human Foetal Testis: I. The Interstitial Tissue ». *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie* 99 (4): 507-22. <https://doi.org/10.1007/BF00340942>.

Rajpert-De Meyts, E., et C. E. Høeij-Hansen. 2007. « From Gonocytes to Testicular Cancer: The Role of Impaired Gonadal Development ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1120 (1): 168-80. <https://doi.org/10.1196/annals.1411.013>.

Rey, Rodolfo, Nathalie Josso, et Chrystèle Racine. 2000. « Sexual Differentiation ». In *Endotext*, édité par Kenneth R. Feingold, Bradley Anawalt, Alison Boyce, George Chrousos, Wouter W. de Herder, Ketan Dhatariya, Kathleen Dungan, et al. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279001/>.

Schurman, Lesley D., Dai Lu, Debra A. Kendall, Allyn C. Howlett, et Aron H. Lichtman. 2019. « Molecular Mechanism and Cannabinoid Pharmacology ». In *Substance Use Disorders*, édité par Michael A. Nader et Yasmin L. Hurd, 258:323-53. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/164_2019_298.

Scott, Hayley M., J. Ian Mason, et Richard M. Sharpe. 2009. « Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds ». *Endocrine Reviews* 30 (7): 883-925. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0016>.

Scrucca, Luca, Michael Fop, T. Brendan Murphy, et Adrian E. Raftery. 2016. « Mclust 5: Clustering, Classification and Density Estimation Using Gaussian Finite Mixture Models ». *The R Journal* 8 (1): 289-317.

Sharpe, Rm, C McKinnell, C Kivlin, et Js Fisher. 2003. « Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood ». *Reproduction*, juin, 769-84. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769>.

Simon, Gabriel M., et Benjamin F. Cravatt. 2006. « Endocannabinoid Biosynthesis Proceeding through Glycerophospho-N-Acyl Ethanolamine and a Role for α/β -Hydrolase 4 in This Pathway ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (36): 26465-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604660200>.

———. 2010. « Characterization of Mice Lacking Candidate N-Acyl Ethanolamine Biosynthetic Enzymes Provides Evidence for Multiple Pathways That Contribute to

Endocannabinoid Production in Vivo ». *Molecular BioSystems* 6 (8): 1411. <https://doi.org/10.1039/c000237b>.

Snider, Natasha T., Vyvyca J. Walker, et Paul F. Hollenberg. 2010. « Oxidation of the Endogenous Cannabinoid Arachidonoyl Ethanolamide by the Cytochrome P450 Monooxygenases: Physiological and Pharmacological Implications ». *Pharmacological Reviews* 62 (1): 136-54. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001081>.

Ueda, Natsuo, Kazuhito Tsuboi, Toru Uyama, et Taira Ohnishi. 2011. « Biosynthesis and Degradation of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol ». *BioFactors* 37 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1002/biof.131>.

Urquhart, P., A. Nicolaou, et D.F. Woodward. 2015. « Endocannabinoids and Their Oxygenation by Cyclo-Oxygenases, Lipoxygenases and Other Oxygenases ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851 (4): 366-76. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.015>.

Volkow, Nora D., Beth Han, Wilson M. Compton, et Elinore F. McCance-Katz. 2019. « Self-Reported Medical and Nonmedical Cannabis Use Among Pregnant Women in the United States ». *JAMA* 322 (2): 167. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.7982>.

Wei, Binqing Q., Tarjei S. Mikkelsen, Michele K. McKinney, Eric S. Lander, et Benjamin F. Cravatt. 2006. « A Second Fatty Acid Amide Hydrolase with Variable Distribution among Placental Mammals ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (48): 36569-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606646200>.

Welsh, Michelle, Philippa T.K. Saunders, Mark Fiskens, Hayley M. Scott, Gary R. Hutchison, Lee B. Smith, et Richard M. Sharpe. 2008. « Identification in Rats of a Programming Window for Reproductive Tract Masculinization, Disruption of Which Leads to Hypospadias and Cryptorchidism ». *Journal of Clinical Investigation* 118 (4): 1479-90. <https://doi.org/10.1172/JCI34241>.

Young-Wolff, Kelly C., Varada Sarovar, Lue-Yen Tucker, Lyndsay A. Avalos, Stacey Alexeeff, Amy Conway, Mary Anne Armstrong, Constance Weisner, Cynthia I. Campbell, et Nancy Goler. 2019. « Trends in Marijuana Use among Pregnant Women with and without Nausea and Vomiting in Pregnancy, 2009–2016 ». *Drug and Alcohol Dependence* 196 (mars): 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.12.009>.

D) Discussion et perspectives

1. La détection du système des ECB dans le testicule humain foetal

Ce travail décrit de façon inédite l'expression du système des ECB dans le testicule humain fœtal. L'expression des enzymes de synthèse et de dégradation des ECB, la présence des ligands endogènes et l'expression des récepteurs ont été investiguées, nous permettant d'émettre des hypothèses sur les voies de signalisation potentiellement impliquées dans la physiologie testiculaire humaine au cours du développement.

a) Les ligands endogènes : l'AEA et le 2-AG

Le dosage par HPLC des deux endogènes principaux, l'AEA et le 2-AG, a mis en évidence la présence de ces deux ECB dans le testicule humain entre 7 et 12 SD. Ces données nous ont indiqué une augmentation significative de la quantité d'AEA entre 7 à 12 SD, qui passe de $0,239 \pm 0,0996$ pmol/mg de protéines à $2,913 \pm 0,977$ pmol/mg de protéines. L'augmentation des quantités d'AEA peut signifier une augmentation de son importance dans la physiologie du testicule fœtal à la fin du 1^{er} trimestre de grossesse. Nous avons également observé une augmentation de la quantité du 2-AG entre 7 et 12 SD, qui passe de $477,05 \pm 149,64$ pmol/mg de protéines à $1502,10 \pm 508,20$ pmol/mg de protéines mais la forte variabilité inter-individuelle de ces données n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation significative de ce paramètre.

Entre 7 et 12 SD, le 2-AG est présent en plus grande quantité que l'AEA. Ainsi, le 2-AG est 1997 fois plus produit que l'AEA entre 7 et 8 SD, 1832 fois plus entre 8 et 10 SD, et 515 fois plus entre 10 et 12 SD. Les rôles respectifs de l'AEA et du 2-AG dans le testicule fœtal ne sont pas décrits dans la littérature mais cette observation peut suggérer une plus forte implication du 2-AG dans la physiologie testiculaire au cours du développement. Un groupe a rapporté une quantité de 2-AG 1000 fois supérieure à celle de l'AEA dans le cerveau de souris adulte (Schurman et al., 2019). Dans cette étude, il a été proposé que cette forte quantité de 2-AG implique un rôle indépendant du système des ECB de ce facteur. En effet, un métabolite issu de la dégradation du 2-AG est utilisé dans pour la synthèse de prostaglandines, des messagers pro-inflammatoires (Nomura et al., 2011). La forte quantité du 2-AG dans le testicule humain fœtal pourrait signifier des implications physiologiques

importantes, indépendantes du système des ECS, comme la régulation de l'inflammation dans ce tissu.

Dans un testicule fœtal âgé de 11 SD, ce qui correspond à la tranche d'âge où les quantités de 2-AG sont les plus hautes, les résultats d'imagerie MALDI ont permis mettre en évidence la présence *in situ* du 2-AG au niveau des cordons séminifères. La même observation avait été réalisée dans le testicule humain adulte (Nielsen et al., 2019a). En revanche, la même méthode n'a pas permis la détection *in situ* de l'AEA, potentiellement à cause de la quantité trop faible de ce facteur, en dessous des seuils de détection des appareils. Des résultats similaires avaient été observés quant à la détection de cet ECB dans le testicule humain adulte (Nielsen et al., 2019a). Le perfectionnement des méthodes expérimentales, notamment au niveau des seuils de détection, permettrait éventuellement de décrire la localisation de l'AEA dans le testicule humain fœtal.

b) Les enzymes de synthèse et de dégradation des ECB

De façon cohérente à la présence de l'AEA et du 2-AG, l'analyse de données de bulk RNA-seq a permis d'indiquer la présence des enzymes de synthèse et de dégradation de l'AEA et du 2-AG dans le testicule humain entre 6 et 17 SD.

Les deux principales enzymes de synthèse de l'AEA, la NAT10 et la NAPE-PLD, sont exprimées, de même que l'enzyme principale responsable de sa dégradation, la FAAH. Le dosage par HPLC des ECB a mis en évidence que la quantité d'AEA augmente de manière significative entre 7 et 12 SD. De façon surprenante, l'analyse des données de bulk RNA-seq nous a indiqué que l'expression de NAT10 diminue entre 7 et 12 SD tandis que celle de NAPE-PLD chute entre 9 et 12 SD. De même, l'expression de FAAH augmente entre 7 et 12 SD. Cette observation suggère l'utilisation de voies alternatives de synthèse et de dégradation de l'AEA dans le testicule entre 7 et 12 SD. L'analyse des données de bulk RNA-seq nous a effectivement indiqué l'expression de deux enzymes, l'ABHD4 et la GDE1, qui produisent de l'AEA par une voie de synthèse alternative connue (Simon and Cravatt, 2006, 2010). L'expression de GDE1 est stable entre 7 et 12 SD, et celle d'ABHD4 augmente sur cette même période, de façon cohérente avec une augmentation des quantités d'AEA entre

7 et 12 SD. Nous avons également mis en évidence que l'expression de l'enzyme de dégradation FAAH augmente entre 7 et 12 SD. De façon additionnelle à l'AEA, cette enzyme est capable de dégrader un certain nombre de substrats, dont d'autres NAE de la famille de l'AEA ainsi que plusieurs acides gras (Boger et al., 2000; Long et al., 2011). On ne peut exclure la compétition d'autres composés pour une métabolisation par la FAAH, préservant l'AEA de la dégradation. L'analyse des données de bulk RNA-seq a également mis en évidence l'expression d'une autre enzyme de dégradation de l'AEA, la FAAH2, qui diminue entre 7 et 12 SD. Cette enzyme est exprimée dans plusieurs organes chez l'homme adulte, mais pas dans le testicule (Wei et al., 2006). Elle pourrait jouer un rôle dans le développement testiculaire au cours du 1^{er} trimestre de grossesse. Nous avons observé l'expression d'une enzyme de dégradation alternative de l'AEA, la CYP4X1 (Snider et al., 2010; Urquhart et al., 2015), qui diminue entre 7 et 12 SD. Le profil d'expression de ces deux enzymes est cohérent avec une augmentation de la quantité d'AEA entre 7 et 12 SD.

L'analyse des données de bulk RNA-seq a également mis en évidence l'expression des deux enzymes principales de synthèse du 2-AG, la DAGL α et la DAGL β et de l'enzyme principale responsable de sa dégradation, la MAGL. Entre 7 et 12 SD, le dosage des ECB par HPLC a mis en évidence que la quantité de 2-AG augmente, mais de façon non significative. Cette observation est cohérente avec l'analyse des données d'expression de bulk RNA-seq de DAGL α et la DAGL β . En effet, l'expression de DAGL α est stable entre 7 et 12 SD, tandis que l'expression de la DAGL β augmente au cours de cette période. La première étape de la synthèse de 2-AG implique une enzyme de type PLC (Ueda et al., 2011; Murataeva et al., 2014), dont les isoformes PLCG1 et PLCD1 sont exprimées entre 7 et 12 SD. L'expression de PLCG1 est stable entre 7 et 12 SD, tandis que celle de PLCD1 est en augmentation entre 7 et 12 SD, ce qui est cohérent avec une tendance à l'augmentation de la quantité de 2-AG au cours de cette période. L'expression de l'enzyme de dégradation MAGL est stable entre 7 et 12 SD et celle d'une enzyme alternative du 2-AG, l'ABHD12 (Blankman et al., 2007) diminue entre 9 et 12 SD, de façon cohérente avec la tendance à l'augmentation des niveaux de 2-AG entre 7 et 12 SD. L'expression d'une autre enzyme alternative du 2-AG, l'ABHD2 (Miller et al., 2016) a également été détectée dans le testicule humain fœtal. Dans le testicule adulte, il a été montré qu'ABHD2 est exprimé dans les cellules germinales à tous les stades de différenciation, sauf au stade spermatocytes précoce, et qu'il jouerait un rôle dans la

régulation de l'entrée en méiose (Nielsen et al., 2019a). De même, ABHD2 joue un rôle essentiel lors de la réaction acrosomique des spermatozoïdes (Miller et al., 2016). L'analyse des données de bulk RNA-seq indique son augmentation entre 7 et 12 SD dans le testicule humain fœtal, ce qui ne corrèle pas avec la tendance à l'augmentation du 2-AG au cours de cette période. L'ABHD2 catalyse d'autres substrats (Naresh Kumar et al., 2016). Il est donc possible que cette enzyme ne soit pas impliquée dans la métabolisation du 2-AG dans la physiologie testiculaire humaine fœtale au cours de la période étudiée ici.

La présence de l'AEA et du 2-AG et l'expression des enzymes de synthèse principales et alternatives de l'AEA et du 2-AG dans le testicule humain fœtal, suggèrent la synthèse des ligands de façon locale dans ce tissu. Il serait pertinent d'étudier la présence des enzymes au niveau protéique, par des expériences d'immunohistochimie, d'immunofluorescence ou de Western-Blot. De plus, pour attester de l'activité catalytique de ces enzymes, il serait par exemple intéressant d'exposer des tissus testiculaires fœtaux à des inhibiteurs de ces enzymes comme il a déjà été fait par d'autres équipes (Pertwee, 2010; Mechoulam et al., 2014; Wiley et al., 2016; Di Marzo, 2018). Le dosage de l'AEA et du 2-AG dans les tissus testiculaires et le milieu de culture avant et après l'exposition à des inhibiteurs enzymatiques apporterait une information sur l'implication des enzymes de synthèse et de dégradation dans le testicule humain au cours du développement.

Il est envisageable que des sources extra-testiculaires contribuent, et même soient en grande partie responsables de la présence de l'AEA et du 2-AG dans le testicule. Chez l'homme adulte, les ECB sont des composés circulants (Hillard, 2018) et le même phénomène pourrait exister chez le fœtus, conduisant l'AEA et le 2-AG au testicule. De plus, du fait de la proximité tissulaire, ces ECB pourraient diffuser du mésonéphros adjacent. Une caractérisation de l'expression du système des ECB et le dosage des ECB seraient pertinents dans ce tissu.

c) Les récepteurs des cannabinoïdes

L'analyse de données de RNA-seq des testicules humains fœtaux nous a également permis de mettre en évidence l'expression des récepteurs spécifiques des cannabinoïdes,

CB1 et CB2. L'expression de CB1 est fortement dynamique entre 7 et 12 SD. Si son expression est très faible à 7,5 SD et à 12 SD, elle présente un pic à 9 SD. Les données de single-cell RNA-seq ont mis en évidence l'expression majoritaire de CB1 dans les gonocytes et les cellules de Sertoli entre 8 et 12 SD, et dans les cellules de Leydig à 8 SD. Au moment du pic de la quantité d'ARN de CB1, une immunohistochimie dirigée contre CB1 nous a permis de confirmer la présence de ce récepteur au niveau protéique dans le testicule humain à 9,2 SD. La protéine CB1 a été détectée au niveau de noyaux qui correspondent vraisemblablement aux gonocytes, mais pas des cellules de Sertoli. L'ARN et la protéine de CB1 sont également observés au niveau des gonocytes chez la souris au cours du développement (De Domenico et al., 2017a). Il est possible que le transcrite de CB1 ne soit pas traduit dans les cellules de Sertoli humaines fœtales. Dans le testicule humain adulte, CB1 est également détectée au niveau des cellules germinales, mais un marquage nucléaire atypique a été observé dans ces cellules (Nielsen et al., 2019a). Le marquage que nous avons observé pour ce récepteur apparaît membranaire, de façon cohérente avec l'activité canonique d'un récepteur RCPG (Hilger et al., 2018).

L'analyse des données de bulk RNA-seq a mis en évidence que l'expression de CB2 diminue entre 7 et 7,5 SD puis augmente entre 7,5 et 12 SD. Les données de single-cell RNA-seq ont indiqué la présence de CB2 dans les gonocytes et les cellules de Leydig entre 8 et 12 SD, et dans les cellules de Sertoli à 11 SD. L'expression de CB2 au niveau transcriptomique et protéique a été montrée au niveau des gonocytes murins au cours de la vie embryonnaire (De Domenico et al., 2017a). Cependant, malgré des tests expérimentaux immunohistochimiques, nous n'avons pas été capables de révéler la localisation *in situ* de la protéine CB2 dans le testicule humain fœtal. Le faible niveau d'expression transcriptomique de ce récepteur pourrait en partie expliquer la difficulté à détecter sa protéine. Il est prévu d'étudier la localisation *in situ* de l'ARNm codant pour la protéine CB2 via des expériences d'hybridation *in situ* ou de RNA-scope, couramment pratiquées dans notre laboratoire. Il est envisageable que l'ARNm de CB2 ne soit pas traduit, entraînant l'absence de l'implication de ce récepteur dans la physiologie testiculaire humaine entre 7 et 12 SD. La mise au point de protocoles immunologiques et la disponibilité d'anticorps commerciaux de bonne qualité marquant ce récepteur est encore nécessaire.

Les données de bulk RNA-seq ont également mis en évidence la présence de récepteurs alternatifs, non spécifiques du système des ECB, pouvant fixer l'AEA et/ou le 2-AG. Ainsi, GPR18, PPAR β , PPAR γ , TRPV2 ainsi que TRPV3 sont exprimés dans le testicule humain fœtal. De même, la validation de leur présence au niveau protéique serait pertinente dans cette étude.

d) Les voies de signalisation du système des ECB potentiellement impliquées dans la physiologie testiculaire humaine fœtale

Il a été montré chez la souris que le récepteur CB2 est impliqué dans la régulation de l'entrée en méiose dans les cellules germinales embryonnaires mâles et femelles (De Domenico et al., 2017a). En période post-natale chez le rongeur, l'AEA est impliqué dans la survie des cellules de Sertoli (Maccarrone et al., 2003) et CB1 est impliqué dans la différenciation des ALC (Cacciola et al., 2008). A ce jour, aucune étude ne décrit le rôle du système des ECB dans le testicule humain pendant le développement.

La présence des deux ECB principaux et l'expression des récepteurs spécifiques des cannabinoïdes dans le testicule humain fœtal suggèrent l'implication du système des ECB dans la physiologie testiculaire au cours du développement chez l'homme.

Le 2-AG est un agoniste de forte efficacité de CB1 et possède une plus forte affinité pour ce récepteur que l'AEA (Hillard, 2000). Sa localisation intra-tubulaire, révélée par MALDI, et la localisation de la protéine de CB1, révélée par immunohistochimie au niveau des gonocytes, suggère une implication de la signalisation 2-AG/CB1 dans ces cellules. Cette signalisation serait particulièrement importante autour du pic d'expression de CB1, à environ 9 SD.

Le récepteur CB2 et les récepteurs alternatifs des ECB pourraient également être impliqués dans la physiologie testiculaire fœtale. Les récepteurs alternatifs du système des ECB n'étant pas spécifiques des ECB, leur implication dans le développement testiculaire est ardue à étudier. En revanche, CB1 et CB2 sont des récepteurs spécifiques aux cannabinoïdes. Une méthode pour attester de leur implication dans la physiologie testiculaire au cours de la vie fœtale chez l'homme serait l'exposition de tissus testiculaires humains fœtaux en culture avec des agonistes ou des antagonistes spécifiques d'un récepteur ou de l'autre.

Type cellulaire	Test	8-10 SD			10-12 SD		
		CBD	$\Delta 9$ -THC	CBD/ $\Delta 9$ -THC	CBD	$\Delta 9$ -THC	CBD/ $\Delta 9$ -THC
Leydig							
Sécrétion de testostérone	Dosage	↘	↔	↘	↔	↘	↘
Surface occupée par les cellules de Leydig	IHC	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Prolifération extracordonale	IHC	↔	↘	↘	↔	↔	↘
Apoptose extracordonale	IHC	↔	↗ ns	↗ ns	↔	↔	↔
Expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse	BRB-seq	↔	↔	↔	↔	↔	↘
Expression de gènes impliqués dans le métabolisme général des stéroïdes, des lipides stérols et du cholestérol	BRB-seq	↘	↘	↘	↔	↔	↘
Expression du gène codant pour INSL3	BRB-seq	↘	↔	↔	↔	↔	↘
Gonocytes et cellules de Sertoli							
Sécrétion d'AMH	Dosage	↔	↘	↘	↔	↔	↘ ns
Surface occupée par les cellules de Sertoli	IHC	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Prolifération intracordonale	IHC	↔	↔	↔	↔	↔	↘
Apoptose intracordonale	IHC	↗	↗	↗	↔	↗	↗
Surface occupée par les gonocytes	IHC	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Testicule entier							
Expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire	BRB-seq	↘	↘	↘	↔	↔	↘
Expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN	BRB-seq	↗	↘	↔	↔	↔	↗
Expression de gènes impliqués dans la réponse aux stress cellulaires	BRB-seq	↗	↗	↗	↗	↔	↗
Expression de gènes impliqués dans la transcription et la traduction	BRB-seq	↗↘	↘	↗	↘	↔	↗↘
Expression de gènes impliqués dans le trafic intracellulaire	BRB-seq	↗↘	↗↘	↘	↔	↔	↘
Expression de gènes impliqués dans le transport et l'homéostasie d'ions et de métaux	BRB-seq	↗↘	↗	↗↘	↔	↗	↗

Table 7 : Résumé des effets d'une exposition de 72 heures d'explant testiculaires fœtaux humains au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD.

Des explants testiculaires humains âgés de 8 à 10 semaines de développement (SD) et 10 à 12 SD cultivés *ex vivo* ont été exposés pendant 72 heures à 10^{-5} M de CBD, de $\Delta 9$ -THC ou un mélange de CBD et de $\Delta 9$ -THC (ratio 1 :1) (CBD/ $\Delta 9$ -THC). Dans ce tableau sont présentés les résultats d'expériences de dosage de facteur dans le milieu de culture des explants testiculaires (« dosage »), de comptages et de surfacages cellulaires à la suite d'immunohistochimies (« IHC ») et des résultats transcriptomiques de *Bulk RNA Barcoding and sequencing* (« BRB-seq »). Les effets des différents traitements par rapport à leur condition contrôle respective sont représentés par des flèches. « ns » indique un résultat non significatif des tests statistiques. Les données de BRB-seq ayant été acquises sur testicule entier, le regroupement selon type cellulaire est hypothétique.

2. Effets d'une exposition au Δ 9-THC et/ou au CBD sur le testicule humain fœtal

L'objectif de ce travail expérimental était d'évaluer les conséquences d'une exposition dite « courte » (72 heures) et « longue » (14 jours) d'explants testiculaires humains fœtaux au Δ 9-THC et/ou au CBD à des doses issues de données de pharmacocinétique obtenues chez l'homme adulte.

a) Effets d'une exposition d'explants testiculaires fœtaux humains au Δ 9-THC et/ou au CBD

Nous avons étudié les impacts d'une exposition du testiculaire au Δ 9-THC et/ou au CBD sur la physiologie globale du testicule fœtal, en nous focalisant sur la sécrétion d'hormones essentielles pour l'homéostasie du tissu telle que la testostérone et l'AMH, ainsi que sur la prolifération et la viabilité des cellules. De plus, pour répondre à notre hypothèse selon laquelle le Δ 9-THC et le CBD sont capables perturber la différenciation des cellules germinales, nous avons également investigué ce phénomène.

Les résultats d'un traitement au Δ 9-THC et/ou au CBD sur les explants testiculaires humains fœtaux sont présentés selon les trois types cellulaires principaux du testicule embryonnaire, les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les gonocytes. Les données obtenues lors de cette étude sont résumées dans la **Table 7**.

(1) Les cellules de Leydig

Afin d'étudier l'effet du Δ 9-THC et/ou du CBD sur l'activité des cellules de Leydig, nous avons analysé leur capacité à sécréter une hormone, la testostérone. La concentration de testostérone a été dosée dans le milieu de culture des explants testiculaires exposés à du Δ 9-THC seul, du CBD seul ou un mélange équimolaire de Δ 9-THC et de CBD à des concentrations allant de 10^{-7} M à 10^{-5} M pendant 72 heures. L'exposition d'explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD à 10^{-5} M de CBD et à 10^{-5} M du mélange de Δ 9-THC et de CBD

entraîne une diminution significative de leur sécrétion de testostérone. Nous avons également noté que l'exposition d'explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD à du $\Delta 9$ -THC à 10^{-5} M entraîne une tendance à la diminution de la sécrétion de testostérone, qui n'est pas significative du fait de la haute variabilité inter-individuelle dans ce groupe. Il serait judicieux d'augmenter le nombre de réplicats biologiques dans cette condition. Une diminution significative de la sécrétion de testostérone est observée chez les explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD après une exposition à 10^{-5} M de $\Delta 9$ -THC, et à 10^{-6} M et 10^{-5} M d'un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD.

L'effet anti-androgénique du CBD et du $\Delta 9$ -THC a déjà été rapporté chez l'embryon de rat et de souris après une exposition *in vivo* à du $\Delta 9$ -THC ou du CBD au cours du développement (Dalterio and Bartke, 1981; Dalterio and deRooij, 1986a; Murphy et al., 1995). Nos résultats montrent ici un effet gonadique direct du $\Delta 9$ -THC et du CBD sur la sécrétion de testostérone par le testicule humain fœtal *ex vivo*. Nos résultats mettent également en évidence, l'existence d'une sensibilité différente des explants testiculaires au $\Delta 9$ -THC et au CBD selon leur âge. De plus, pour les deux classes d'âges, l'exposition au mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD à 10^{-5} M entraîne une diminution significativement plus importante de la sécrétion de testostérone par les explants testiculaires par rapport aux molécules seules à 10^{-5} M. Ces observations pourraient découler entre autres de l'expression dynamique des récepteurs activés par le $\Delta 9$ -THC et le CBD décrites plus haut entre 8 et 12 SD. Des paragraphes sont consacrés plus bas sur les modes d'action potentiels du $\Delta 9$ -THC et du CBD dans le testicule fœtal et l'effet de l'âge des tissus.

Après avoir investigué les effets d'une exposition de 72 heures au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD des explants testiculaires, une exposition de 14 jours à ces deux phytocannabinoïdes a été étudiée. L'augmentation du temps d'exposition avait ici pour but de mimer la chronicité d'exposition parfois retrouvée chez la femme enceinte. En effet, une partie des femmes consommatrices de cannabis pendant la grossesse expliquent le consommer dans un but médical, afin de soulager certains symptômes associés à la grossesse, comme les nausées et l'insomnie, et pour atténuer des symptômes associés à des pathologies chroniques (Chang et al., 2019; Vanstone et al., 2021; Satti et al., 2022).

La sécrétion de testostérone des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD étant affectée par le mélange $\Delta 9$ -THC + CBD dès 10^{-6} M, cette classe d'âge a été investiguée en premier lieu.

Des explants testiculaires humains âgés de 10 à 12 SD ont été traités avec du Δ^9 -THC ou du CBD à 10^{-5} M ou à un mélange de Δ^9 -THC et de CBD à des concentrations de 10^{-6} M et 10^{-5} M pendant 14 jours. La sécrétion de testostérone dans le milieu de culture a été dosée après plusieurs temps d'exposition aux différents traitements, dont 4 jours, 8 jours et 14 jours.

En culture courte, une exposition des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD à du Δ^9 -THC ou à un mélange de Δ^9 -THC et de CBD à 10^{-5} M pendant 72 heures entraîne une diminution significative de la sécrétion de testostérone. De façon surprenante, nous avons noté l'absence apparente d'effets sur la sécrétion de testostérone de ces mêmes traitements après 4 jours d'exposition en culture longue. De plus, alors que nous observions un effet négatif du mélange de Δ^9 -THC et de CBD à 10^{-6} M dès 72 heures, nous n'avons noté aucun effet de ce traitement sur les explants testiculaires après 4, 8 et 14 jours d'exposition. Ces résultats peuvent être en partie dus à l'ajout d'insuline, de transferrine et de sélénium (ITS) dans le milieu de culture longue, indispensables au maintien des explants testiculaires humains fœtaux en culture prolongée. L'ITS est fréquemment utilisé en culture cellulaire dans le milieu de culture de plusieurs types cellulaires humains (Ranaldi et al., 2003; Liu et al., 2014; Mainzer et al., 2014; Liu et al., 2019; Belavgeni et al., 2019; Kang et al., 2019), dont les explants testiculaires adultes (Roulet et al., 2006) car ce mélange promeut la survie cellulaire. L'ajout d'ITS dans le milieu de culture des explants testiculaires fœtaux humains en culture longue pourrait augmenter leur résistance aux effets néfastes de molécules environnementales, comme le Δ^9 -THC et le CBD, jusqu'à une certaine mesure.

L'exposition des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec 10^{-5} M de Δ^9 -THC seul entraîne une diminution significative de la sécrétion de testostérone après 14 jours d'exposition. De plus, l'exposition à un mélange de Δ^9 -THC et de CBD à 10^{-5} M entraîne une diminution forte de la sécrétion de testostérone dès 8 jours d'exposition et la supprime totalement après 14 jours d'exposition. Cette observation illustre l'importance de considérer l'exposition chronique du testicule fœtal humain aux deux phytocannabinoïdes testés dans cette étude. De façon surprenante, nous avons également observé qu'un traitement des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec du CBD à 10^{-5} M dès 4 jours d'exposition entraîne une diminution significative de la sécrétion de testostérone. Cet effet est également observé après 8 jours d'exposition et d'autant plus après 14 jours d'exposition. Cet effet du CBD seul à 10^{-5} M n'a pas été observé en culture courte dans cette classe d'âge après 72

heures d'exposition. Ces observations suggèrent que les effets négatifs du CBD sur la sécrétion de testostérone par les explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD n'apparaissent qu'au moins après 72 heures d'exposition.

Dans les deux classes d'âges, les impacts sur la sécrétion de testostérone par les explants testiculaires après une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD étant majeurs à la concentration de 10^{-5} M, nous avons investigué plusieurs paramètres cellulaires et moléculaires à cette dose afin d'expliquer la baisse de la sécrétion de testostérone observée.

La surface occupée par les cellules de Leydig a été déterminée par immunohistochimie dans les explants testiculaires âgés de 8 à 12 SD exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD à 10^{-5} M. Après 72 heures d'exposition, ce paramètre n'est significativement pas affecté par aucun traitement dans les deux classes d'âges étudiées. Cependant, le temps de culture est possiblement trop court pour pouvoir observer un effet des traitements sur ce paramètre. La protéine CYP11A1, utilisée pour le marquage des cellules de Leydig, pourrait être conservée un certain temps dans les cellules même celles dont la viabilité commence à être altérée. Il est prévu d'étudier la surface occupée par les Leydig dans des explants testiculaires cultivés pendant 14 jours afin de déterminer si un traitement au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD entraîne une diminution de ce paramètre.

Nous avons ensuite investigué les effets des différents traitements sur la prolifération cellulaire au niveau du compartiment extracordonal, où on trouve entre autres les cellules de Leydig. Dans les explants testiculaires exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD à une dose de 10^{-5} M pendant 72 heures, les cellules en prolifération dans le compartiment extracordonal ont été comptées après des immunohistochimies. Une diminution significative de la densité de cellules prolifératives extracordonales a été observée lorsque les explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD et de 10 à 12 SD ont été traités avec un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD. Ces traitements correspondent à des conditions pour lesquelles nous avons observé une diminution de la sécrétion de la testostérone par les explants testiculaires en culture courte. Comme il a été vu plus haut, la surface occupée par les cellules de Leydig n'est affectée dans

aucune condition. La diminution de la sécrétion hormonale par les explants testiculaires n'est à priori donc pas due à une diminution du nombre de cellules de Leydig, en conséquence d'une diminution de leur prolifération. La diminution de la prolifération cellulaire extracordone pourrait être signe ici d'une altération du métabolisme cellulaire des cellules de Leydig.

Nous avons également observé une diminution significative de la prolifération extracordone après une exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD avec du Δ^9 -THC, une condition pour laquelle la diminution de sécrétion de testostérone n'est pas significative après 72 heures d'exposition. Cette observation peut suggérer que si la viabilité cellulaire des explants est affectée par ce traitement, les cellules de Leydig peuvent éventuellement être capables de maintenir la sécrétion de testostérone à un niveau similaire à la condition contrôle.

A l'inverse, l'exposition d'explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec du Δ^9 -THC seul induit une diminution de la sécrétion de testostérone mais n'affecte pas la prolifération extracordone. L'effet anti-androgénique de ce traitement sera discuté plus bas.

Il est important de garder à l'esprit qu'entre 8 et 14 SD, le tissu interstitiel se remplit graduellement de cellules de Leydig qui vont constituer la grande majorité des cellules du tissu interstitiel (Pelliniemi and Niemi, 1969). Dans nos deux classes d'âge, et particulièrement la classe d'âge 8-10 SD, il est envisageable que l'altération de la prolifération cellulaire entraînée par le Δ^9 -THC et/ou le CBD observée en immunohistochimie concerne d'autres types cellulaires dans le compartiment extracordone que les cellules de Leydig. Pour identifier le ou les type(s) cellulaire(s) dont la prolifération est altérée par une exposition au Δ^9 -THC et/ou au CBD, il serait pertinent de réaliser des doubles marquages immunologiques sur les explants testiculaires, avec un marqueur des cellules en apoptose et un marqueur des cellules de Leydig.

Afin d'investiguer l'hypothèse d'une altération du métabolisme cellulaire des cellules de Leydig, causant la diminution de la sécrétion de testostérone dans certaines conditions, nous avons ensuite étudié l'effet des différents traitements sur la viabilité des cellules de

Leydig. Après des immunohistochimies, les cellules en apoptose ont été comptées dans le tissu extracordonal d'explants testiculaires exposés pendant 72 heures au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD à une dose de 10^{-5} M. La densité des cellules en apoptose n'est significativement modifiée dans aucune condition. Nous avons noté une tendance à l'augmentation de l'apoptose après l'exposition d'explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD avec du $\Delta 9$ -THC seul ou en mélange avec du CBD. De la même façon qu'avec la diminution de la prolifération observée dans ces conditions, cette tendance à une augmentation de l'apoptose serait une conséquence de l'altération du métabolisme cellulaire des cellules de Leydig.

Afin d'observer l'effet des traitements à plus long terme sur l'apoptose des cellules de Leydig, nous avons marqué les cellules en apoptose par immunohistochimie dans des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD exposés pendant 14 jours avec du $\Delta 9$ -THC ou du CBD à 10^{-5} M ou à un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD à des concentrations de 10^{-6} M et 10^{-5} M. L'exposition au $\Delta 9$ -THC et au CBD seuls à 10^{-5} M, qui entraîne une diminution significative de la sécrétion de testostérone après 14 jours d'exposition, n'entraîne pas d'augmentation visible de l'apoptose dans le compartiment extracordonal des explants testiculaires. Ces observations suggèrent que l'exposition à 10^{-5} M de $\Delta 9$ -THC ou au CBD pendant 14 jours impacte toujours le métabolisme cellulaire des cellules de Leydig, conduisant à l'altération de leur sécrétion de testostérone, sans être visiblement toxique. En revanche, l'exposition des explants testiculaires à un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD à 10^{-5} M pendant 14 jours, un traitement qui inhibe totalement la sécrétion de testostérone, entraîne une apoptose massive visible dans le compartiment extracordonal. Ce résultat pourrait indiquer la toxicité du traitement pour les cellules de Leydig après 14 jours d'exposition. Il est prévu de quantifier la densité des cellules apoptotiques et de réaliser des doubles marquages dans ces tissus pour pouvoir comparer plus précisément les différentes conditions.

Pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la diminution de leur sécrétion de testostérone par les explants testiculaires selon les différents traitements, nous avons analysé la modification de l'expression d'un grand nombre de gènes par BRB-seq dans les explants testiculaires âgés de 8 à 12 SD exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD à 10^{-5} M pendant

72 heures. Au total, l'expression de 187 gènes est modifiée de façon significative dans nos différentes conditions. Ces gènes sont regroupés selon leur profil d'expression en 9 clusters, de P1 à P9.

Nous avons investigué si les effets anti-androgéniques des différents traitements pouvaient être induits par une altération directe de la synthèse de testostérone.

L'hCG, qui se fixe sur le récepteur à la LH, stimule la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig chez le fœtus (Huhtaniemi et al., 1977; Huhtaniemi and Lautala, 1979; Word et al., 1989). Or, une étude a mis en évidence que le traitement *in vitro* de testicules murins à partir de $4,8 \times 10^{-6}M$ entraîne une diminution de l'expression du récepteur à la LH dans le testicule (Banerjee et al., 2011b). Une diminution de la sensibilité des cellules de Leydig à l'hCG expliquerait la diminution de la sécrétion de testostérone par les explants testiculaires traités avec du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD. Notre analyse des données de BRB-seq nous a cependant indiqué que l'expression du récepteur à la LH n'est pas affectée après l'exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD et de 10 à 12 SD avec du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD.

Nous avons également investigué si l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse était modifiée dans ces tissus. En effet, une étude *in vitro* chez le rat a mis en évidence que le traitement de microsomes testiculaires de rat avec $5 \times 10^{-5} M$ de $\Delta 9$ -THC et $10^{-4}M$ de CBD entraîne une diminution de l'activité de la *Progesterone 17 α -hydroxylase*, qui catalyse une des premières étapes de la stéroïdogénèse. Dans une autre étude, le traitement chronique de souris *in vivo* avec 3 mg/kg par jour de cannabis entier entraîne la diminution de l'activité de l'enzyme 3β -HSD, qui catalyse la dernière étape de la synthèse de testostérone (Banerjee et al., 2011b). L'analyse des résultats de BRB-seq a mis en évidence que l'exposition des explants testiculaires humains âgés 10 à 12 SD avec un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD pendant 72 heures entraîne la diminution significative de l'expression de l'enzyme *Cytochrome P450, family 17, subfamily A, member 1 (CYP17A1)*, qui catalyse la transformation de prégnenolone, une des premières étapes de la stéroïdogénèse. Dans toutes les autres conditions, nous n'avons pas observé d'altération de la modification de l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse.

La première étape de la stéroïdogénèse implique la translocation du cholestérol au sein de la mitochondrie (Miller and Bose, 2011), avant qu'il ne soit métabolisé en précurseur

stéroïdogénique jusqu'à la synthèse d'hormones. Nous avons donc ensuite étudié par BRB-seq si l'expression d'un grand nombre de gènes qui jouent un rôle plus ou moins direct dans la synthèse, le transport et le métabolisme du cholestérol, était modifiée par nos différents traitements. Nous avons mis en évidence plusieurs enrichissements (des gènes avec le même profil d'expression qui sont impliqués dans fonctions cellulaires très similaires) de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol au niveau des clusters P1 et P2. Ces clusters correspondent en très grande majorité à une diminution de l'expression génique après une exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD à du CBD ou un mélange de CBD et de Δ^9 -THC et des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec un mélange de CBD et de Δ^9 -THC. Parmi ces gènes, on peut trouver des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, le métabolisme des lipides, le métabolisme des stéroïdes et la biosynthèse du cholestérol tel que le gène *3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase* (HMGCR). Nous avons également mis en évidence la diminution dans les explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD exposés à un mélange de Δ^9 -THC et de CBD de l'expression du gène *Low density lipoprotein receptor* (LDLR), qui permet l'intégration du cholestérol issu de la circulation générale au sein de la cellule.

Nos résultats suggèrent que l'exposition d'explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD avec du CBD ou un mélange de CBD et de Δ^9 -THC et d'explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec un mélange de CBD et de Δ^9 -THC à 10^{-5} M pendant 72 heures entraîne une forte altération de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie globale du cholestérol avec, ou non, une altération du métabolisme cellulaire extracordonal au niveau histologique. En conséquence, la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig est significativement altérée dans ces conditions.

L'exposition d'explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD avec du Δ^9 -THC à 10^{-5} M pendant 72 heures induit une diminution de la testostérone qui n'atteint pas la significativité. Ce traitement entraîne également l'altération significative du métabolisme cellulaire extracordonal au niveau histologique, ainsi qu'une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol. Ces deux observations peuvent s'agir d'un signe annonciateur d'une diminution significative de la sécrétion de testostérone si la culture se prolongeait à plus long terme. Il est prévu de cultiver des explants testiculaires de cette classe d'âge pendant 14 jours.

A l'inverse, l'exposition d'explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec du $\Delta 9$ -THC à 10^{-5} M pendant 72 heures induit une diminution de la sécrétion de testostérone mais ne modifie pas significativement le métabolisme cellulaire extracordonal au niveau histologique ni l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol ou la stéroïdogénèse. L'analyse transcriptomique par BRB-seq a révélé que seule l'expression de 4 gènes est altérée dans cette condition. Les effets transcriptomiques de ce traitement sur l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de la testostérone, pourraient être trop subtiles et ne pas dépasser les seuils de significativité établis dans notre protocole de BRB-seq.

L'altération du métabolisme du cholestérol est cohérente avec une altération de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig. Cependant, le BRB-seq étant effectué sur tissu entier, on ne peut pas exclure que d'autres cellulaires testiculaires puissent être concernés par ces changements d'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol. Le cholestérol est en effet un facteur régulateur important de l'activité des cellules germinales ainsi que des cellules de Sertoli (Sèdes et al., 2018). Des analyses plus poussées de nos données de BRB-seq, avec des méthodes telle que la déconvolution, nous permettront prochainement de pouvoir distinguer le(s) type(s) cellulaire(s) dans le(s)quel(s) nous observons l'altération de l'expression des gènes cités plus haut.

Nous avons également étudié par BRB-seq la modification de l'expression d'un gène codant pour une autre hormone sécrétée par les cellules de Leydig : l'INSL3. L'exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD avec du CBD seul et d'explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD entraîne une diminution de l'expression de ce gène. Pour vérifier si ces traitements affectent la sécrétion de ce facteur par les cellules de Leydig, il est prévu d'effectuer des dosages d'INSL3 dans les milieux de cultures de nos différents traitements dans les deux classes d'âge. L'effet du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD sur les cellules de Leydig ne serait donc pas restreint à la stéroïdogénèse. Ce résultat pourrait être cohérent avec une altération du métabolisme cellulaire global des cellules de Leydig, causant une altération des sécrétions hormonales des cellules de Leydig, dont la testostérone et l'INSL3.

Les impacts spécifiques du $\Delta 9$ -THC et du CBD sur les cellules de Sertoli et les gonocytes dans les explants testiculaires âgés de 8 à 12 SD exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD à la concentration la plus forte testée ($10^{-5}M$) pendant 72 heures ont ensuite été investigués.

(2) Les cellules de Sertoli et les gonocytes

Nous avons tout d'abord investigué la capacité des cellules de Sertoli à sécréter une hormone, l'AMH. Cette hormone a été dosée dans le milieu de culture des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD et de 10 à 12 SD après une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD. Une exposition avec du $\Delta 9$ -THC ou un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD entraîne une diminution significative de la sécrétion d'AMH par les explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD. Une diminution non significative de la sécrétion d'AMH a également été observée après une exposition des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec le mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD. Ce paramètre sera évalué après une culture à plus long terme des explants testiculaires aux différents traitements.

Afin d'expliquer cette baisse de sécrétion d'AMH par les explants testiculaires, nous avons étudié la surface occupée par les cellules de Sertoli par immunohistochimie dans les explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD et de 10 à 12 SD exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD. Ce paramètre n'est significativement pas affecté par aucun traitement aux deux classes d'âges étudiées. Cette observation peut révéler, de la même façon que pour la surface occupée par les cellules de Leydig, un temps de culture trop court pour observer un effet la surface occupée par les cellules de Sertoli. La protéine AMH, utilisée pour marquer les cellules de Sertoli, pourrait être conservée même dans des cellules dont la viabilité est altérée. Il est prévu d'effectuer le surfaçage des cellules de Sertoli dans les explants testiculaires exposés pendant 14 jours aux différents traitements pour conclure de l'effet d'une culture plus longue sur ce paramètre.

Afin de déterminer si la diminution de la sécrétion d'AMH est liée avec altération du métabolisme cellulaire des cellules de Sertoli, nous avons investigué les effets des différents traitements sur la prolifération dans le compartiment intracordonal, où sont trouvées entre autres les cellules de Sertoli. Les cellules prolifératives intracordonaux ont été marquées par

immunohistochimie dans les explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD et de 10 à 12 SD exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD, puis comptées. L'exposition d'explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD induit la diminution significative de la densité de cellules en prolifération dans le compartiment intracordonal. Les autres traitements n'affectent pas significativement ce paramètre.

Nous avons ensuite marqué par immunohistochimie puis compté, les cellules en apoptose dans le compartiment intracordonal d'explants testiculaires exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD. Une augmentation significative de la densité des cellules apoptotiques intracordonaux a été observée après l'exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD avec du $\Delta 9$ -THC ou un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD et des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD. L'altération de la viabilité des cellules de Sertoli a été observée dans une étude après un traitement de cellules de Sertoli humaines adultes *in vitro* avec du CBD dès $7 \times 10^{-6} \text{M}$ (Li et al., 2022). Une autre étude n'a pas révélé d'altérations de l'activité des cellules de Sertoli humaines adultes après une exposition *in vitro* au $\Delta 9$ -THC ou au CBD (Holmes et al., 1983). Cependant la dose maximale testée dans cette étude ($6,4 \times 10^{-7} \text{M}$) est inférieure à la dose testée dans notre étude, n'excluant pas un effet néfaste du $\Delta 9$ -THC sur les cellules de Sertoli avec une dose de 10^{-5}M .

Il est important de garder à l'esprit que le compartiment intracordonal comprend également les gonocytes ainsi que les CMP. Il a été noté que la majorité des cellules prolifératives et apoptotiques dans le compartiment intracordonal ne correspondent pas aux CMP, très facilement distinguables de par leur morphologie et leur localisation. Cependant, dans toutes les conditions étudiées, il est possible que la prolifération et l'apoptose des gonocytes soient modulées par les traitements, additionnellement à celles des cellules de Sertoli. Notre approche expérimentale ne nous permet pas de distinguer les gonocytes des cellules de Sertoli parmi les cellules prolifératives et apoptotiques marquées par immunohistochimie. Il serait intéressant de réaliser des doubles marquages immunologiques ciblant un marqueur des cellules en prolifération ou en apoptose et un marqueur des gonocytes ou des cellules de Sertoli afin de pouvoir conclure sur le ou les type(s) cellulaire(s) en prolifération et en apoptose dans le compartiment intracordonal.

L'analyse des données de BRB-seq a indiqué que les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'AMH ne sont modifiés dans aucune condition. L'ensemble de nos observations

suggèrent que dans notre étude, l'exposition d'explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD au $\Delta 9$ -THC ou à un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD et d'explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD à 10^{-5} M pendant 72 heures altère le métabolisme cellulaire des cellules de Sertoli, conduisant à une diminution de la sécrétion d'AMH par ces cellules.

De façon surprenante, l'exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD avec du CBD entraîne une augmentation de l'apoptose intracordonale sans induire de diminution de la sécrétion d'AMH. Ceci pourrait s'expliquer par un maintien de la sécrétion d'AMH par les cellules de Sertoli, malgré l'altération de leur métabolisme cellulaire. D'autre part dans cette condition, l'apoptose intracordonale pourrait en majorité concerner les gonocytes. Notre approche de double marquage immunologique nous permettra de conclure sur cette hypothèse.

Chez l'homme adulte, la consommation de cannabis et le développement de TGCT ont été significativement corrélées (Gurney et al., 2015a; Ghasemiesfe et al., 2019a; Song et al., 2020a). Cette observation implique que certains composants du cannabis sont capables d'altérer la différenciation des cellules germinales adultes, conduisant à des TGCT. Nous avons donc investigué la capacité du $\Delta 9$ -THC et du CBD à altérer la différenciation des gonocytes, entraînant l'apparition de lésions pré-cancéreuses, les GCNIS, précurseurs des TGCT (pour revue : Rajpert-De Meyts and Hoei-Hansen, 2007; Baroni et al., 2019).

Nous avons marqué par immunohistochimie puis compté le nombre de gonocytes dans les explants testiculaires exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD à la concentration la plus forte testée (10^{-5} M) pendant 72 heures. La densité cellulaire des gonocytes n'est modifiée dans aucune condition. Le comptage des gonocytes dans les tissus exposés pendant 14 jours aux différents traitements est en cours.

La transformation tumorale est souvent associée avec une dérégulation des mécanismes de prolifération et l'apoptose. Cependant, comme décrit plus haut, aucune condition n'a entraîné d'augmentation significative de la prolifération ou de diminution significative de l'apoptose au niveau histologique dans le compartiment intracordonal.

Les GCNIS présentent un profil génique ressemblant à celui des PGC et des gonocytes et expriment des gènes spécifiques des cellules germinales et d'autres associés à la pluripotence, à l'état indifférencié et au développement tumorigène. On peut citer les facteurs PRDM1, MAGEA4, DDX4, TSPY, PLAP, C-KIT et son ligand SCF, SOX17, POU5F1, NANOG, LIN28, AP-2 γ , GST et CD44 (Honecker et al., 2004; Looijenga et al., 2014; Rajpert-De Meyts et al., 2015; Nettersheim et al., 2016). De plus, les GCNIS présentent une diminution de l'expression de cyclines du cycle cellulaire ainsi que de certains suppresseurs de tumeurs TP53 et RB1. Nous avons analysé les données de BRB-seq afin d'investiguer si l'exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 12 SD au Δ 9-THC et/ou au CBD pouvait déréguler l'expression de ces gènes. L'expression d'aucun gène cité ci-dessus n'est affectée par nos différents traitements.

Enfin, il a été identifié qu'un mécanisme potentiel de la transformation des gonocytes en GCNIS serait le dérèglement de l'inhibition de leur entrée en méiose (Jørgensen et al., 2013) et il a été montré que l'activation *in vitro* du récepteur CB2 du système des ECB entraîne effectivement une entrée anormale des gonocytes en méiose chez la souris (De Domenico et al., 2017b). Nous avons donc également investigué dans nos données de BRB-seq si l'exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 12 SD au Δ 9-THC et/ou au CBD pouvait modifier l'expression de gènes associés dans la régulation de la méiose mais aucune différence significative n'a été observée entre les conditions traitées et les conditions contrôles.

L'ensemble des résultats acquis sur les gonocytes ne suggère pas de transformation tumorale de ces cellules.

(3) Le testicule entier

Nous avons formulé plus haut l'hypothèse selon laquelle une exposition au Δ 9-THC et/ou au CBD peut affecter le métabolisme cellulaire des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli, induisant des modifications au niveau histologique de la prolifération et de l'apoptose intra- et extracordone. Cette altération du métabolisme cellulaire des cellules de Leydig et de Sertoli conduirait à une altération de leurs capacités endocrines respectives.

Nous avons donc investigué les données de BRB-seq obtenus sur les explants testiculaires âgés de 8 à 12 SD exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD à 10^{-5} M pendant 72 heures et étudié la modulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme global des cellules. En particulier, nous avons étudié l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, les mécanismes de réparation de l'ADN, les réponses à différents stress cellulaires, la régulation de la transcription et de la traduction, ainsi que la régulation du trafic intracellulaire et du cytosquelette.

L'exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD avec du CBD, du $\Delta 9$ -THC ou un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD induit la diminution significative de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire. L'exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD à du CBD induit la diminution significative de l'expression gènes, en grande majorité situés dans les clusters P1 et P2, tel que le gène *F-Box protein 5* (FBXO5), impliqué dans la régulation de l'activité du complexe *Anaphase promoting complex* (APC). L'exposition des explants testiculaires à du $\Delta 9$ -THC est corrélée avec une diminution significative de l'expression de gène distribués sur les clusters P1 et P3, comme le gène *Kinetochore protein Spc24* (SPC24), qui régule la ségrégation des chromosomes. Enfin, l'exposition avec un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD entraîne la diminution de l'expression de gènes situés dans les clusters P1 et P4 comme le gène *Baculoviral IAP repeat containing 5* (BIRC5), qui régule la ségrégation des chromosomes pendant la mitose.

L'exposition des explants testiculaires âgé de 8 à 10 SD à du CBD et/ou à du THC entraîne également une modification de l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Ainsi, l'exposition d'explants testiculaires à du CBD entraîne l'augmentation de l'expression de gènes situés dans le cluster P5 et P6 tels que *DNA cross-link repair 1C* (DCLRE1C), impliqué dans la réparation de l'ADN double brin par jonctions d'extrémités non homologues. L'exposition d'explants testiculaires avec du $\Delta 9$ -THC à 10^{-5} M pendant 72 heures entraîne la diminution de l'expression de gènes regroupés dans le cluster P3 dont *Fanconi anemia group D2 protein* (FANCD2), impliqué dans la réparation de l'ADN double brin par plusieurs mécanismes. Enfin, l'exposition avec un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD entraîne une augmentation de l'expression du gène *Abraxas 1, BRCA1 A complex subunit* (ABRAXAS1) situé sur le cluster P8, qui est impliqué dans la réparation de l'ADN double brin.

Nous avons également observé dans ces conditions l'augmentation significative de l'expression de gènes dont les protéines interviennent lors de la réponse au stress cellulaire, majoritairement sur le cluster P5. On peut citer par exemple *DNA damage inducible transcript 3* (DDIT3), induit en réponse d'un stress au niveau du réticulum endoplasmique, dont l'expression est augmentée après une exposition des explants testiculaires au CBD, au $\Delta 9$ -THC, ou au mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD.

L'exposition des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD à un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD à 10^{-5} M pendant 72 heures induit également la diminution significative de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire, situés sur le cluster P1, P4 et P9, comme le gène *GINS complex subunit 3* (GINS3), impliqué dans l'initiation et la progression de la réplication de l'ADN. Dans cette condition, nous avons également observé l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN comme ABRAXAS1 sur le cluster P8, et la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress cellulaire, en majorité sur le cluster P8, comme DDIT3.

Nous avons enfin révélé plusieurs enrichissements dans le cluster P5 de gènes dont l'expression est en grande majorité augmentée après l'exposition des explants testiculaires des deux classes d'âges au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la réponse aux substances toxiques, aux ions métalliques, à la détoxification cellulaire, à l'absorption minérale et à l'homéostasie cellulaires de plusieurs métaux. Ainsi, l'exposition des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD avec du CBD, du $\Delta 9$ -THC ou un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD et l'exposition des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec du $\Delta 9$ -THC ou un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD entraîne l'augmentation significative de l'expression de gènes tels que *Ferritin light chain* (FTL), impliqué dans la régulation de l'homéostasie du fer. Certaines conditions ont au contraire entraîné la diminution de l'expression de ces gènes.

Dans ces deux classes d'âge pour les conditions précédemment citée, nous avons également observé une altération de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la transcription et de la traduction, ainsi que dans la régulation du trafic intracellulaire et du cytosquelette. Dans une même classe d'âge avec un même traitement, nous avons parfois observé l'augmentation significative de gènes impliqués ces processus tandis que l'expression d'autres gènes était significativement diminuée.

L'ensemble de ces observations suggèrent que l'exposition d'explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD à du CBD et/ou du Δ 9-THC altère effectivement le métabolisme cellulaire des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli, contribuant sûrement à la diminution de leurs sécrétions hormonales respectives. Les analyses prochaines de BRB-seq, distinguant les types cellulaires dont l'expression génique est modifiée, nous permettront de répondre à cette hypothèse. L'exposition d'explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec un mélange de Δ 9-THC et de CBD à 10^{-5} M semble également entraîner une altération du métabolisme cellulaire des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig, ce qui impacterait leurs capacités de sécrétions hormonales respectives. De façon cohérente avec cette hypothèse sur les cellules de Sertoli dans les deux classes d'âges, une étude a récemment observé une altération de l'organisation du cytosquelette et une inhibition de la prolifération dans des cellules de Sertoli humaines adultes après une exposition *in vitro* avec 10 μ M de CBD, corrélées avec une altération de leur viabilité (Li et al., 2022).

Nous avons vu que l'exposition d'explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec du CBD à 10^{-5} M entraîne une diminution significative de la sécrétion de testostérone dès 4 jours d'exposition longue. Nos analyses de BRB-seq ont mis en évidence que le nombre de gènes dont l'expression est significativement altérée n'est que de 3 dans cette condition après 72 heures d'expression. Il pourrait s'agir d'un signe précoce de l'altération du métabolisme cellulaire et/ou du cholestérol, visible sur la fonction endocrine seulement après au moins 4 jours d'exposition.

A l'inverse, l'exposition d'explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD avec du Δ 9-THC seul à 10^{-5} M pendant 72 heures induit une diminution de la sécrétion de testostérone mais ne semble affecter ni le métabolisme cellulaire ni le métabolisme du cholestérol. L'analyse transcriptomique par BRB-seq a révélé que seule l'expression de 4 gènes est altérée dans cette condition. Les effets transcriptomiques de ce traitement sur le métabolisme cellulaire et/ou du cholestérol, induisant la diminution de la sécrétion de testostérone, pourraient être trop subtiles et ne pas dépasser les seuils de significativité en BRB-seq.

Dans cette condition particulièrement mais également dans toutes les autres investiguées, il est possible que les effets d'une exposition au CBD et/ou au Δ 9-THC sur une

petite population cellulaire ne puissent pas être détectés par une méthode d'analyse sur testicule entier qu'apporte le BRB-seq. Pour pallier cet inconvénient, une méthode pertinente dans notre étude serait l'analyse transcriptomique des explants testiculaires exposés au CBD et/ou au $\Delta 9$ -THC cellule par cellule, grâce par exemple au single-cell RNA-seq.

Dans les deux classes d'âges, l'analyse de la densité de cellules apoptotiques et prolifératives dans le compartiment intra- et extracordonal ainsi que la densité ou la surface des cellules de Sertoli, des cellules de Leydig et des gonocytes après 14 jours d'exposition au CBD et/ou au $\Delta 9$ -THC est en cours d'investigation. Ces résultats pourraient nous permettre de répondre aux hypothèses que nous avons formulées pour une exposition de 72 heures.

b) Les données pharmacocinétiques du $\Delta 9$ -THC et du CBD dans le testicule fœtal

Les effets que nous avons décrits sur la physiologie testiculaire fœtale ont été observés après une exposition à des concentrations de $\Delta 9$ -THC et de CBD égales à 10^{-5} M, mais une incertitude demeure quant à la pertinence physiologique de ces doses. La pharmacocinétique de ces deux phytocannabinoïdes est de manière inhérente chez l'adulte, extrêmement variable selon la fréquence, la chronicité de consommation, le mode de consommation, les doses administrées, mais aussi selon l'usage (thérapeutique ou récréationnel).

De plus, peu de données sont disponibles à ce jour sur le transfert materno-fœtal du $\Delta 9$ -THC et du CBD. Une étude réalisée chez la souris a permis de mettre en évidence des concentrations de $\Delta 9$ -THC similaires entre le foie maternel et les tissus fœtaux, et une prolongation de la Cmax du $\Delta 9$ -THC dans les tissus fœtaux par rapport aux tissus maternels 2 heures après une administration orale ou intraveineuse de THC (Freudenthal et al., 1972). Les données que nous avons obtenues après l'administration d'un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD chez des souris gestantes indiquent une accumulation du $\Delta 9$ -THC et de ses métabolites, ainsi que du CBD dans le foie fœtal en comparaison avec différentes matrices biologiques maternelles (données non publiées).

Au contraire, dans la majorité des études utilisant des animaux modèles, les concentrations de $\Delta 9$ -THC et de CBD retrouvées dans le sang et les tissus fœtaux sont plus faibles que celles chez la mère (Martin et al., 1977b; Abrams et al., 1985; Bailey, 1987; Hutchings et al., 1989; Ochiai et al., 2021). Une étude réalisée chez la femme a permis de mettre en évidence que la quantité de $\Delta 9$ -THC présente dans le sang de cordon ombilical au 3^{ème} trimestre était 3 à 6 fois moins importante que celle dans le sang maternel (Blackard and Tennes, 1984). Un autre groupe a montré que chez des femmes consommatrices de cannabis pendant la grossesse ayant subi une IVG au cours de la 12^{ème} SD, la quantité de $\Delta 9$ -THC présente dans le placenta ($196 \pm 110,1$ ng/g) était plus importante que dans les tissus fœtaux ($118,5 \pm 97,9$ ng/g) (Falcon et al., 2012). Ces données ne permettent pas encore d'établir une relation quantitative précise du transfert materno-fœtal des phytocannabinoïdes chez la femme. Elles suggèrent néanmoins un transport actif et/ou une métabolisation par le placenta du $\Delta 9$ -THC.

L'expression d'enzymes de métabolisation du $\Delta 9$ -THC et du CBD, comme CYP2C19, CYP3A4 et certaines UGT est modifiée au cours de la grossesse (Ward and Varner, 2019). Les composés majoritaires auxquels est exposé le fœtus peuvent donc être très différents de ceux chez l'individu adulte. Du reste, il existe peu de données sur la capacité des métabolites du $\Delta 9$ -THC (et potentiellement ceux du CBD) formés par l'organisme maternel et/ou le placenta, à passer la barrière placentaire. La capacité de l'organisme fœtal à métaboliser ces deux phytocannabinoïdes est également très peu connue. Ainsi, si la présence de métabolites du $\Delta 9$ -THC au niveau du compartiment fœtal a été observée dans notre étude chez la souris (données non publiées) et par d'autres groupes (Freudenthal et al., 1972; Baglot et al., 2022), elle n'a pas été retrouvée chez le chien et le singe (Martin et al., 1977b; Bailey, 1987), illustrant les variabilités existantes entre les espèces. Une grande variabilité existe aussi chez l'humain. Dans une étude, la présence du 11-COOH- $\Delta 9$ -THC a été retrouvée chez tous les fœtus étudiés, avec des concentrations dépassant celles du $\Delta 9$ -THC (Blackard and Tennes, 1984) et dans une autre étude, la présence de ce métabolite a été observée dans seulement 1 fœtus sur les 10 dont la présence de $\Delta 9$ -THC avait été relevée (Falcon et al., 2012).

L'ensemble des paramètres décrits ci-dessus rend donc très ardu de prédire la nature et la dose des phytocannabinoïdes atteignant le testicule fœtal *in vivo* après une

consommation maternelle. Il est donc envisageable que le testicule fœtal humain ne soit pas exposé *in vivo* à des concentrations de 10^{-5} M de Δ 9-THC et de CBD avec lesquelles nous avons observé des effets négatifs sur la physiologie testiculaire. De plus, ce tissu pourrait être exposé aux métabolites de ces deux phytocannabinoïdes, dont certains métabolites comme le 11-OH- Δ 9-THC possèdent un effet psychoactif et seraient pharmacologiquement plus actifs que le Δ 9-THC (Christensen et al., 1971; Lemberger et al., 1972, 1973).

S'ajoutant à ces incertitudes, il a également été montré que le transfert du Δ 9-THC au fœtus est plus important au début de la grossesse (Blackard and Tennes, 1984). Ce transfert est également très variable d'un individu à l'autre, mêmes chez des jumeaux dizygotes, à exposition maternelle constante, ce qui met en évidence la variabilité inter-individuelle du placenta (et peut être des tissus fœtaux) dans le contrôle de l'exposition au Δ 9-THC (Boskovic et al., 2001). Il a été montré que certains composés du cannabis peuvent affecter l'activité et le remodelage du placenta (Fisher et al., 1987; Alves et al., 2020), sa perméabilité (Feinshtein et al., 2013) et son irrigation (El Marroun et al., 2010; Carter et al., 2016). L'exposition fœtale à différentes substances, dont peut être les phytocannabinoïdes et leurs métabolites, pourrait donc être radicalement modifiée entre les fœtus issus de mères consommatrices occasionnelles de cannabis ou de façon chronique.

Les données pharmacocinétiques chez l'homme décrivant le transfert materno-fœtal des différents phytocannabinoïdes après une consommation maternelle de cannabis manquent singulièrement. Si les études chez les animaux modèles apportent des éléments de réponse, les différences physiologiques inter-espèces existantes ne permettent pas une extrapolation des données à l'espèce humaine. Les études chez la femme enceinte sont particulièrement compliquées à mettre en place pour de nombreux facteurs : éthiques, moment des prélèvements, les différentes matrices biologiques choisies pour les dosages, réticence des femmes à déclarer une consommation de cannabis ... Des études récentes utilisant des modèles *Physiologically based pharmacokinetic* (PBPK) essayent cependant de contourner ces problèmes pour apporter des éléments de réponses dans ce domaine d'étude (Patilea-Vrana and Unadkat, 2021).

c) Mode d'action des phytocannabinoïdes dans le testicule humain fœtal

L'exposition d'explants testiculaires humains au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD entraîne des altérations de leur physiologie. A l'aide de la caractérisation de l'expression des différents composants du système des ECB dans le testicule humain fœtal, nous avons essayé d'en comprendre les mécanismes.

Aucune étude à ce jour n'a décrit l'implication physiologique du système des ECB dans le développement du testicule fœtal humain. Il a été montré chez la souris que le récepteur CB2 est impliqué dans la régulation de l'entrée en méiose dans les gonocytes (De Domenico et al., 2017a). Chez le rongeur en période post-natale, CB1 est impliqué dans la différenciation des ALC (Cacciola et al., 2008) et l'AEA a un rôle pro-apoptotique sur les cellules de Sertoli (Maccarrone et al., 2003).

L'observation des différentes perturbations qu'entraîne une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD dans notre étude peut nous permettre d'émettre des hypothèses sur l'implication du système des ECB dans le développement physiologique du testicule.

Comme il a été vu dans l'introduction de ce manuscrit, le $\Delta 9$ -THC et le CBD peuvent agir sur les récepteurs spécifiques aux cannabinoïdes, CB1 et CB2. L'analyse des données de bulk et de single-cell RNA-seq a permis de montrer une expression dynamique des différents récepteurs dans le testicule humain fœtal au cours du développement, et une expression différentielle selon le type cellulaire.

Le $\Delta 9$ -THC est un agoniste partiel des récepteurs CB1 et CB2 (Pertwee, 2008). Le CBD agit comme un modulateur allostérique négatif de CB1 (Laprairie et al., 2015; Jakowiecki et al., 2021) et potentiellement de CB2 (Soethoudt et al., 2017), ce qui peut affecter l'accessibilité du $\Delta 9$ -THC à ces récepteurs et les voies de signalisation déclenchées. Dans le testicule humain fœtal, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence de la protéine de CB2, et la protéine de CB1 n'a été détectée que dans les gonocytes, au contraire des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli qui pourtant sont affectées par une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD. L'expression de CB1 et de CB2 dans le testicule humain fœtal semble difficilement pouvoir expliquer les effets drastiques parfois observés dans notre étude,

notamment sur la sécrétion de testostérone. Il semblerait donc dans notre modèle, que les effets du CBD et le $\Delta 9$ -THC passent en partie par les récepteurs alternatifs aux cannabinoïdes.

Parmi les récepteurs alternatifs, l'analyse des données de RNA-seq sur testicule entier l'expression des récepteurs GPR18, PPAR β , PPAR γ , TRPV2 et TRPV3.

Le CBD (Nabissi et al., 2013; Qin et al., 2008; Landucci et al., 2022) et le $\Delta 9$ -THC dans une moindre mesure, activent TRPV2 (De Petrocellis et al., 2011; Landucci et al., 2022). Or, il a été montré dans le testicule adulte humain que l'activation de TRPV2 par le CBD entraîne une augmentation de l'inflammation dans le tissu (Eubler et al., 2018, 2021). Les atteintes physiologiques observés dans les tissus testiculaires exposés au CBD (et au $\Delta 9$ -THC) pourraient en partie être expliqués par un environnement pro-inflammatoire mais nos analyses des résultats de BRB-seq n'ont révélé l'augmentation de l'expression que du gène *C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8)* impliqué dans l'inflammation après une exposition des explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD à du CBD.

Les récepteurs nucléaires PPAR régulent des mécanismes cruciaux en lien avec le métabolisme énergétique, l'inflammation et la prolifération cellulaire. Le $\Delta 9$ -THC et le CBD peuvent activer PPAR γ (Christofides et al., 2021; Montaigne et al., 2021). Ce récepteur est un régulateur clé du métabolisme lipidique (Tontonoz and Spiegelman, 2008). Les effets observés du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du cholestérol pourraient ainsi passer par l'activation de ce récepteur. Il pourrait être intéressant de traiter des explants testiculaires avec un agoniste ou un antagoniste spécifique de ce récepteur, afin d'investiguer les effets induits sur la sécrétion de testostérone et l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du cholestérol.

Sur la majorité des paramètres que nous avons étudiés, il apparaît que dès lors que $\Delta 9$ -THC seul ou le CBD seul ont un effet, le mélange $\Delta 9$ -THC+CBD entraîne un effet similaire. Dans certaines conditions, le mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD entraîne un effet plus intense qu'avec les molécules seules. Il semblerait donc dans notre modèle que le CBD et le $\Delta 9$ -THC n'exercent pas l'un sur l'autre pas d'effets inhibiteurs et qu'ils puissent induire l'un sur l'autre des effets potentialisateurs/additifs selon les paramètres cellulaires étudiés.

Les effets du Δ 9-THC et du CBD observé dans notre étude pourraient également être indirects.

Le CBD est capable de réduire la métabolisation de l'AEA en inhibant l'expression de l'enzyme FAAH (Bisogno et al., 2001; de filippis et al., 2008; De Petrocellis et al., 2011; Banerjee et al., 2011a; Leweke et al., 2012) ainsi que des protéines de transport intracellulaires conduisant l'AEA à la FAAH (Deutsch, 2016). Nos résultats de BRB-seq n'ont ici pas mis en évidence d'altération significative de l'expression du gène codant pour la protéine FAAH ou pour des protéines de transport de l'AEA. D'autre part, il a été suggéré que le CBD a la capacité d'inhiber la ré-intégration de l'AEA dans la cellule, prolongeant sa signalisation sur les récepteurs membranaires, comme les TRPV (Carvalho et al., 2018a). Si l'expression de transporteurs de l'AEA ne semble pas altérée après l'analyse de nos données de BRB-seq, il n'est pas exclu que l'altération de ces transporteurs concerne leur activité. Il serait intéressant de réaliser des dosages de l'AEA dans les tissus testiculaires fœtaux et le milieu de culture après une exposition *ex vivo* au Δ 9-THC et/ou au CBD afin d'explorer cette hypothèse.

Enfin, il a été montré que les récepteurs PPAR sont capables de moduler l'activité d'enzymes de métabolisation et de récepteurs, dont les CB et les TRPV du système des ECB (Iannotti and Vitale, 2021). L'activation de PPAR γ par le Δ 9-THC et/ou le CBD pourrait altérer la quantité et la signalisation de l'AEA et du 2-AG sur les récepteurs CB et les TRPV. Là encore, des expériences de dosages et de tests de l'activité des récepteurs seraient pertinentes.

Des données sont encore manquantes pour pouvoir proposer des explications mécanistiques des effets observés après une exposition au Δ 9-THC et/ou au CBD dans notre étude. Dans le but d'expliquer ces effets, la suite du projet sera d'approfondir les hypothèses des mécanismes d'action du Δ 9-THC et du CBD que nous avons formulé. Nous avons ainsi initié des expérimentations où des explants testiculaires humains sont cultivés dans les mêmes conditions que pour lesquelles nous avons observé des altérations de la physiologie cellulaire, et exposés à des antagonistes spécifiques des récepteurs CB1 et CB2. Ces résultats nous permettraient de pouvoir déduire par quels récepteurs passent les effets du Δ 9-THC et du CBD que nous observons.

d) Effets de l'âge des échantillons testiculaires

Il a été mis en évidence dans notre étude que les explants testiculaires présentent, selon leur âge et leur temps de culture, des sensibilités variables aux différents traitements testés et que dans une même fenêtre de développement, les différents traitements peuvent induire des effets ou non selon les paramètres étudiés.

Il apparaît de nos résultats qu'une exposition de 72 heures au $\Delta 9$ -THC ou au CBD seuls des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD altère significativement plus de paramètres investigués par rapport aux explants testiculaires âgés de 10 à 12 SD, dont les effets sont en majorité entraînés par le mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD. Ces observations pourraient indiquer une sensibilité plus importante des explants testiculaires âgés de 8 à 10 SD à ces composés par rapport aux plus vieux.

L'explication la plus probable aux effets différents d'une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD selon l'âge des explants testiculaires, la période de culture et les divers traitements, est la différence d'expression à un temps donné des récepteurs aux cannabinoïdes par les différents types cellulaires. L'identification des récepteurs impliqués dans les effets observés du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD sur les explants testiculaires fœtaux humains constitue d'autant plus une perspective du projet.

L'observation de l'expression du système des ECB dans le testicule humain fœtal, et sa dérégulation par son exposition à deux phytocannabinoïdes, qui constituent des ligands exogènes de ce système, nous permet de suggérer que le système des ECB est impliqué dans le développement physiologique du testicule humain. Cependant, des données mécanistiques en particulier sur l'implication des différents récepteurs du système, sont encore manquantes.

e) Conséquences potentielles des perturbations de la physiologie testiculaire observées

L'exposition d'explants testiculaires humains âgés de 8 à 12 SD à du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD conduit à des altérations de la sécrétion de plusieurs hormones, de la viabilité et de la prolifération cellulaire. Or, cette période du développement correspond à une phase critique de l'établissement des fonctions testiculaires, particulièrement sensible aux expositions environnementales (Welsh et al., 2008; Scott et al., 2009; van den Driesche et al., 2017) Transposé à la physiologie *in vivo*, les effets observés dans notre étude peuvent entraîner des conséquences drastiques sur l'établissement de la fonction reproductive et donc sur la fertilité de l'individu à l'âge adulte. Si ces résultats sont confirmés dans d'autres études, le $\Delta 9$ -THC et le CBD constitueraient alors, comme il a été démontré pour les phtalates, des pesticides et des analgésiques parmi d'autres (Sweeney et al., 2015; Bonde et al., 2016b; Kilcoyne and Mitchell, 2019b), des facteurs environnementaux dont l'exposition au cours de la grossesse a des conséquences négatives sur la santé reproductive de l'individu.

L'altération de la viabilité cellulaire observée dans les cordons séminifères après une exposition aux différents traitements laisse supposer une atteinte du nombre des cellules de Sertoli et/ou des gonocytes lors d'une exposition plus longue. Or, il a été montré que le nombre de cellules de Sertoli dans le testicule à la fin du développement détermine le nombre de cellules germinales qu'elles supporteront à l'âge adulte, et donc la capacité de production de spermatozoïdes (Orth, 1982; Sharpe et al., 2003). De plus, après d'intenses vagues de prolifération, les gonocytes, dont le nombre augmente de façon continue jusqu'à la naissance, se différencient progressivement en pré-spermatogonies puis en spermatogonies, qui constituent la réserve de cellules germinales indifférenciées. Une diminution du nombre de cellules de Sertoli et/ou des cellules germinales au cours de la vie fœtale peut donc conduire à une altération de la spermatogenèse, entraînant une sous-fertilité, voir une infertilité de l'individu à partir de la puberté.

La testostérone joue un rôle majeur dans la masculinisation du tractus uro-génital (Hannema and Hughes, 2007) ainsi que dans la descente testiculaire (pour revue : Hutson et al., 1997; Klonisch et al., 2004; Hughes and Acerini, 2008; Mamoulakis et al., 2015; Hutson et al., 2016). De plus l'AMH est également essentiel à la masculinisation du tractus uro-génital (Hannema and Hughes, 2007). Un défaut de la sécrétion de ces hormones, comme il est observé dans notre étude après une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD d'explants testiculaires humains, peut entraîner des défauts plus ou moins sévères de la différenciation

du tractus uro-génital mâle (Scott et al., 2009; Auchus and Miller, 2012; Flück and Pandey, 2014) pouvant conduire à deux malformations congénitales, la cryptorchidie (Gurney et al., 2017) et/ou l'hypospadias (Cunha et al., 2015).

La consommation de cannabis étant lié avec le développement de TGCT chez l'homme adulte (Gurney et al., 2015a; Ghasemiesfe et al., 2019a; Song et al., 2020a), nous avons investigué la capacité du $\Delta 9$ -THC et du CBD à altérer la différenciation des gonocytes, entraînant l'apparition de lésions pré-cancéreuses, les GCNIS, précurseurs des TGCT (pour revue : Rajpert-De Meyts and Hoei-Hansen, 2007; Baroni et al., 2019). Des études épidémiologiques ont montré un lien entre une dérégulation de l'environnement endocrine maternel au cours de la grossesse et le développement de TGCT chez les individus issus de ces grossesses (Sharpe and Skakkebaek, 1993b; Toppari et al., 1996; Hardell et al., 2006; Holl et al., 2009). Découlant de ces observations, une hypothèse communément admise est que l'apparition des GCNIS dans le testicule fœtal est en grande partie reliée à une altération du micro-environnement des gonocytes au cours du développement (Rørth et al., 2000; Rajpert-De Meyts, 2006; Kristensen et al., 2008). Ce micro-environnement est en outre créé par les sécrétions des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig et joue un rôle primordial dans la régulation de la prolifération, la survie et la différenciation des gonocytes. Or nous avons vu que certaines de ces sécrétions sont altérées dans notre étude, nous poussant à investiguer la physiologie cellulaire des gonocytes.

Nos résultats de BRB-seq témoignent de l'effet négatif sur le métabolisme cellulaire du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD dans les explants testiculaires mais il n'est pas exclu que l'expression de gènes fréquemment associés avec la transformation cancéreuse puisse être en parallèle induite dans les gonocytes après un certain temps. L'étude d'expression de ces gènes serait particulièrement intéressante après des temps de culture plus longs.

Il est également important de garder à l'esprit que plusieurs pathologies reproductives provenant d'altérations du développement testiculaire au cours de la vie fœtale décrites ci-dessus comme la cryptorchidie, l'hypospadias et la réduction de la fertilité, constituent des facteurs de risque de l'apparition de TGCT chez l'adulte (pour revue : Rajpert-De Meyts, 2006; Looijenga et al., 2011, 2014; McIver et al., 2013; Fukawa and Kanayama, 2018; Baroni

et al., 2019). De même, la cryptorchidie augmente le risque d'apparition des TGCT, de l'hypospadias et de l'infertilité (Virtanen et al., 2007; Schnack et al., 2010; Hutson et al., 2013; Ferguson and Agoulnik, 2013; Cobellis et al., 2014; Fawzy et al., 2015; Hadziselimovic, 2017). Enfin, l'hypospadias est une pathologie liée avec d'autres défauts comme la cryptorchidie et des anomalies de la physiologie testiculaire (Bouty et al., 2015; Toppari et al., 2010). Il n'est donc pas exclu que l'exposition au cannabis pendant le développement puisse entraîner une de ces pathologies, constituant un facteur de risque pour le développement des autres.

Pour appuyer cette hypothèse, il serait particulièrement intéressant de mettre en place des cohortes mère-enfant de grande ampleur dans plusieurs pays sur une période d'observation très longue (30 à 40 ans) pour étudier le lien entre la consommation de cannabis pendant la gestation et le développement de pathologies reproductives chez les individus dès leur naissance et jusqu'à l'âge adulte.

De façon complémentaire, nous avons mis en place une étude *in vivo* sur la souris où des femelles gestantes ont été traitées avec un mélange de Δ 9-THC et de CBD de E6.5 à E15.5 afin d'observer les effets d'une exposition gestationnelle de ces molécules sur la santé reproductive des individus issus de la descendance. Les testicules des individus issus de cette gestation ont été prélevés à différents âges, du fœtus à l'adulte, et plusieurs paramètres physiologiques testiculaires sont en cours d'étude.

3. Perspectives méthodologiques

a) Les prélèvements testiculaires fœtaux

Une première limite de ce modèle vient de l'origine des prélèvements. En effet, les testicules fœtaux recueillis provenant de dons de femmes ayant eu recours à une interruption volontaire de grossesse, nous n'avons pas accès aux informations concernant les différentes expositions environnementales des femmes et à leur style de vie, dont la prise de substances pouvant avoir des effets sur le développement testiculaire. A l'Hôpital Sud de Rennes, si la question de la consommation d'alcool, de tabac et de cannabis est

posée, des expositions passives ne peuvent pas être exclues et les réponses des femmes dépendent de leur volonté de partager cette information.

Une autre limite de ce modèle est la rareté du matériel biologique. En effet, basé sur le consentement volontaire des femmes et extrêmement dépendant de la communication du personnel soignant, nous n'avons que très peu d'influence sur la récupération d'échantillons fœtaux. La quantité de testicules collectés est également limitée par le sexe du fœtus (environ la moitié des prélèvements sont des ovaires) et la qualité du tissu récolté. La rareté du matériel biologique a également été amplifiée lors de l'épidémie de Covid-19 jusqu'à un arrêt total de la récupération des prélèvements pendant trois mois (de Mars à Mai 2020).

Une autre limite soulevée par l'utilisation de ce modèle de culture organotypique est la taille des testicules disséqués. En effet, le protocole expérimental prévoit beaucoup de conditions expérimentales pour chaque prélèvement testiculaire, initialement 15, donc une nécessité de 45 ou 60 explants testiculaires d'1 mm³ suivant les analyses prévues. Si les testicules prélevés de fœtus âgés (à partir de 10-11 SD environ), permettent d'obtenir le nombre d'explants requis pour tester toutes les conditions expérimentales, ce n'était pas le cas pour le fœtus les plus jeunes, nous obligeant à intégrer plus d'individus.

La date limite pour avoir recours à une IVG en France ayant récemment été repoussée depuis la loi du 2 mars 2022, nous avons maintenant accès à des prélèvements fœtaux âgés de 12 à 14 SD, ce qui correspond au début du 2^{ème} trimestre. L'observation des effets d'une exposition à du Δ^9 -THC et/ou du CBD serait intéressante dans cette classe d'âge puisque la physiologie testiculaire évolue et un certain nombre de processus, comme l'activation de l'axe HHT, sont mis en place à partir de cette période.

b) La culture organotypique

Cette méthode de culture est utilisée depuis les années 1950 et a été montrée comme efficace pour modéliser le développement testiculaire dans plusieurs espèces (Rouiller-Fabre et al., 2003) dont l'homme (Lambrot et al., 2006c; Albalushi et al., 2019).

Nous avons vu dans notre étude qu'un certain nombre d'effets potentiels des phytocannabinoïdes pourraient ne pas être observés du fait d'un temps de culture trop court. De plus, il est possible que certains effets pourraient n'être que transitoires. Dans ce contexte, il a été montré dans des études que l'exposition chronique au $\Delta 9$ -THC chez le rongeur adulte entraîne des effets néfastes temporaires sur l'axe HHT, qui sont ensuite revenues à des valeurs normales au cours de la période de traitement, suggérant l'installation d'une tolérance des effets induits par l'exposition à ce phytocannabinoïde (Mandal and Das, 2010; Rosenkrantz and Esber, 1980). Pour ces raisons, il serait d'un intérêt particulier de pouvoir observer les effets à plus long terme d'une exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD des explants testiculaires humains fœtaux. Notre équipe optimise actuellement un protocole nous permettant de maintenir les explants testiculaires en culture pendant plus d'un mois.

Néanmoins, l'utilisation de la culture organotypique possède des limites. Comme discuté dans notre étude sur l'impact du $\Delta 9$ -THC et du CBD sur des explants testiculaires humains adulte, l'ajout des molécules d'intérêt dans le milieu de culture entraîne une distribution de ces dernières dans le tissu testiculaire potentiellement très différente de la réalité (Sharma et al., 2022). Le développement de la méthode de microfluidique sur ces tissus constituerait une avancée certaine dans la modélisation de la physiologie *in vivo*.

Il a été montré que les résultats obtenus avec ce système *ex vivo* peuvent être différents de la réalité *in vivo* (Hallmark et al., 2007). S'il existe un certain nombre de modèles de culture du testicule humain fœtal alternatifs à la culture organotypique d'explants testiculaires (Gassei and Schlatt, 2007; Tharmalingam et al., 2018), peu d'entre eux préservent l'architecture tissulaire et les interactions cellulaires du testicule tout en permettant d'étudier les potentielles perturbations endocrines et paracrines et les mécanismes de carcinogenèse des cellules germinales. Pour pallier cette observation, et permettre également d'augmenter le temps de culture potentiellement trop court pour observer certains effets dans notre étude, il serait intéressant de recourir à un système de xénogreffe. Il s'agirait ainsi d'introduire des explants testiculaires sur des souris hôtes castrées et traitées avec de l'hCG pour reproduire l'environnement *in utero*, comme il a été décrit dans notre équipe (Ben Maamar et al., 2017) et par d'autres (Mitchell et al., 2010, 2012, 2013; Heger et al., 2012; van den Driesche et al., 2015; Eladak et al., 2018). Ce système

a ainsi montré le maintien des greffons au-delà de 6 semaines, avec une différenciation des gonocytes, des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig similaire à celle observée *in vivo*. Si ce système ne permet pas de résoudre toutes nos interrogations méthodologiques, comme le passage materno-fœtal du $\Delta 9$ -THC et du CBD ou leur potentielle métabolisation par les tissus fœtaux, il permettrait de suivre les explants sur une plus longue période, pouvant aller jusqu'au milieu du 2^{ème} trimestre.

c) Les traitements

Il a été montré dans plusieurs études que la prévalence de la consommation de cannabis est moins importante chez les femmes enceintes plus la grossesse avance, suggérant un arrêt de la consommation progressif (Moore et al., 2010; Volkow et al., 2019). L'une de ces études a même rapporté une diminution significative de la consommation de cannabis entre le 1^{er} et le 2^{ème} trimestre (Moore et al., 2010). Il serait donc pertinent d'étudier si les altérations de la physiologie testiculaire fœtale après une exposition *ex vivo* à du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD observées dans notre modèle sont réversibles. En utilisant notre modèle de culture organotypique, il s'agirait de traiter les explants avec du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD à une concentration et pendant une période avec lesquelles nous avons observé des effets néfastes sur la physiologie testiculaire. Les explants testiculaires seraient ensuite cultivés sans phytocannabinoïdes et leur physiologie testiculaire serait évaluée.

Une grande incertitude demeure quant aux doses et aux métabolites qui arrivent dans le compartiment fœtal après le passage par le placenta.

Une étude chez le singe a suggéré une absence du métabolisme du $\Delta 9$ -THC par le placenta (Bailey, 1987). Chez l'homme, il a été mis en évidence que le placenta du 1^{er} trimestre de grossesse exprime plusieurs enzymes CYP450 impliquées dans le métabolisme du $\Delta 9$ -THC et du CBD telles que CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 et CYP1A1, qui représente l'enzyme CYP450 du placenta humain du 1^{er} trimestre (pour revue : Myllynen et al., 2009). En revanche, seule l'activité de CYP1A1 a été établie. Il serait donc judicieux d'étudier l'activité des enzymes du métabolisme du $\Delta 9$ -THC et du CBD citées plus haut dans le placenta chez l'homme, afin d'évaluer la capacité de ce tissu à modifier les doses et les

phytocannabinoïdes arrivant dans le compartiment fœtal. Les prélèvements embryonnaires humains étant reçus avec des fragments placentaires, il serait possible de mettre en place des analyses dans notre laboratoire.

L'étude précédemment citée chez le singe a également suggéré une absence du métabolisme du $\Delta 9$ -THC par les tissus fœtaux (Bailey, 1987). Chez l'humain, les différentes études transcriptomiques et protéiques ont montré que le foie fœtal du 1^{er} trimestre exprime faiblement plusieurs enzymes impliquées au métabolisme du $\Delta 9$ -THC et du CBD : CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, et CYP3A4 (pour revue : Myllynen et al., 2009; Sadler et al., 2016). De même, le placenta du 2^{ème} trimestre exprime CYP1A1 et CYP2C9 (Robinson et al., 2020). En revanche, le foie fœtal humain n'exprime pas d'UGT (Moscovitz and Aleksunes, 2013), qui catalysent la glucuronidation des métabolites du $\Delta 9$ -THC avant leur excrétion (Wall et al., 1983).

D'autres CYP450, qui ne sont pas décrites comme participant au métabolisme du $\Delta 9$ -THC et du CBD chez l'adulte, sont exprimées dans le placenta et le foie fœtal (Robinson et al., 2020). Ainsi, le foie fœtal exprime l'enzyme *cytochrome P450, family 3, subfamily A, member 5* (CYP3A5) (Hakkola et al., 2001; Vyhliđal et al., 2015) et l'enzyme *cytochrome P450, family 3, subfamily A, member 7* (CYP3A7), qui est l'enzyme CYP450 majoritaire dans ce tissu (plus de 50% des CYP450 totales) (Li and Lampe, 2019). Le placenta exprime également CYP3A7 (Schuetz et al., 1993) ainsi que l'enzyme *cytochrome P450, family 2, subfamily E, member 1* (CYP2E1) (Hakkola et al., 1996; Rasheed et al., 1997). De plus, il a été montré que le placenta exprime des enzymes UGT (Mohammed et al., 2020).

Il serait donc intéressant d'analyser la capacité fonctionnelle de ces enzymes à dégrader le $\Delta 9$ -THC et le CBD. La possible dégradation du $\Delta 9$ -THC et du CBD par ces différentes enzymes placentaires ou hépatiques pourraient modifier d'autant plus les doses et les métabolites qui arrivent au testicule.

Chez l'adulte, des tissus extra-hépatiques possèdent les enzymes CYP450 capables de métaboliser le $\Delta 9$ -THC et le CBD comme le petit intestin, le poumon et le cerveau (Greene and Saunders, 1974; Widman et al., 1974; Watanabe et al., 1988; Krishna and Klotz, 1994; Mazur et al., 2009; Kumar et al., 2022). Si le foie est l'organe principal de détoxification chez le fœtus, Il serait également intéressant d'établir si d'autres organes fœtaux sont capables

de métaboliser le Δ 9-THC et le CBD. A noter, notre analyse des données de RNA-seq indique que le testicule fœtal humain entre 7 et 17 SD n'exprime pas les différentes enzymes CYP450 et UGT, qui métabolisent le Δ 9-THC et le CBD.

Pour compléter les données concernant les capacités de métabolisation du Δ 9-THC et du CBD par le placenta et les tissus fœtaux, il serait intéressant de mettre en place des cultures microfluidique multi-organes (Ronaldson-Bouchard and Vunjak-Novakovic, 2018; Wu et al., 2020; Picollet-D'hahan et al., 2021). Dans ces structures, le milieu de culture contenant du Δ 9-THC et du CBD passerait par exemple par un fragment de placenta puis un fragment de foie fœtal, avant d'atteindre les explants testiculaires fœtaux. Le dosage du Δ 9-THC et du CBD et de leurs métabolites arrivant aux tissus testiculaires nous permettrait d'obtenir des estimations plus justes de l'exposition du testicule fœtal aux différents phytocannabinoïdes.

d) Evaluation de la viabilité cellulaire

En complément au développement de doubles marquages immunologiques afin de déterminer le ou les type(s) cellulaire(s) en prolifération ou en apoptose, notre équipe travaille actuellement sur un protocole permettant d'utiliser la cytométrie en flux sur les explants testiculaires humains. Utilisé dans notre laboratoire pour l'étude de l'ovaire fœtal humain (Lecante et al., 2022), son utilisation permettrait de réduire considérablement le temps actuellement nécessaire aux comptages cellulaires « manuels » des cellules en prolifération, en apoptose et selon leur type cellulaire.

CHAPITRE III. EFFETS D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE *IN VIVO* AU Δ 9-THC ET AU CBD SUR LA PHYSIOLOGIE TESTICULAIRE EMBRYONNAIRE CHEZ LA SOURIS

Les études disponibles chez les modèles animaux suggèrent qu'une exposition maternelle à des phytocannabinoïdes pendant la gestation peut avoir des effets néfastes sur la santé reproductive des individus mâles, dont des altérations de l'axe HHT et des fonctions testiculaires (pour revue : Brown and Dobs, 2002; Park et al., 2004; S. S. du Plessis et al., 2015b; Hsiao and Clavijo, 2018; Rajanahally et al., 2019; Payne et al., 2019; Belladelli et al., 2021; Fonseca and Rebelo, 2021b; Maccarrone et al., 2021; Ryan et al., 2021; Srinivasan et al., 2021; Alghobary and Mostafa, 2022). Cependant, les mécanismes d'action des phytocannabinoïdes sur le développement des tissus impliqués dans la fonction reproductive sont encore très peu connus. De façon complémentaire à notre étude sur le testicule fœtal humain, nous avons conduit une étude *in vivo* chez la souris.

La présence du système des ECB au cours de la gestation chez la mère et le fœtus est très peu décrite dans les données disponibles de la littérature au cours du développement. Nous avons évalué la présence de quatre ligands endogènes du système des ECB à E13.5 et E15.5 dans plusieurs matrices biologiques maternelles et embryonnaires et nous leur avons suggéré des rôles physiologiques. Nous avons également investigué *in vivo* l'impact d'une exposition maternelle au cours du développement à un mélange de CBD et de Δ 9-THC (noté « THC » dans cette partie) sur le testicule embryonnaire. Ce traitement a été choisi afin de refléter une exposition humaine aux deux composants principaux du cannabis lors d'une consommation thérapeutique. Le passage du CBD et du THC à travers la barrière placentaire est très peu caractérisé dans la littérature. Ce manque de données complique l'estimation des quantités de phytocannabinoïdes capables d'atteindre le fœtus après une exposition gestationnelle. Nous avons donc analysé le passage materno-embryonnaire du THC et du CBD de la mère au fœtus, en passant par le placenta. De façon similaire à nos études sur le testicule humain fœtal et adulte, nous avons ensuite investigué la capacité du CBD et du THC à perturber la différenciation des cellules germinales fœtales.

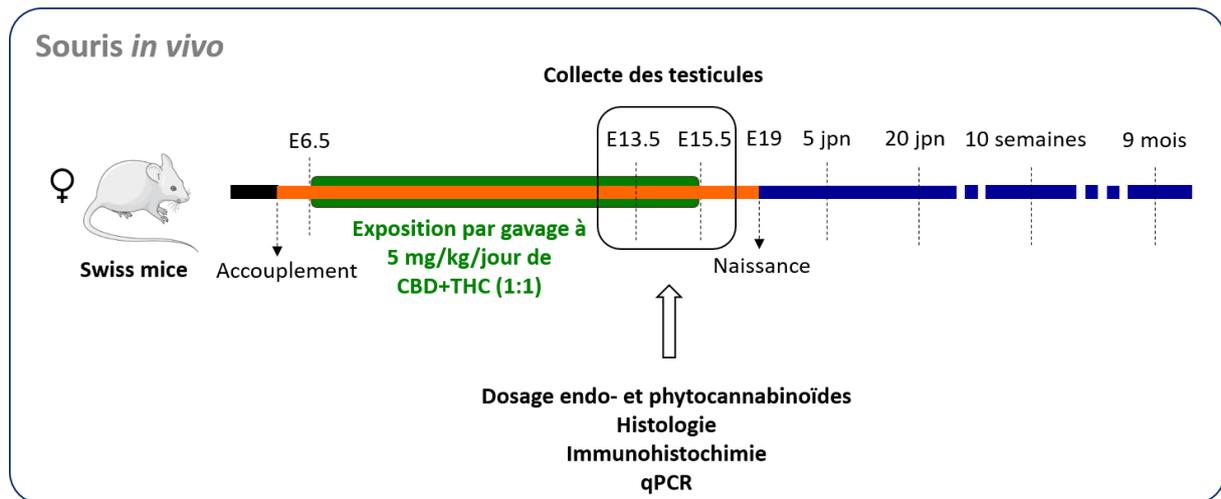


Figure 34 : Procédures expérimentales relatives au modèle souris *in vivo*.

Des souris femelles ont été exposées à 5mg/kg/jour d'un mélange équimolaire de CBD et de Δ^9 -THC (CBD+ Δ^9 -THC 1 :1) du jour embryonnaire (E) 6.5 à E15.5 par gavage. Les testicules embryonnaires ont été collectés à E13.5 et à E15.5 et analysés. Les effets d'une exposition gestationnelle à ce traitement à 5 jour post-natal (jpn), 20 jpn, 10 semaines et 9 mois, font l'objet d'une autre étude dans l'équipe.

Nous avons analysé les impacts d'une exposition gestationnelle à un mélange de CBD et de THC sur la prolifération et la différenciation des gonocytes à deux âges embryonnaires, à E13.5 où les gonocytes sont prolifératifs et à E15.5, où ils sont quiescents. L'analyse d'autres paramètres testiculaires et centraux sur ces individus est en cours à l'heure où est rédigé ce manuscrit.

De plus, les effets de cette exposition gestationnelle murine sur la fonction reproductive à plusieurs âges après la naissance sont en cours d'investigation dans l'équipe.

A) Matériel et méthodes

Le protocole expérimental utilisé dans cette étude est illustré en **Figure 34**.

1. Les molécules

Le CBD (Axon Medchem, Pays-Bas) a été dilué dans une solution de *Dimethylsulfoxyde* (DMSO) et le THC (Sigma Aldrich, n° CAS. 1972-08-3, Etats-Unis) dans une solution d'éthanol (ETOH). La même quantité d'un mélange de DMSO et d'ETOH a été utilisé comme condition contrôle.

2. L'exposition des animaux et déclaration éthique

Les procédures concernant les animaux ont été réalisées conformément aux directives relatives à l'utilisation d'animaux de laboratoire dans la recherche, définies par le comité d'éthique et approuvées par le ministère français de la recherche. Les manipulations animales ont été réalisées par Aurore Gely-Pernot et Pierre Yves Kernarec, qualifiés pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. Des souris femelles de la souche Swiss non consanguines âgées de 4 mois ont été utilisées. Après accouplement avec des mâles de la même souche, le jour de la détection du bouchon vaginal est noté E0.5.

Un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD (à un ratio égal à 1:1) à une dose de 5 mg/kg dilué dans un mélange de DMSO et d'ETOH, a été administré quotidiennement par gavage tous les matins, y compris le matin de l'euthanasie. Plusieurs études ayant montré une toxicité foétale du cannabis et du $\Delta 9$ -THC sur le développement embryonnaire précoce chez le rongeur et le singe (Persaud and Ellington, 1967, 1968; Abel et al., 1980; Asch and Smith, 1986), nous avons traité les souris gestantes à partir de E6.5 jusqu'à E13.5 ou E15.5. 4 heures avant le sacrifice, 50 mg/kg de *Bromodeoxyuridine* (BrDU) ont été administrés par injection intrapéritonéale. Les souris ont été euthanasiées par l'administration intrapéritonéale d'un mélange de xylazine et de kétamine, et disséquées. Les expériences ont été conduites sur au moins 5 souris gestantes dans chaque groupe. Les données des petits mâles issus de la même portée sont regroupées en un réplicat biologique pour chaque paramètre.

3. Dosage des endo- et des phytocannabinoïdes par chromatographie en phase liquide haut performance

Les sérums maternels, les foies maternels, les placentas et les foies embryonnaires ont été collectés à E13.5 et E15.5, flash-congelés et conservés à -80°C avant analyse. Dans ces matrices biologiques, le dosage de l'AEA, du 2-AG, de l'OEA, du PEA, ainsi que du CBD, du $\Delta 9$ -THC et de ses deux métabolites principaux, le 11-OH- $\Delta 9$ -THC (noté « TOH » ici) et le 11-COOH- $\Delta 9$ -THC (noté « TCOOH » ici), a été réalisé par HPLC comme il a été décrit précédemment (Lourenco et al., 2011; Gatta-Cherifi et al., 2012; Kearney-Ramos et al., 2022). Brièvement, les tissus et le sérum ont été homogénéisés et des extractions liquide-liquide ont été réalisées avec du chloroforme/méthanol/Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (2:1:1, vol/vol), contenant des standards internes deutérés (AEA-d4, PEA-d4, OEA-d4, 2-AG-d5, THC-d3, TOH-d3, TCOOH-d3 et CBD-d3). Une centrifugation à 10 000 g pendant 2 minutes a permis de séparer les phases. La phase organique contenant les lipides a été concentrée sur un évaporateur à flux de N_2 tandis que la phase aqueuse contenant les protéines a été traitée avec de l'acide trichloracétique (TCA) afin de précipiter les protéines. Les quantités de protéines ont été déterminées par la méthode de Lowry, en utilisant le test de Pierce sur les protéines BCA (ThermoScientific, CA) et l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard.

L'extrait lipidique sec a été purifié par extraction en phase solide (EPS) sur des cartouches C18 de 100 mg utilisant du cyclohexane/acétate d'éthyle (1:1, vol/vol) pour l'élution et concentré, avant d'être analysé par spectrométrie de masse. Les analyses spectrales de masse des endo- et des phytocannabinoïdes ont été réalisées sur un appareil TSQ Quantum Access triple quadripôle (Thermo-Finnigan), équipé d'une source APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique) et fonctionnant en mode ions positifs. L'instrument triple quadripôle TSQ Quantum Access a été utilisé conjointement avec un Surveyor LC Pump Plus (colonne Supelco C18 Discovery Analytical) et un échantillonneur automatique refroidi.

Pour la quantification, le spectromètre de masse a fonctionné en mode de surveillance de réaction sélectionnée (SRM) et la méthode de dilution isotopique (utilisant des analogues deutérés de chaque composé analysé) a été utilisée pour obtenir une quantification précise à l'aide d'une courbe d'étalonnage adéquate. Les quantités d'AEA, de PEA, d'OEA, de 2-AG, de THC, de TOH, de TCOOH et de CBD ont été exprimées en pmol par mg de protéines ou en pmol par ml de sérum sanguin.

4. Analyses histologiques et immunohistochimiques

Des testicules embryonnaires ont été collectés à E13.5 et E15.5, fixés en liquide de Bouin, et inclus en paraffine. Les blocs de paraffine ont ensuite été coupés en sections d'une épaisseur de 5 µm grâce à un microtome Shandom finesse. La morphologie testiculaire a été étudiée par une coloration des sections à l'hématoxyline et à l'éosine et observée avec un microscope à fond clair (Zeiss).

Des testicules embryonnaires ont été collectés à E13.5 et E15.5, fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% (w/v), et inclus en paraffine. Les blocs de paraffine ont été coupés en sections d'une épaisseur de 5 µm grâce à un microtome Shandom finesse. Le nombre et la prolifération des gonocytes ont été investigués par immunofluorescence. Les sections ont été déparaffinées, réhydratées et placées dans un tampon de démasquage (citrate) au bain-marie à 80°C. A E13.5 et E15.5, les sections ont été incubées sur la nuit à 4°C avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre DDX4, qui est un marqueur des gonocytes, à une dilution de 1:500 (Abcam, ref. Ab13850) et avec un anticorps primaire de souris dirigé

contre le BrDU, qui est un marqueur de la réplication de l'ADN (phase S du cycle cellulaire) à une dilution de 1:50 (DAKO, ref. M0744). Le lendemain, les sections ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les épitopes de lapin, couplé avec un fluorochrome vert (488), et un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les épitopes de souris, couplé avec un fluorochrome rouge (594) à une dilution de 1:500. A E15.5, les sections ont également été incubées sur la nuit à 4°C avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre DDX4 (Abcam, ref. Ab13850) et avec un anticorps primaire de souris dirigé contre *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) qui est un marqueur de la phase G1/S du cycle cellulaire à une dilution de 1:500. Le lendemain, les sections ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les épitopes de lapin, couplé avec un fluorochrome rouge (594) et un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les épitopes de souris, couplé avec un fluorochrome vert (488). Toutes les sections ont été contre-colorées avec du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), montées et conservés à 4°C avant l'observation des lames avec un microscope à fluorescence (Zeiss).

Pour quantifier les gonocytes (cellules DDX4 positives) et les gonocytes en prolifération (cellules doubles positives pour DDX4 et BrDU ou cellules doubles positives pour DDX4 et PCNA), des comptages manuels ont été effectués dans les cordons séminifères d'au moins 10 différentes sections par individu. Le nombre de gonocytes en prolifération a ensuite été rapporté sur le nombre de gonocytes total, donnant un pourcentage du nombre de gonocytes en prolifération.

5. Extraction de l'ARN et qPCR

L'effet du traitement sur l'expression de gènes spécifiques a été étudié par qPCR. L'ARN total a été extrait de testicules entiers âgés de E13.5 et E15.5 à l'aide du mini kit RNeasy plus selon les instructions du fabricant (Qiagen). La quantité d'ARN dans chaque échantillon a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop D-1000 (Thermo Scientific). Une reverse-transcription a été réalisée avec 500 µg d'ARN en utilisant le kit iScript cDNA Synthesis selon le protocole fourni par le fabricant (Biorat). L'expression de

POU5F1, de *Nanos homolog 3* (NANOS3), de *Cyclin dependent kinase inhibitor 1B* (CDKN1B, anciennement trouvé sous le nom de p27 ou p27^{Kip1} dans la littérature) et de *Cyclin D3* (CCND3) a été investiguée. Les séquences d'amorces utilisées pour la qPCR sont indiquées en **Table 8**. Les qPCR ont été réalisées à l'aide du supermix iTaq Universal SYBR Green conformément au protocole fourni par le fabricant (Biorad) sur un appareil CFX385 Touch Real-Time PCR Detection System de Biorad. Les ARN des gènes Ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (RPLP0) et de *Actin beta* (ACTB) ont été utilisés comme contrôles internes pour la normalisation. Le niveau d'expression de chaque gène est donné après normalisation par les gènes références et la condition contrôle. Les résultats ont été analysés avec le logiciel BioRad CFX Manager 3.1.

6. Analyses statistiques

Pour comparer 2 groupes statistiques, un test de Mann-Whitney a été utilisé. Pour comparer plus de 2 groupes statistiques, un test de Friedman (données appariées) ou de Kruskal-Wallis (données non appariées) suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn a été utilisé. Le seuil de significativité a été fixé à 0.05. Les données sont exprimées selon : moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été conduites sur le logiciel GraphPad Prism 6.

B) Résultats

Effets d'une exposition gestationnelle à du CBD et du THC à E6.5 à 13.5 ou de E6.5 à E15.5.

Des souris gestantes ont été exposées à un mélange équimolaire de CBD et de THC par gavage de E6.5 à E13.5 ou E15.5 à une dose de 5 mg/kg/jour. Ce traitement a été choisi afin de refléter une exposition thérapeutique au CBD et au THC chez l'homme. En effet, le Sativex[®] est un traitement utilisé dans le soulagement de la spasticité et des douleurs neuropathiques associées avec la sclérose en plaque, qui contient un mélange CBD et de THC (à un ratio égal à 1,08). La dose employée ici correspond à la posologie indiquée pour la prise

	Parameters	Control	CBD/THC
	Litter size (n)	14,917 ± 1,076	15,20 ± 0,538
E13.5	Maternal gain weight (g)	17,79 ± 2,39	12,68 ± 2,52
	Embryonic weight (g)	0,467 ± 0,027	0,470 ± 0,030
E15.5	Maternal gain weight (g)	9,66 ± 1,538	7,058 ± 1,655
	Embryonic weight (g)	0,154 ± 0,007	0,150 ± 0,012

Figure 1: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E13.5 or E15.5 does not affect litter parameters.

Number of pups per litter (litter size), maternal weight gain from E0.5 to E13.5 or E15.5 and embryonic weight after maternal exposure to 5 mg/kg/day of a mixture of CBD and THC (ratio 1:1) (CBD/THC, n=6 for E13.5 and E15.5) or control (n=6 for E13.5 and n=5 for E15.5). Data are presented as mean +/- SEM. No significant difference ($p < 0.05$) between the groups are highlighted by Mann-Whitney test.

d'Epidiolex[®], un traitement contenant du CBD indiqué dans le traitement des crises d'épilepsie associées au syndrome de Lennox-Gastaut et au syndrome de Dravet chez les enfants de 2 ans et plus, ne répondant pas aux traitements conventionnels (Sekar and Pack, 2019).

L'exposition à des phytocannabinoïdes ayant été décrite comme pouvant avoir des effets foeto-toxiques, nous avons investigué l'effet d'une exposition de souris gestantes à 5 mg/kg d'un mélange de CBD et THC par gavage à partir de E6.5 jusqu'à E13.5 ou E15.5. La taille de la portée, le gain de poids maternel ou et le poids embryonnaire à E13.5 et E15.5 ne sont significativement pas significativement modifiés, suggérant l'absence significative de mortalité foetale dans notre modèle (**Figure 1**).

Quantités d'endocannabinoïdes dans le sérum et le foie maternel, le placenta et le foie embryonnaire à E13.5 et E15.5.

Afin de décrire la présence des ligands du système des ECB dans notre modèle, l'AEA, le 2-AG, l'OEA et le PEA ont été dosés par HPLC dans le sérum maternel, le foie maternel, le placenta et le foie embryonnaire à E13.5 et E15.5 après une exposition maternelle aux solvants du CBD et du THC (un mélange de DMSO et d'ETOH) qui correspond à la condition contrôle, de E6.5 à E13.5 ou E15.5.

Les quatre ECB ont tous été retrouvés dans les matrices biologiques étudiées (**Figure 2**). Le 2-AG est l'ECB dont les plus fortes quantités ont été observées. On le retrouve à E13.5 et E15.5 dans le sérum maternel (1.01 +/- 0.204 et 1.20 +/- 0.17 pmol/mg de protéines respectivement), le foie maternel (144.97 +/- 41.828 et 28,63 +/- 4.80 pmol/mg de protéines respectivement), le placenta (165.34 +/- 35.01 et 501.87 +/- 388.5 pmol/mg de protéines respectivement) et le foie embryonnaire (17.06 +/- 4.32 et 40.044 +/- 12,76 pmol/mg de protéines respectivement). L'AEA est l'ECB dont les niveaux sont les plus faibles. On le retrouve à E13.5 et E15.5 dans le sérum maternel (0.034 +/- 0.002 et 0.098 +/- 0.021 pmol/mg de protéines respectivement), le foie maternel (0.734 +/- 0.13 et 0.29 +/- 0.04 pmol/mg de protéines respectivement), le placenta (0.928 +/- 0.116 et 1.569 +/- 0.363 pmol/mg de protéines respectivement) et le foie embryonnaire (0.174 +/- 0.031 et 0.611 +/- 0,129 pmol/mg de protéines respectivement). L'OEA a également été détecté à E13.5 et

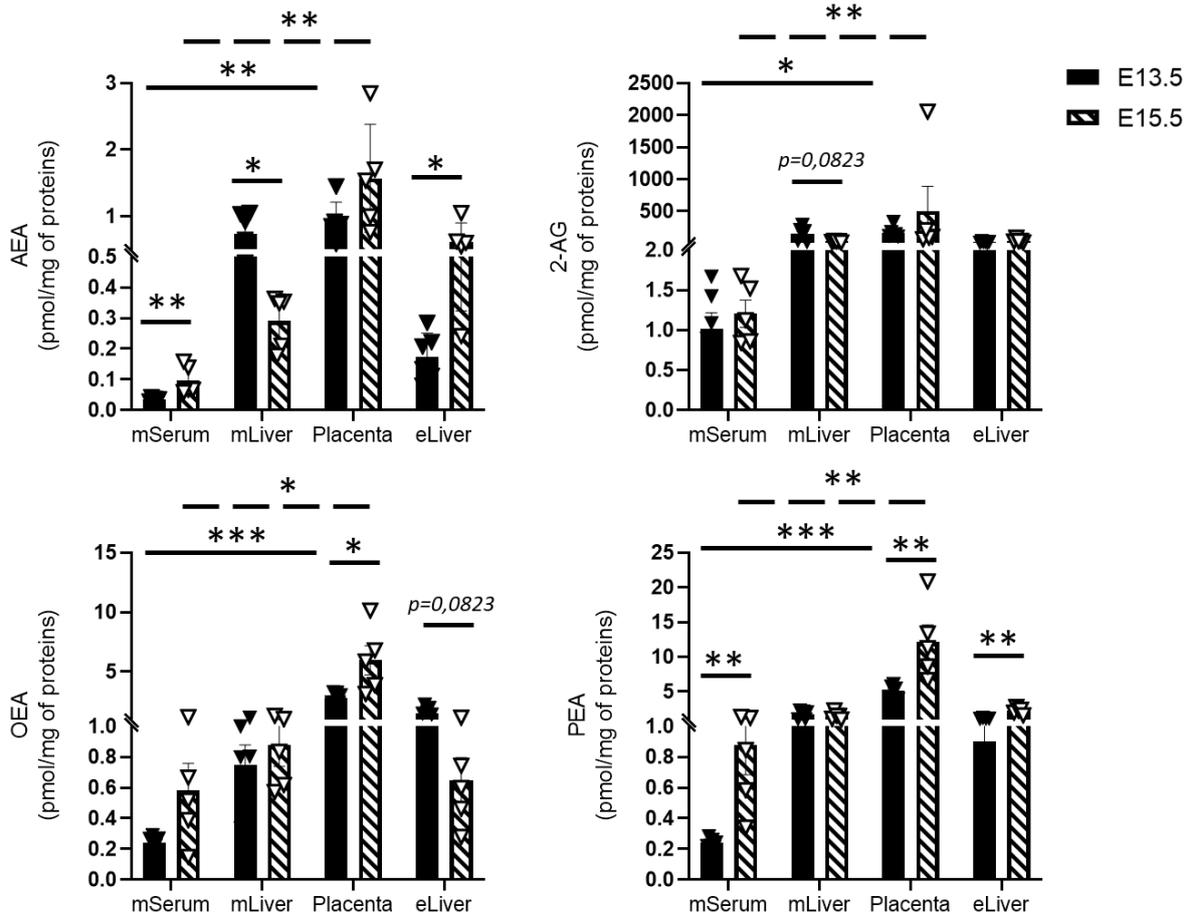


Figure 2: Endocannabinoids levels are modified between E13.5 and E15.5 in mother and embryo.

Anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), olcoylethanolamide (OEA) and palmitoylethanolamide (PEA) were dosed by high performance liquid chromatography in maternal serum (mSerum), maternal liver (mLiver), placenta and embryonic liver (eLiver) after maternal exposure to a mixture of CBD and THC solvents (ratio 1:1) (control condition) from E6.5 to E13.5 (n=6) or E15.5 (n=6). Data are presented as mean +/- SEM. Mann-Whitney tests were performed for pair comparisons between E13.5 and E15.5 data (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Friedman tests followed by Dunn multiple comparison tests were performed for comparisons between biological matrices for E13.5 and E15.5 data (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

E15.5 dans le sérum maternel (0.241 +/- 0.019 et 0.584 et +/- 0.019 pmol/mg de protéines respectivement), le foie maternel (0.747 +/- 0.131 et 0.877 +/- 0.138 pmol/mg de protéines respectivement), le placenta (2.801 +/- 0.175 et 5.975 +/- 1,231 pmol/mg de protéines respectivement) et le foie embryonnaire (1.482 +/- 0.288 et 0.648 +/- 0.148 pmol/mg de protéines respectivement). Enfin, le PEA a été retrouvé à E13.5 et E15.5 dans le sérum maternel (0.239 +/- 0.011 et 0.88 +/- 0.196 pmol/mg de protéines respectivement), le foie maternel (1.709 +/- 0.23 et 1.502 +/- 0.232 pmol/mg de protéines respectivement), le placenta (5.105 +/- 0.344 et 12.167 +/- 2.458 pmol/mg de protéines respectivement).

Après avoir mis en évidence leur présence, nous avons comparé les quantités d'ECB entre E13.5 et E15.5. Nous avons observé une augmentation significative de la quantité d'AEA entre E13.5 et E15.5 dans le sérum maternel ($p=0.0043$) et le foie embryonnaire ($p=0.0087$) ainsi qu'une diminution significative de la quantité d'AEA dans le foie maternel entre E13.5 et E15.5 ($p=0.0303$). Pour les autres ECB, nous avons noté une diminution non significative de la quantité de 2-AG dans le foie maternel entre E13.5 et E15.5 ($p=0.0823$). Une augmentation significative de la quantité d'OEA a été observée entre E13.5 et E15.5 dans le placenta ($p=0.0173$). Une diminution des niveaux de cet ECB a été mise en évidence dans le foie embryonnaire entre E13.5 et E15.5 mais elle n'était pas significative ($p=0.0823$). Enfin, une augmentation significative de la quantité de PEA a été observée entre E13.5 et E15.5 dans le sérum maternel ($p=0.0043$), le placenta ($p=0.0043$) et le foie embryonnaire ($p=0.0043$).

Nous avons également comparé les quantités de chaque ECB dans les différentes matrices biologiques analysées à un âge donné. Nos données ont mis en évidence une augmentation significative dans le placenta par rapport au sérum maternel de l'AEA, à E13.5 et à E15.5 ($p=0.0021$ et $p=0.0014$ respectivement), du 2-AG à E13.5 et à E15.5 ($p=0.0105$ et $p=0.0014$ respectivement), de l'OEA à E13.5 et à E15.5 ($p=0.0003$ et $p=0.0423$ respectivement) et du PEA à E13.5 et à E15.5 ($p=0.0009$ et $p=0.0036$ respectivement).

Nos résultats mettent en évidence la présence des ECB dans le sérum maternel, le plasma maternel, le placenta et le foie embryonnaire avec des quantités variables entre E13.5 et E15.5 selon les matrices biologiques. De plus, nos données à E13.5 et E15.5 montrent une accumulation de la présence des ECB dans le placenta par rapport au sérum maternel.

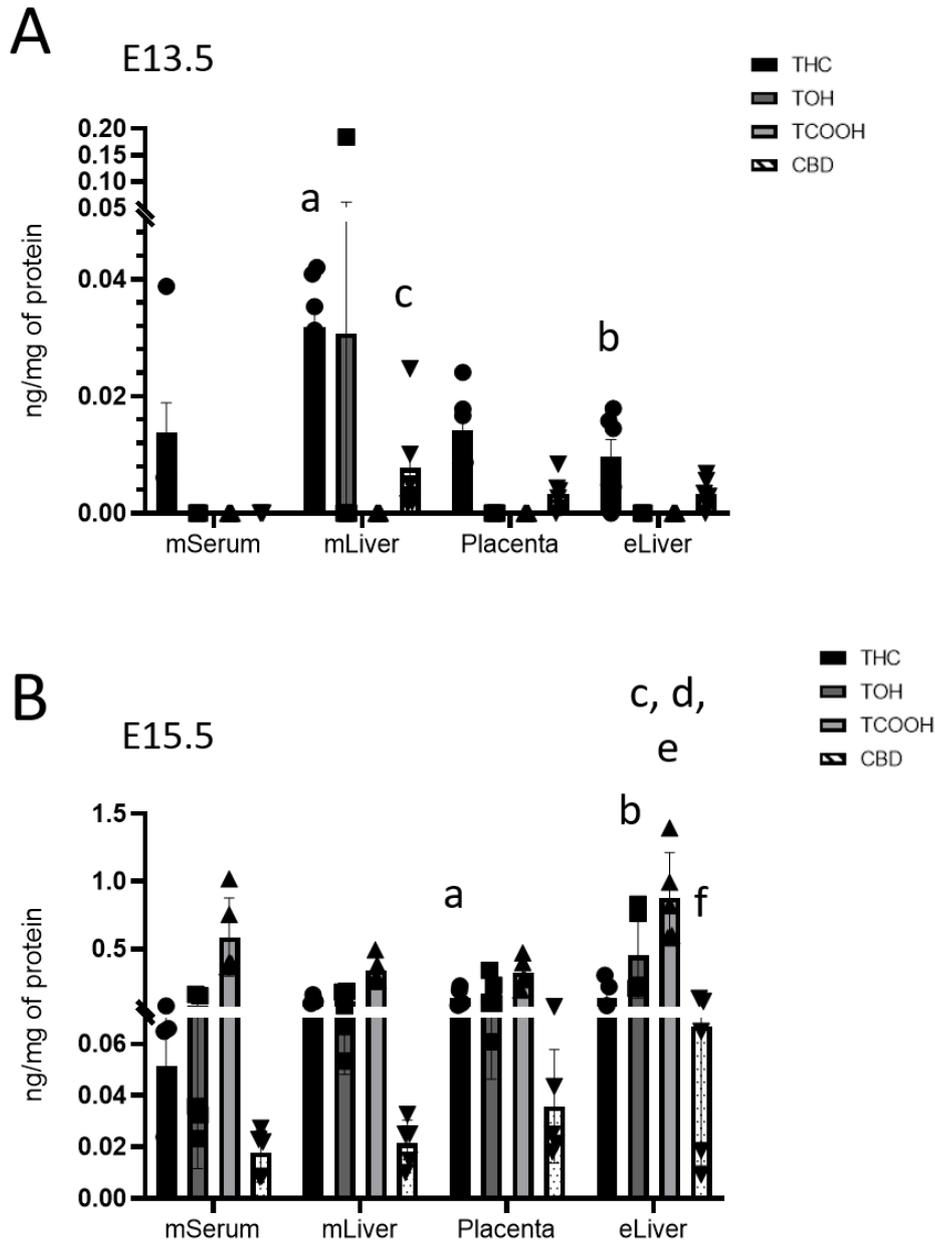


Figure 3: The THC, its metabolites and the CBD are able to cross the placental barrier and reach the embryo after CBD/THC maternal exposure from E6.5 to E13.5 or E15.5.

The THC two of its metabolites, the 11-hydroxy- Δ^9 -THC (TOH) and the 11-carboxy- Δ^9 -THC (TCOOH), and the CBD were dosed by HPLC in maternal serum (mSerum), maternal liver (mLiver), placenta and embryonic liver (eLiver) after maternal exposure to 5 mg/kg/day of a CBD and THC mixture (ratio 1:1) (CBD/THC) from E6.5 to **(A)** E13.5 (n=6) or **(B)** E15.5 (n=5). Data are presented as mean \pm SEM. Friedman tests followed by Dunn multiple comparison tests were performed for each molecules at both ages (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). At E13.5: (a) significant difference of THC between mSerum and mLiver, *; (b) significant difference of THC between mLiver and eLiver, *; (c) significant difference of CBD between mSerum and mLiver, *. At E15.5: (a) significant difference of THC between mSerum and placenta, *; (b) significant difference of TOH between mSerum and in eLiver, **; (c) significant difference of TCOOH between mLiver and in eLiver, *; (d) significant difference of TCOOH between placenta and in eLiver, *; (e) significant difference of TOH between mSerum and in eLiver, *. (f) significant difference between CBD mSerum and eLiver, *.

Passage materno-embryonnaire du THC, de ses métabolites, et du CBD après une exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC.

Nous avons cherché à savoir si le CBD et le THC pouvaient atteindre le compartiment embryonnaire après une exposition maternelle avec un mélange de CBD et de THC. Le THC, et deux de ses métabolites, le TOH et le TCOOH, et le CBD ont été dosés par HPLC dans le sérum maternel, le foie maternel, le placenta et le foie embryonnaire après une exposition maternelle à un mélange de 5 mg/kg par jour de CBD et de THC de E6.5 à E13.5 ou E15.5.

A E13.5, le THC est faiblement détecté dans le sérum maternel (en moyenne 0.014 +/- 0.005 ng/mg de protéines), le foie maternel (0.032 +/- 0.004 ng/mg de protéines), le placenta (0.014 +/- 0.003 ng/mg de protéines) et le foie embryonnaire (0.0096 +/- 0.003 ng/mg de protéines) (**Figure 3A**). La quantité de THC est significativement plus importante dans le foie maternel par rapport au sérum maternel ($p=0.0437$). En revanche, la quantité de THC diminue significativement entre le foie maternel et le foie embryonnaire ($p=0.0105$). Le CBD est très faiblement détecté dans le foie maternel (0.007 +/- 0.004 ng/mg de protéines), le placenta (0.003 +/- 0.001 ng/mg de protéines) et le foie embryonnaire (0.003 +/- 0.001 ng/mg de protéines) mais n'est détecté dans le sérum maternel d'aucun individus. Le TOH n'est observé dans le sérum maternel, le placenta et le foie embryonnaire d'aucun individu. Il est détecté dans le foie maternel d'un seul individu, sur les 6 analysés. Le TCOOH n'est observé dans aucune matrice biologique d'aucun individu.

A E15.5, le THC est détecté dans le sérum maternel (0.052 +/- 0.011 ng/mg de protéines), le foie maternel 0.108 +/- 0.0153 ng/mg de protéines), le placenta (0.139 +/- 0.0294 ng/mg de protéines) et le foie embryonnaire (0.136 +/- 0.054 ng/mg de protéines) (**Figure 3B**). La quantité de THC est significativement plus élevée dans le placenta par rapport au sérum maternel ($p=0.0197$). Le CBD est détecté dans le sérum maternel (0.018 +/- 0.004 ng/mg de protéines), le foie maternel (0.021 +/- 0.004 ng/mg de protéines), le placenta (0.036 +/- 0.01 ng/mg de protéines) et le foie embryonnaire (0.07 +/- 0.024 ng/mg de protéines). La quantité de CBD est significativement plus importante dans le foie embryonnaire par rapport au sérum maternel ($p=0.0423$). Le TOH est observé dans le sérum maternel (0.081 +/- 0.031 ng/mg de protéines), le foie maternel (0.112 +/- 0.029 ng/mg de protéines), le placenta (0.164 +/- 0.053 ng/mg de protéines) et le foie embryonnaire (0.45

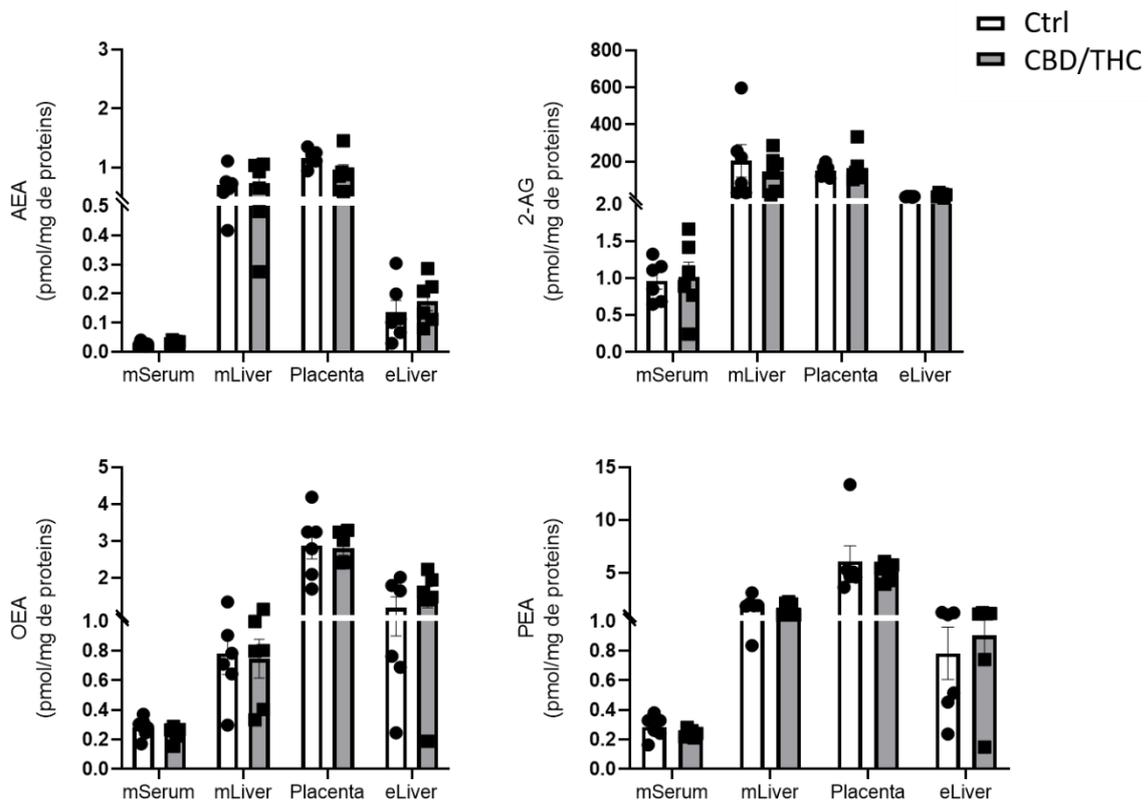


Figure 4: CBD/THC maternal exposure from E6.5 to E13.5 does not affect endocannabinoids levels in mother or embryo.

Anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), olcoylethanolamide (OEA) and palmitoylethanolamide (PEA) were dosed by high performance liquid chromatography in maternal serum (mSerum), maternal liver (mLiver), placenta and E13.5 embryonic liver (eLiver) after maternal exposure to 5 mg/kg/day of a CBD and THC mixture (ratio 1:1) (CBD/THC, n=6) or control (ctrl, n=6) from E6.6 to E13.5. Data are presented as mean +/- SEM. No significant difference ($p < 0.05$) between Ctrl and CBD/THC groups are highlighted by Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparison test.

+/- 0.142 ng/mg de protéines). La quantité de TOH est significativement plus élevée dans le foie embryonnaire par rapport au sérum maternel ($p=0.0087$). Enfin le TCOOH est détecté dans le sérum maternel (0.59 +/- 0.13 ng/mg de protéines), le foie maternel (0.338 +/- 0.045 ng/mg de protéines), le placenta (0.322 +/- 0.05 ng/mg de protéines) et le foie embryonnaire (0.88 +/- 0.15 ng/mg de protéines). La quantité de TCOOH est significativement plus importante dans le foie embryonnaire par rapport au foie maternel ($p=0.0197$) et par rapport au placenta ($p=0.0197$).

Dans toutes les matrices, les quantités de THC, le TOH, le TCOOH et le CBD sont significativement plus élevées à E15.5 par rapport à E13.5 (**Figure 3A et B**).

Nos résultats mettent en évidence la capacité du THC et du CBD à passer de la mère à l'embryon. Nos données suggèrent également que ce passage est plus efficace à E15.5 qu'à E13.5.

Impact d'une exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC de E6.5 à E13.5 sur les quantités d'ECB.

Nous avons ensuite étudié la capacité du CBD et du THC à perturber les quantités d'ECB dans les tissus maternels et embryonnaires. L'AEA, le 2-AG, l'OEA et le PEA ont été dosés par HPLC dans le sérum maternel, le foie maternel, le placenta et le foie embryonnaire après une exposition maternelle à un mélange de 5 mg/kg par jour de CBD et de THC de E6.5 à E13.5. L'exposition maternelle au mélange de CBD et de THC ne modifie significativement pas les quantités des quatre ECB étudiés dans les matrices biologiques analysées par rapport à la condition contrôle (**Figure 4**).

Ainsi, la présence de CBD et de THC au niveau du sérum maternel, du foie maternel, du placenta et du foie embryonnaire suite à une exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC, ne perturbe pas les quantités d'ECB présentes dans ces matrices biologiques à E13.5.

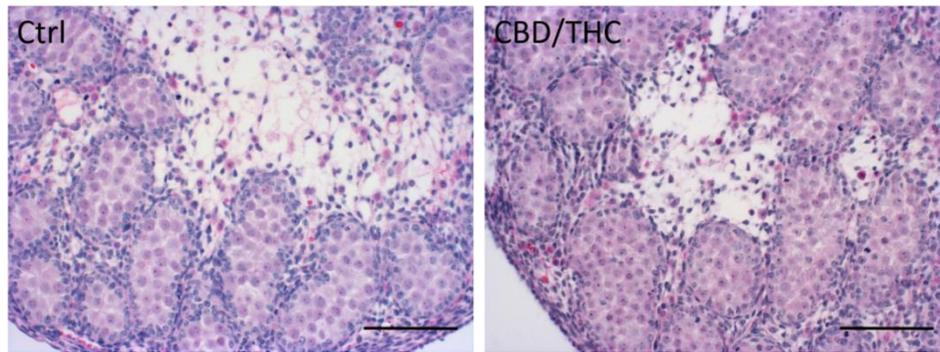


Figure 5: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E15.5 does not affect the morphology of embryonic testis at E15.5.

Hematoxylin and eosin staining of the histological sections of E15.5 embryonic murine testis exposed to control (Ctrl) or 5 mg/kg/day of a CBD and THC mixture (ratio 1:1) (CBD+THC) from E6.5 to E15.5. Scale bar : 50 μ m.

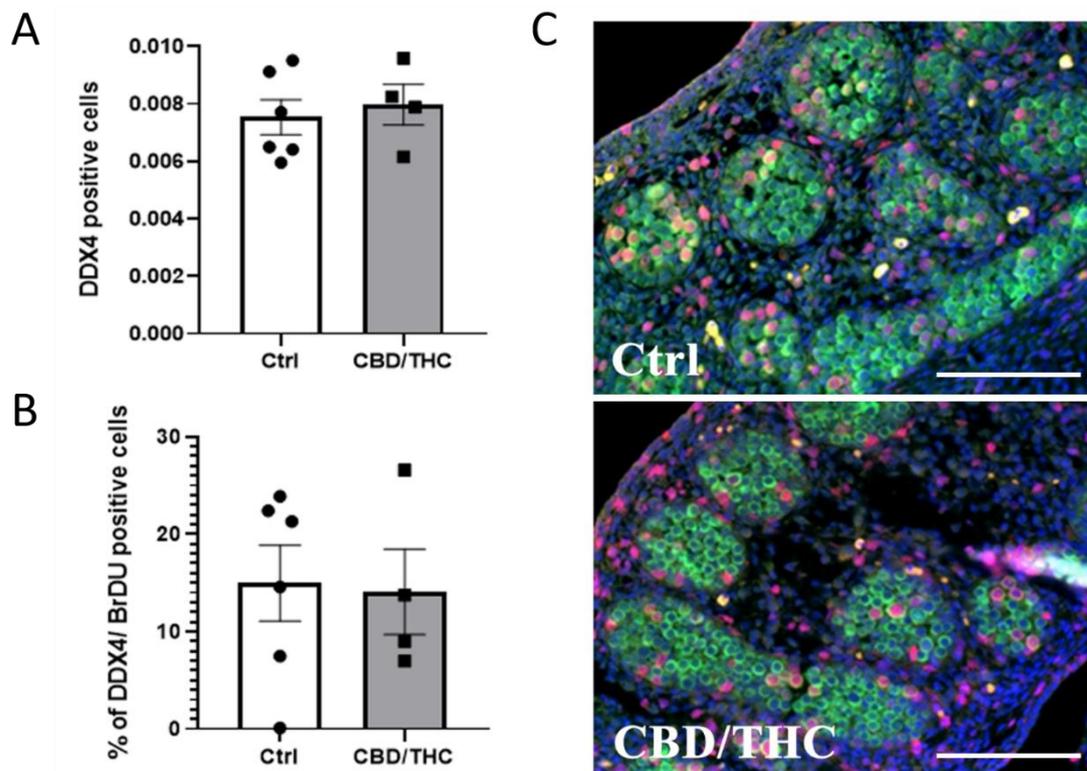


Figure 6: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E13.5 does not affect gonocytes number or proliferation.

Quantification of **(A)** gonocytes (DDX4 positives cells) and **(B)** gonocytes in S phase of the cell cycle (% of DDX4/BrDU positive cells) after maternal exposure to 5 mg/kg/day of CBD/THC mixture (ratio 1:1) (CBD/THC, n=6) or control (Ctrl, n=4) from E6.6 to E15.5. Data are presented as mean \pm SEM. No significant difference ($p > 0.05$) between Ctrl and CBD/THC groups are observed using Mann-Whitney. **(C)** Representative immunostaining of DDX4 (in green), a marker of gonocytes, and BrDU (in red), a marker of DNA replication, in an E15.5 testis. Nucleuses were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and appear in blue. Scale bar : 25 μ m.

Impact d'une exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC de E6.5 à E15.5 sur la morphologie du testicule embryonnaire à E15.5.

Nous avons investigué la capacité du CBD et du THC à perturber la morphologie du testicule embryonnaire après une exposition maternelle à un mélange de 5 mg/kg par jour de CBD et de THC de E6.5 à E15.5. Des sections de testicules embryonnaires âgés de E15.5 colorés avec un marquage à l'hématoxyline et à l'éosine n'ont pas montré de modifications morphologiques visibles entre la condition traitée et la condition contrôle (**Figure 5**).

Impact d'une exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC sur le nombre total des gonocytes et leur prolifération à E13.5.

Nous avons investigué les effets d'une exposition maternelle avec 5 mg/kg par jour de CBD et du THC de E6.5 à E13.5 sur le nombre de gonocytes et leur prolifération. Dans ce but, des immunofluorescences ont été réalisées sur des testicules embryonnaires âgés de E13.5, pour marquer les cellules positives au marqueur DDX4, qui est un marqueur des gonocytes, et les cellules positives pour le marqueur BrDU, qui est un marqueur de la phase de réplication de l'ADN du cycle cellulaire (cellules en phase S). Le nombre total de gonocytes (cellules DDX4-positives) et le pourcentage de gonocytes en phase S du cycle cellulaire (cellules double positives pour DDX4 et BrDU par rapport au nombre total de cellules positives pour DDX4) ont été déterminés. Le nombre de gonocytes (**Figure 6A**) et le pourcentage de gonocytes en phase S du cycle cellulaire (**Figure 6B**) ne sont pas significativement modifiés dans le testicule embryonnaire âgé de E13.5 après une exposition maternelle au CBD et au THC par rapport à la condition contrôle.

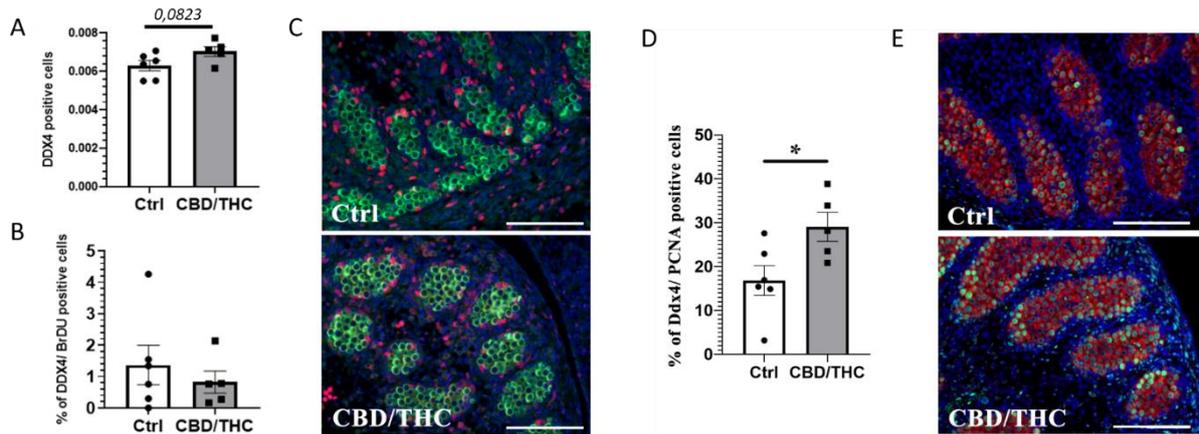


Figure 7: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E15.5 increases gonocytes proliferation at E15.5.

Quantification of **(A)** gonocytes (DDX4 positives cells) and **(B)** replicating of gonocytes in S phase of the cell cycle (% of DDX4/BrDU positive cells) after maternal exposure to 5 mg/kg/day of a CBD and THC mixture (ratio 1:1) (CBD/THC, n=5) or control (Ctrl, n=6) from E6.6 to E15.5. Data are presented as mean +/- SEM. No significant difference ($p > 0.05$) between Ctrl and CBD/THC groups are observed using Mann-Whitney. **(C)** Representative immunostaining of DDX4 (green), a marker of gonocytes, and BrDU (red), a marker of DNA replication, in an E15.5 testis. Nucleuses were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and appear in blue. **(D)** Quantification of gonocytes in G1/S phase of the cell cycle (% of DDX4/PCNA positive cells) after maternal exposure to 5 mg/kg/day of a CBD and THC mixture (ratio 1:1) (CBD/THC, n=5) or control (Ctrl, n=6) from E6.6 to E15.5. Data are presented as mean +/- SEM. Mann-Whitney tests were performed for pair comparisons (*, $p < 0.05$). **(E)** Representative immunostaining of DDX4 (in red), a gonocytes marker, and PCNA (in green), a G1/S phase of the cell cycle marker, in E15.5 testis exposed to CBD/THC or ctrl from E6.5 to E15.5. Nucleuses were stained with DAPI and appear in blue. Scale bar: 25 μm .

Impact d'une exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC sur le nombre total des gonocytes et leur prolifération à E15.5.

Les mêmes paramètres ont été investigués dans les testicules embryonnaires âgés de E15.5 dont les mères ont été exposées avec 5 mg/kg par jour de CBD et du THC de E6.5 à E15.5. Les gonocytes et les cellules en phase S du cycle cellulaire ont été révélés après une immunofluorescence dirigée contre DDX4 et BrDU dans les testicules embryonnaires âgés de E15.5. L'exposition maternelle au CBD et au THC entraîne une augmentation non significative du nombre total de gonocytes (cellules DDX4-positives) dans les testicules embryonnaires à E15.5 par rapport à la condition contrôle ($p=0.0823$) (**Figure 7A**). Le pourcentage de gonocytes en phase S (cellules double positives pour DDX4 et BrDU par rapport au nombre total de cellules positives pour DDX4) n'est pas modifié par l'exposition maternelle au mélange de CBD et de THC par rapport à la condition contrôle (**Figure 7B**).

Afin d'expliquer l'augmentation non significative du nombre de gonocytes à E15.5, la présence d'un autre marqueur de la prolifération cellulaire a été investigué dans ces tissus. Ainsi, les cellules positives au marqueur DDX4 et les cellules positives au marqueur PCNA, qui est un marqueur de la phase G1/S du cycle cellulaire, ont été révélées par immunofluorescence dans des testicules murins âgés de E15.5 après une exposition maternelle à un mélange de 5 mg/kg par jour de CBD et de THC de E6.5 à E15.5. Le pourcentage de gonocytes en phase G1/S du cycle cellulaire (cellules double positives pour DDX4 et PCNA par rapport au nombre total de cellules positives pour DDX4) est significativement plus élevé dans les testicules embryonnaires dont les mères ont été exposées au CBD et au THC pendant la gestation par rapport à la condition contrôle ($p=0.0303$). (**Figure 7D**).

Ces résultats nous indiquent qu'une exposition maternelle au CBD et au THC entraîne, dans le testicule à E15.5, une tendance à l'augmentation du nombre total de gonocytes, corrélée avec une augmentation du nombre de gonocytes en prolifération. A E13.5, ces paramètres ne sont pas modifiés par l'exposition maternelle au CBD et au THC.

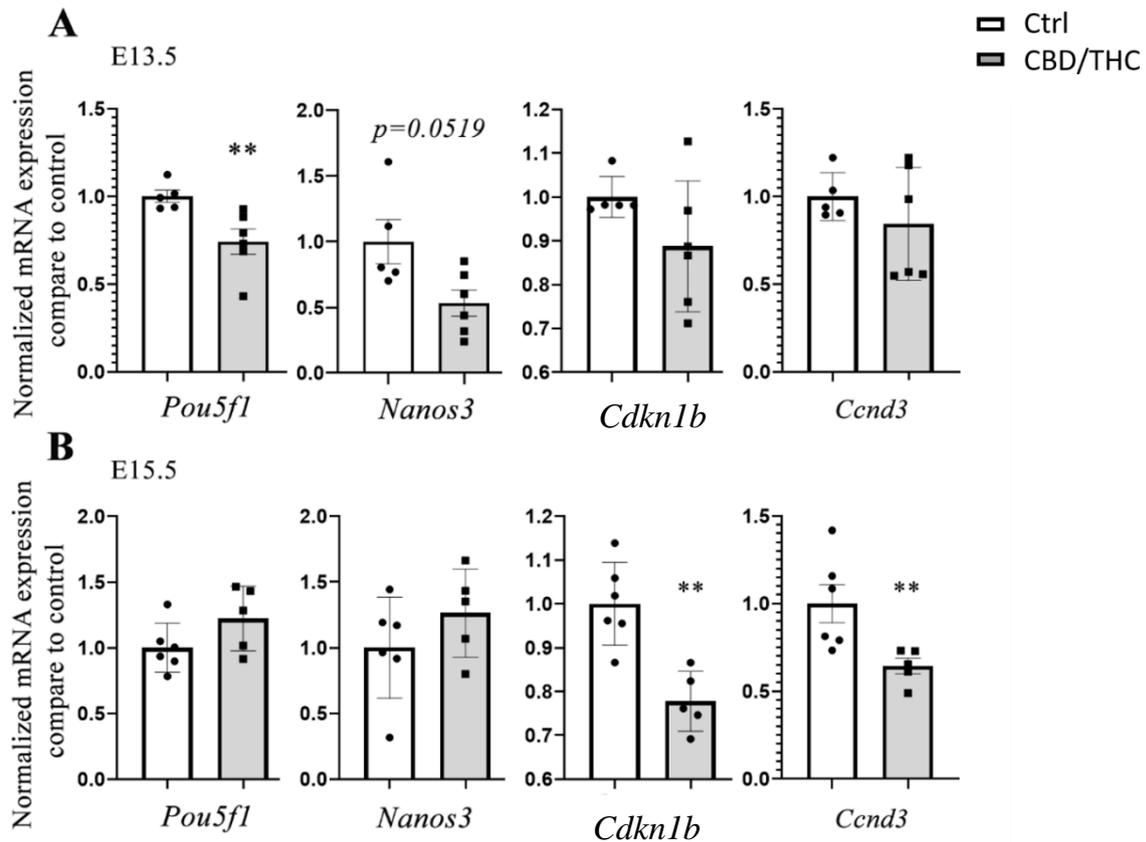


Figure 8: CBD/THC maternal exposure of mouse from E6.5 to E13.5 or E15.5 affects the expression of gene involved germ cell differentiation and in cell proliferation.

qPCR analysis using embryonic testis after maternal exposure to 5 mg/kg/day of a CBD and THC mixture (ratio 1:1) (CBD/THC, n=6) or control (Ctrl, n=5) from **(A)** E6.5 to E13.5 or **(B)** E6.5 to E15.5. The effects of treatment were investigated on genes involved in germ cell differentiation (*POU5F1*, *NANOS3*) and proliferation (*Cdkn1*, *Ccnd3*). Presented data are normalized on 2 reference genes (*RPLP0* and *ACTB*) and control condition (as mean \pm SEM). Mann-Whitney tests were performed for pair comparisons (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). *POU5F1* – POU class 5 homeobox 1; *NANOS2* – nanos C2HC-type zinc finger 3; *Cdkn1b* – cyclin dependant kinase inhibitor 1b; *Ccnd3* – cyclin D3; *RPLP0* – ribosomal protein lateral stalk subunit P0; *ACTB* – actin beta.

Impact d'une exposition maternelle à un mélange à un mélange de CBD et de THC sur l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules germinales et la prolifération cellulaire.

Pour expliquer l'augmentation non significative du nombre des gonocytes et l'augmentation significative du pourcentage de gonocytes en prolifération observées dans des testicules embryonnaires à E15.5, nous avons investigué l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules germinales et la prolifération par qPCR dans des testicules embryonnaires murins âgés de E13.5 et E15.5 après une exposition maternelle à un mélange de 5 mg/kg par jour de CBD et de THC de E6.5 à E13.5 ou E15.5. Nous avons étudié l'expression de deux gènes impliqués dans la survie et l'état indifférencié des cellules germinales, POU5F1 et NANOS3 ainsi que deux gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, CDKN1B et CCND3.

Dans le testicule embryonnaire à E13.5, l'exposition maternelle au CBD et au THC entraîne une diminution significative de l'expression de POU5F1 ($p=0.0043$) et une diminution de l'expression de NANOS3 proche de la significativité ($p=0.0519$) par rapport à la condition contrôle. L'expression de CDKN1B et de CCND3 n'est significativement pas affectée (**Figure 8A**).

Dans le testicule embryonnaire à E15.5, l'exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC n'affecte pas significativement l'expression de POU5F1 ou de NANOS3 mais entraîne une diminution significative de l'expression de CDKN1B ($p=0.0043$) et de CCND3 ($p=0.0043$) (**Figure 8B**).

Une exposition maternelle au CBD et au THC perturbe la différenciation et la survie des gonocytes à E13.5 mais pas à E15.5. A l'inverse, à E15.5, l'exposition maternelle au CBD et au THC entraîne des perturbations de la régulation du cycle cellulaire.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
POU5F1	AGACCACCATCTGTCGCTTC	ATCCTTCTCTAGCCCAAGCTG
NANOS3	CGGCCTGACAAGGCAAAGAC	CACCATGGTCCTCCCCACTC
Cdkn1b	CTTAATTGGGTCTCAGGA	CCCTTTTGTGTTTGCGAAGAA
CCdn3	CACGACTTCCTGGCCTTGAT	GTGAGCTCATCCGCAGACAT
Rplp0	ACCCTGAAGTGCTCGACATC	AGGAAGGCCTTGACCTTTTC
ActB	CCAAGTGGGACGACATGGAG	ACAGCACAGCCTGGATGGC

Supplementary Table 1. Primers used in RT-qPCR in E13.5 and E15.5 murin testis.

C) Discussion

Il existe très peu d'études dans la littérature chez les animaux modèles investiguant les effets d'une exposition maternelle à des phytocannabinoïdes pendant la gestation sur le développement des fonctions testiculaires. Les résultats de ces études sont hautement variables selon l'espèce étudiée, la période d'exposition gestationnelle, la méthode d'administration et les doses employées. De plus, le moment d'observation des individus issus de l'exposition gestationnelle ainsi que les paramètres étudiés varient grandement.

Le but global de cette étude est d'évaluer les impacts chez la souris d'une exposition maternelle *in vivo* aux deux composants majoritaires du cannabis, également utilisés en thérapie, le THC et le CBD, à des doses retrouvées lors d'une exposition chez l'humain, sur la mise en place des fonctions reproductives et leur fonctionnalité après la naissance. Des souris gestantes ont ainsi été exposées par gavage avec un mélange de THC et de CBD, à une dose de 5 mg/kg par jour, qui mime une exposition thérapeutique chez l'homme, de E6.5 à E13.5 et E15.5.

Mon projet s'est concentré sur l'impact de ce traitement sur la physiologie des gonocytes dans le testicule embryonnaire. En effet, il a été montré chez l'homme adulte qu'une exposition au cannabis peut perturber la différenciation des cellules germinales et induire l'apparition de TGCT (Gurney et al., 2015a; Ghasemiesfe et al., 2019a; Song et al., 2020a). De plus, une étude a montré chez la souris que deux récepteurs spécifiques des cannabinoïdes, CB1 et CB2, sont exprimés dans les gonocytes murins et que l'activation *in vitro* de CB2 entraîne une perturbation de la physiologie de ces cellules (De Domenico et al., 2017b). De la même manière que dans le testicule humain fœtal, nous avons fait ici l'hypothèse que le système des ECB est impliqué dans la différenciation des cellules germinales au cours du développement chez la souris. Une altération de la signalisation du système des ECB pourrait conduire à une perturbation de la physiologie des gonocytes, entraînant des défauts de la fertilité chez l'individu après la naissance. Les gonocytes ont été étudiés à deux âges embryonnaires : à E13.5 et E15.5. Chez la souris, les gonocytes sont des cellules prolifératives et pluripotentes puis entrent en quiescence mitotique à E14.5 (Hilscher et al.,

1974; Western et al., 2008, 2010). Les gonocytes restent ensuite dans un état quiescent jusqu'à la naissance, à l'établissement des premières vagues de spermatogenèse (Nagano et al., 2000; Vergouwen et al., 1991). Nous avons analysé si une exposition gestationnelle pouvait entraîner à E13.5 une dérégulation de la prolifération des gonocytes et si cette même exposition pouvait affecter leur état théoriquement quiescent à E15.5.

1. Les paramètres de portées

Des études chez le rongeur et le singe ayant rapporté qu'une exposition gestationnelle au cannabis ou au Δ^9 -THC peut entraîner chez les fœtus, un retard de croissance (Persaud and Ellington, 1967), une mortalité fœtale (Persaud and Ellington, 1967, 1968; Mantilla-Plata et al., 1975; Abel et al., 1980; Singh et al., 1981; Asch and Smith, 1986; Hutchings et al., 1987; Chang et al., 2017; US FDA Report, 2018; Huestis et al., 2019b), et une diminution du poids des petits (Abel et al., 1980; Singh et al., 1981; Benevenuto et al., 2017; Chang et al., 2017), nous avons investigué plusieurs paramètres concernant les portées obtenues.

L'administration à des souris gestantes de 5 mg/kg de CBD et de THC de E6.5 à E13.5 ou E15.5 ne modifie pas significativement la taille des portées, le gain de poids maternel et le poids embryonnaire à E13.5 et E15.5. Les doses utilisées dans les études ayant rapporté des effets néfastes du cannabis ou du Δ^9 -THC chez les animaux modèles après une administration par gavage étaient néanmoins supérieures à la nôtre, allant jusqu'à 400 mg/kg/jour chez la souris (Joneja, 1976; Abel et al., 1980; Singh et al., 1981; Hutchings et al., 1987; US FDA Report, 2018; Huestis et al., 2019b).

Un groupe a rapporté l'impact d'une exposition gestationnelle au THC à la dose employée dans notre étude. L'administration de 5 mg/kg de THC de E5.5 à E18.5 chez des souris gestantes induit une diminution du poids maternel, une diminution du poids embryonnaire et placentaire à E19.5 et une diminution de la taille de la portée (Chang et al., 2017). S'il s'agit de la même dose que celle employée dans notre étude, l'administration était en revanche effectuée par des injections intrapéritonéales. Les propriétés pharmacocinétiques des phytocannabinoïdes sont extrêmement dépendantes de leur mode

d'administration. Nous avons utilisé une méthode d'administration orale du mélange de THC et de CBD, par gavage. Il a été montré que ce mode d'administration résulte en une biodisponibilité faible du CBD et du THC (de 4 à 20%) du fait de leur destruction partielle dans l'estomac, leur faible absorption gastro-intestinale et de leur métabolisme hépatique (Wall et al., 1983; Agurell et al., 1981; Ohlsson et al., 1980; Gaston and Friedman, 2017). Possiblement pour cette raison, la dose employée dans notre étude avec ce mode d'administration n'induit visiblement pas de foeto-toxicité. De façon cohérente avec cette hypothèse, une autre étude a mis en évidence que l'administration de 5 mg/kg de THC par gavage chez des souris gestantes de E5.5 à E18.5 n'affecte pas la taille des portées et le poids des foetus (Fleischman et al., 1975).

2. Les endocannabinoïdes

Les deux ligands endogènes principaux du système des ECB, l'AEA et le 2-AG ont été détectés par HPLC dans le sérum et le foie maternel, le placenta et le foie embryonnaire des souris en condition contrôle à E13.5 et E15.5. Deux autres ECB, l'OEA et le PEA ont également été détectés dans ces matrices biologiques.

Nos analyses ont mis en évidence que les niveaux des quatre ECB analysés sont significativement plus importants dans le placenta comparé au sérum maternel à E13.5 et à E15.5. A E13.5 il y a ainsi dans le placenta 27,01 fois plus d'AEA, 163 fois plus de 2-AG, 11,58 fois plus d'OEA, et 21,03 fois plus de PEA que dans le sérum maternel. De même, à E15.5, il y a 16,05 fois plus d'AEA, 416,53 fois de 2-AG, 10,23 fois plus d'OEA et 13,82 fois plus de PEA dans le placenta par rapport au sérum maternel. Ces observations laissent suggérer un rôle particulièrement important de ces ligands dans la physiologie placentaire.

Il est décrit dans la littérature que la signalisation du système des ECB est cruciale à l'établissement et à l'activité du placenta (prolifération cellulaire, différenciation, métabolisme cellulaire, etc.) chez la femme et les rongeurs (pour revue : Costa, 2016; Maia et al., 2020). De manière cohérente à nos résultats, dans une autre étude chez la souris, l'AEA et le 2-AG ont été détectés dans le placenta (Sun and Dey, 2012). De plus, il a été montré que plusieurs enzymes du système des ECB ainsi que les récepteurs CB1 et TRPV1

sont exprimés dans ce tissu. Une étude a mis en évidence que des souris invalidées pour le gène du récepteur CB1 présentent une altération de la prolifération, de la différenciation et de l'invasion des cellules placentaires (Sun et al., 2010). Nos observations pourraient confirmer l'importance du système des ECB dans la physiologie placentaire au cours de la gestation chez la souris.

Chez la femme, il est décrit que le système des ECB est impliqué dans le déclenchement de l'accouchement (pour revue : Accialini et al., 2020; Kozakiewicz et al., 2021). En comparaison, relativement peu de données sont disponibles sur la modulation de ce système lors de la parturition chez la souris. Dans l'utérus murin, la parturition serait modulée en partie via l'activation de CB1 par l'AEA (Wang et al., 2008; Bariani et al., 2015).

Nos dosages par HPLC ont mis en évidence une augmentation significative de la quantité d'AEA entre E13.5 et E15.5 dans le sérum maternel. Cette observation est cohérente avec l'augmentation des quantités d'AEA plasmatiques observée chez des femmes lors de l'accouchement (Habayeb et al., 2008b; Nallendran et al., 2010).

Chez le rat, il a été mis en évidence que les niveaux d'AEA et de 2-AG augmentent significativement dans le placenta à l'approche de la parturition, à E19 (Fonseca et al., 2012). De même, chez la femme, les niveaux d'AEA placentaires seraient plus élevés lors de l'accouchement, par rapport à avant l'accouchement (Abán et al., 2013; Torella et al., 2019). Nos dosages des ECB par HPLC ont mis en évidence que les niveaux de 2-AG et d'AEA ne sont significativement pas modifiés dans le placenta entre E13.5 et E15.5. Si cette différence pourrait être expliquée par des variations inter-espèces, il semblerait que les âges embryonnaires analysés dans notre étude soient trop précoces pour observer une potentielle augmentation de l'AEA et du 2-AG dans le placenta. Il serait intéressant de réaliser des dosages de l'AEA et du 2-AG dans le sérum maternel et le placenta au moment de la parturition (E19 chez la souris environ) afin de mieux appréhender le rôle de ces ECB dans ce processus.

Nous avons observé une augmentation significative de la quantité d'AEA dans le foie embryonnaire et d'OEA dans le placenta entre E13.5 et E15.5. De plus, les niveaux de PEA dans le sérum maternel, le placenta et le foie embryonnaire augmentent significativement

entre E13.5 et E13.5. Ces données peuvent suggérer un rôle de ces ECB à l'approche de la fin de la gestation chez la souris et pourraient donner lieu à des investigations.

Nos résultats ont également indiqué que dans le foie embryonnaire, les quantités de 2-AG sont 98,2 fois plus élevées que l'AEA à E13.5 et 65.52 fois plus élevées que l'AEA à E15.5. Dans le placenta, les quantités de 2-AG sont 178.09 fois plus importantes que celles de l'AEA à E13.5 et 319.86 fois plus importantes que celles de l'AEA à E15.5. De façon cohérente, d'autres études ont rapporté des plus hauts niveaux placentaires de 2-AG comparé à l'AEA à E12 chez la souris (Sun et al., 2010) et à E14 chez le rat (Fonseca et al., 2012). Ces observations peuvent suggérer une plus forte implication du 2-AG dans la régulation de la physiologie du placenta et du foie embryonnaire. Le 2-AG étant un métabolite important dans la voie de synthèse des prostaglandines (Nomura et al., 2011), sa forte quantité dans ces deux tissus pourrait également suggérer des implications physiologiques de ce ligand indépendantes du système des ECB, telle que la régulation de l'inflammation.

A la suite de l'observation de la présence de l'AEA et du 2-AG dans le foie embryonnaire, il serait intéressant d'étudier leur présence dans d'autres tissus embryonnaires, en particulier le testicule dans notre étude. Pour compléter la description du système des ECB dans ce tissu, il est prévu d'investiguer l'expression des enzymes de synthèse et de dégradation de l'AEA et du 2-AG dans les testicules embryonnaires à E13.5 et E15.5. Nos premiers résultats indiquent l'expression des enzymes DAGLA et NAT10 dans ce tissu à E15.5 (données non publiées).

Il a été décrit chez le rat que le cerveau embryonnaire exprime CB1 et que le foie embryonnaire est le seul organe embryonnaire qui exprime CB2 (Buckley et al., 1997). Chez la souris, la présence et la localisation des récepteurs aux cannabinoïdes est très peu décrite chez l'embryon. Il serait pertinent que nous étudiions la présence et la localisation de CB1, de CB2 et de récepteurs alternatifs dans plusieurs organes embryonnaires murins, en particulier dans le testicule dans notre étude. En plus de pouvoir mieux appréhender l'implication du système des ECB dans l'ontogenèse et la régulation physiologique embryonnaire de plusieurs organes, la description des récepteurs de ce système permettrait de mieux comprendre les effets d'une exposition gestationnelle aux ligands exogènes du

système, comme le CBD et le THC. Nos premiers résultats indiquent l'expression de CB1 et de CB2 dans le testicule embryonnaire murin à E13.5 (données non publiées).

3. Le passage materno-embryonnaire du CBD et du THC

Comme il avait déjà été décrit chez la souris (Idänpään-Heikkilä et al., 1969; Freudenthal et al., 1972; Harbison and Mantilla-Plata, 1972; Kennedy and Waddell, 1972; Vardaris et al., 1976; Ochiai et al., 2021), nos données mettent en évidence que le THC et le CBD sont capables de traverser la barrière placentaire et d'atteindre le fœtus.

Les dosages par HPLC ont indiqué que le CBD et le THC sont détectés dans le foie maternel, le placenta et le foie embryonnaire à E13.5. Au même âge, le THC est le seul phytocannabinoïde étudié qui est détecté dans le sérum maternel. Le TOH n'a été détecté que chez le foie maternel d'un individu et le TCOOH n'a été détecté dans aucune matrice biologique analysée.

A E13.5, nous avons observé que les niveaux de THC sont significativement plus importants dans le foie maternel (2,30 fois plus) par rapport au sérum maternel. De plus, le CBD est détecté dans le foie maternel, mais pas dans le sérum maternel. On peut supposer une accumulation de ces phytocannabinoïdes dans le foie maternel, organe principal de leur métabolisation. Chez le rat, une étude a mis en évidence que l'administration d'un mélange de CBD et de THC par voie orale entraîne un pic plasmatique de CBD et de THC 2 heures après l'administration (Hložek et al., 2017). Une étude ayant étudié l'accumulation de THC radioactif dans plusieurs tissus chez la souris a mis en évidence une accumulation de ce phytocannabinoïde essentiellement dans le foie, la graisse et l'intestin, 3 heures après une administration orale (Freudenthal et al., 1972). Ces données et nos observations suggèrent qu'après l'administration maternelle orale du mélange de CBD et de THC dans notre modèle, ces phytocannabinoïdes entrent dans la circulation générale puis s'accumulent dans le foie maternel pour y être dégradés.

Les deux métabolites principaux du THC, le TOH et le TCOOH ne sont détectés dans aucune matrice biologique, à l'exception du foie maternel d'un individu. Cet individu ne présente pas de niveaux de THC aberrants comparés aux autres. Le TOH est le premier métabolite du

THC, qui résulte de l'hydroxylation de ce dernier (Matsunaga et al., 1995; Iribarne et al., 1996). L'oxydation du TOH entraîne ensuite la formation du TCOOH (Lemberger et al., 1970; Mechoulam et al., 1973). Chez le rat, une étude a mis en évidence que l'administration d'un mélange de CBD et de THC par voie orale entraîne un pic plasmatique du TOH 8 heures après l'administration (Hložek et al., 2017). La collecte des tissus et du plasma des souris selon notre protocole s'est effectué entre 2 et 6 heures après la dernière administration de CBD et de THC. Ce timing pourrait être potentiellement trop précoce pour observer la présence du TOH chez nos individus sauf pour un, chez qui la métabolisation hépatique du THC pourrait avoir été initiée.

A E13.5, nous avons également observé que la quantité de THC est significativement plus importante dans le foie maternel (3,31 fois plus) par rapport au foie embryonnaire. Cette observation suggère qu'à E13.5, l'organisme maternel limite l'exposition du fœtus au CBD et au THC. Le placenta pourrait également être impliqué dans ce rôle.

Enfin, l'absence de TOH et TCOOH dans le placenta et le foie embryonnaire suggère que ces tissus ne métabolisent pas le THC à E13.5.

Nos dosages par HPLC ont indiqué que le THC, le TOH, le TCOOH et le CBD sont retrouvés dans le sérum maternel, le foie maternel, le placenta et le foie embryonnaire à E15.5.

Nous avons observé que dans toutes les matrices biologiques considérées, les quantités de CBD et de THC sont significativement plus importantes à E15.5 par rapport à E13.5. De plus, le TOH et le TCOOH qui n'étaient pas détectés à E13.5 sont détectés dans toutes les matrices biologiques, à des niveaux parfois très similaires au THC, comme dans le foie maternel et le placenta.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les différences drastiques des niveaux des différents phytocannabinoïdes observées à E13.5 et E15.5.

Dans les deux groupes, les souris sont traitées le matin des prélèvements. Les différences de quantités du CBD et du THC ne peuvent donc pas être expliquées par une différence du temps entre l'administration du mélange de CBD et de THC et la collecte du sérum maternel

et des différents tissus maternels et embryonnaires. En revanche, les dosages par HPLC des phytocannabinoïdes dans les échantillons à E13.5 et à E15.5 n'ont pas été effectués au cours de la même expérimentation. On ne peut exclure un effet des appareils et des expérimentateurs ayant traité nos échantillons sur la variabilité de la détection des différents phytocannabinoïdes.

Chez l'homme, plusieurs études ont décrit qu'une exposition chronique au CBD ou au THC entraîne des changements pharmacocinétiques de ces phytocannabinoïdes. Ainsi, il a été montré que des consommateurs réguliers de cannabis peuvent présenter une augmentation de la C_{max} plasmatique et de la demi-vie du THC et de ses métabolites (Hunt and Jones, 1980; Johansson et al., 1988; Skopp and Potsch, 2008; Toennes et al., 2008). Une augmentation de la demi-vie du CBD a également été observée chez des hommes après une exposition prolongée (Consroe et al., 1991). En conséquence, il a été mis en évidence dans plusieurs études que les niveaux basaux et après une consommation de THC, de THC et de ses métabolites chez des hommes consommateurs réguliers de cannabis, sont plus hauts que des hommes qui ne sont pas des consommateurs réguliers (pour revue : Colizzi and Bhattacharyya, 2018). De façon cohérente à nos observations, une étude chez le rat a mis en évidence que l'administration de CBD et de THC pendant 21 jours entraîne une augmentation de la concentration de TCOOH et une augmentation de CBD dans le plasma par rapport l'administration d'une dose unique (Klein et al., 2011). Ce phénomène pourrait s'appliquer chez la souris. Si seulement 48 heures d'exposition séparent les individus traités jusqu'à E13.5 des individus traités jusqu'à E15.5, cette période constitue 10% de la gestation chez la souris. Une exposition au CBD et au THC jusqu'à E15.5 pourrait s'apparenter à une exposition prolongée, par rapport à une exposition jusqu'à E13.5. Les différences entre les quantités du CBD et du THC entre E13.5 et E15.5 pourraient ainsi être expliquées par des modifications des propriétés pharmacocinétiques de ces molécules, entraînées par la prolongation de l'exposition.

Chez l'homme, il a été montré qu'une exposition chronique au THC entraîne son accumulation dans les tissus adipeux. Il peut ensuite être redistribué progressivement dans la circulation générale (Johansson et al., 1989), entraînant la prolongation de sa demi-vie observée chez des consommateurs réguliers de cannabis. Chez la souris également, il a été observé que le THC est capable de s'accumuler dans les graisses, dans lesquelles il peut être

trouvé jusqu'à 24 heures après une administration unique de THC (Freudenthal et al., 1972; Harbison and Mantilla-Plata, 1972; Kennedy and Waddell, 1972). Une étude a récemment observé que l'administration quotidienne sous-cutanée d'un mélange de CBD et de THC à 1 mg/kg par jour chez la souris pendant 28 jours entraîne l'accumulation du CBD et du THC dans les graisses, dans lesquelles ils peuvent rester jusqu'à 42 jours pour le CBD et 50 jours pour le THC (Nidadavolu et al., 2021). Dans notre modèle, l'exposition jusqu'à E15.5 d'un mélange de CBD et de THC pourraient entraîner leur accumulation dans les graisses, d'où ils seraient relâchés progressivement, retardant leur métabolisation hépatique et leur élimination. Il serait particulièrement pertinent dans notre étude de pouvoir doser le THC, ses métabolites et le CBD dans les tissus adipeux de souris à E13.5 et E15.5 pour répondre à cette hypothèse.

En plus du foie et des tissus adipeux, il a été mis en évidence que l'administration de CBD et de THC chez la souris et le rat entraîne leur accumulation dans d'autres tissus, tels que le cerveau, les reins, les muscles, l'intestin, les glandes surrénales, et les glandes mammaires et le corps jaune chez la femelle gestante (Harbison and Mantilla-Plata, 1972; Kennedy and Waddell, 1972; Freudenthal et al., 1972; Hložek et al., 2017). Des quantités variables de CBD et de THC sont observées dans les tissus selon le mode d'administration et les doses administrées. Il serait intéressant dans notre modèle, d'analyser à E13.5 et à E15.5 l'accumulation de ces phytocannabinoïdes dans d'autres tissus maternels. De la même manière que leur accumulation dans les tissus adipeux, leur présence dans ces tissus pourrait expliquer la prolongation de leur détection dans le plasma et le foie maternel à E15.5.

A E13.5, le TOH et le TCOOH n'ont pas été détectés dans les tissus maternels, à l'exception d'un individu. Les hauts niveaux de THC, de TOH et de TCOOH à la fois dans le sérum et dans le foie maternel à E15.5 suggère un ralentissement de la métabolisation du THC et/ou de l'élimination de ses métabolites.

Il a été mis en évidence chez l'homme que le CBD et le THC peuvent altérer l'expression et l'activité d'enzymes hépatiques CYP450 (Nasrin et al., 2021). Cet effet du CBD et du THC sur les enzymes CYP450 a également été observé chez le rongeur (Zendulka et al., 2016). Une exposition au CBD et au THC jusqu'à E15.5 dans notre modèle pourrait altérer l'expression et l'activité d'enzymes CYP450, ralentissant leur propre métabolisation.

De plus, il est décrit chez la femme enceinte que l'expression et l'activité d'enzymes participant à la métabolisation du THC et du CBD comme CYP2C19, CYP3A4 et certaines UGT, sont modifiées au cours de la grossesse (Ward and Varner, 2019). Chez la souris également, des études ont mis en évidence une modification dans le foie maternel au cours de la gestation de l'expression d'enzymes CYP450 qui participent à la métabolisation du THC et du CBD, comme CYP1A2 et CYP3A4 (Koh et al., 2011; Shuster et al., 2013). Les caractéristiques de la métabolisation (vitesse, efficacité) du THC et du CBD chez les souris gestantes pourraient être modulées entre E13.5 et E15.5. Ceci expliquerait l'observation de fortes quantités de THC, de ses métabolites et du CBD dans le plasma et le foie maternel à E15.5, par rapport à E13.5. Pour répondre à cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier dans notre modèle l'expression et l'activité d'enzymes CYP450 dans le foie maternel de souris traitées avec un mélange de CBD et de THC jusqu'à E15.5 par rapport aux souris traitées jusqu'à E13.5 et celles en condition contrôle.

Comme à E13.5, nous avons mis en évidence que le CBD et le THC sont capables de traverser le placenta et d'atteindre le compartiment embryonnaire.

A E15.5 nos données ont montré une augmentation significative de la quantité de THC dans le placenta (2,68 fois plus) par rapport au sérum maternel. Nous avons également observé une augmentation significative des quantités de CBD (3,75 fois plus) dans le foie embryonnaire par rapport au sérum maternel. A l'inverse de nos observations à E13.5, nous avons mis en évidence que les deux métabolites principaux du THC, le TOH et le TCOOH sont présents dans le placenta et le foie embryonnaire. Il a déjà été montré dans la littérature chez la souris (Freudenthal et al., 1972) et le rat (Baglot et al., 2022) que certains métabolites du THC sont capables d'atteindre le compartiment fœtal. Nous avons observé que les quantités de TOH dans le foie embryonnaire sont significativement plus hautes (5,56 fois plus) par rapport au sérum maternel. Enfin, les niveaux de TCOOH sont significativement plus importants dans le foie embryonnaire par rapport au foie maternel (2,6 fois plus) et par rapport au placenta (2,72 fois plus).

Ces données peuvent indiquer que l'organisme maternel et le placenta à E15.5 limitent moins efficacement l'embryon au THC, à ses métabolites et au CBD. Une étude a mis en évidence que l'administration intrapéritonéale de souris avec 5mg/kg par jour de THC de E5.5 à E18.5 entraîne des altérations histologiques placentaires (Chang et al., 2017). De plus,

l'altération de la signalisation du récepteur CB1, par l'extinction de son expression, entraîne l'altération de la prolifération, de la différenciation et de l'invasion des cellules placentaires chez la souris (Sun et al., 2010). De façon additionnelle à une diminution de la métabolisation du CBD et du THC et/ou de l'élimination de leurs métabolites par l'organisme maternel, l'exposition du placenta à des ligands exogènes du système des ECB, comme le CBD et le THC, pourrait perturber la physiologie placentaire, diminuant ses capacités de barrière. En conséquence, des molécules environnementales comme le THC, le TOH, le TCOOH et le CBD pourraient passer d'autant plus et s'accumuler dans les tissus embryonnaires.

Chez la souris, il a été suggéré que l'organisme foetal est capable de métaboliser le Δ 9-THC (Freudenthal et al., 1972). De même, le placenta et le foie foetal murin expriment des enzymes CYP450 (Choudhary et al., 2005; Hart et al., 2009; Peng et al., 2012, 2013; Shuster et al., 2013; Ochiai et al., 2016). L'augmentation significative des quantités de THC, de TOH et de TCOOH dans le placenta ou le foie embryonnaire par rapport au sérum maternel pourrait également découler d'une acquisition par ces tissus de leur capacité à métaboliser le THC. Il serait pertinent d'étudier l'expression et l'activité des enzymes de métabolisation du THC dans le placenta et le foie embryonnaire pour estimer leur capacité à dégrader le THC.

Il a été montré dans le foetus de singe que le Δ 9-THC était retrouvé dans le plasma, la rate, le poumon, le cerveau, le rein, le foie, les glandes surrénales, le thymus et le testicule du foetus, 3 heures après une administration maternelle de 0,3 mg/kg de Δ 9-THC par intraveineuse (Bailey, 1987). Si nous avons observé une accumulation de THC, du TOH, du TCOOH et du CBD dans le foie embryonnaire, il serait intéressant d'analyser leur présence dans d'autres organes embryonnaires, en particulier dans le testicule pour notre étude.

Une analyse supplémentaire intéressante dans le cadre de notre étude serait la description de la présence et de la localisation des métabolites du CBD. N'ayant pas les mêmes effets physiologiques, il serait en effet judicieux d'appréhender si la molécule majoritaire présente dans les tissus est le CBD ou si ce sont ses métabolites.

4. L'interaction entre phytocannabinoïdes et ECB

Les dosages par HPLC des ECB ont mis en évidence que l'administration de 5 mg/kg d'un mélange de CBD et de THC à des souris gestantes de E6.5 à E13.5 ne modifie pas significativement les quantités de d'AEA, de 2-AG, d'OEA ou de PEA dans le sérum maternel, le foie maternel, le placenta ou le foie embryonnaire. Dans une étude récente chez le rat, l'exposition au THC de rattes gestantes n'affecte pas les niveaux d'ECB dans le cerveau des fœtus (Baglot et al., 2022).

Il serait à présent pertinent d'étudier si le CBD et le THC sont capables d'altérer les quantités d'ECB à E15.5, là où les niveaux de ces phytocannabinoïdes sont significativement plus importants. Dans le foie de souris adulte, il a en effet été montré que le traitement *in vitro* d'hépatocytes avec du THC entraîne une augmentation des niveaux d'AEA et de 2-AG (McIntosh et al., 2018). Une autre étude a mis en évidence que des souris traitées avec 5 mg/kg par jour de THC par injection intrapéritonéale de E5.5 à E18.5 entraîne l'altération de la quantité d'ARNm et de protéines de CB1 et de CB2 dans le placenta (Chang et al., 2017).

Il est prévu d'analyser par qPCR si l'exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC entraîne une altération de l'expression des composants du système des ECB dans plusieurs tissus à E13.5 et E15.5, dont le testicule. Nos premiers résultats n'indiquent pas d'impact d'une exposition au CBD et au THC sur l'expression de CB1 ou CB2 à E13.5 mais montrent une diminution de l'expression de l'enzyme FAAH à E13.5 (données non publiées).

5. Les gonocytes

L'exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC à 5 mg/kg par jour de E6.5 à E15.5 n'altère pas visiblement l'histologie du testicule embryonnaire à E15.5.

Chez la souris, les gonocytes sont prolifératifs jusqu'à E14.5 où ils rentrent en quiescence (Western et al., 2010). A un âge où les gonocytes sont prolifératifs, nous avons regardé si l'exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC pouvait altérer leur prolifération et leur nombre total. Le nombre total de gonocytes et le pourcentage de

gonocytes en phase S du cycle cellulaire ont été déterminés après des immunofluorescences sur des testicules embryonnaires à E13.5, dont les mères ont été exposées à un mélange de CBD et de THC à 5 mg/kg par jour de E6.5 à E13.5. Ces deux paramètres ne varient significativement pas avec la condition contrôle. De façon cohérente, les qPCR effectuées sur des testicules embryonnaires à E13.5 n'ont pas mis en évidence de modification de l'expression de deux gènes codant pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, CDKN1B et CCND3. Il semblerait donc que l'exposition gestationnelle à un mélange de CBD et de THC de E6.5 à E13.5 ne modifie pas significativement la prolifération des gonocytes à E13.5, ce qui se traduit un nombre total de gonocytes équivalent à celui de la condition contrôle.

Chez la souris, les gonocytes restent en quiescence de E14.5 jusqu'à après la naissance (Hilscher et al., 1974). A un âge où les gonocytes sont théoriquement tous en quiescence, nous avons regardé si une exposition maternelle avec un mélange de CBD et de THC pouvait résulter en une modification de leur prolifération, censée être très faible à cet âge et de leur nombre total. Le nombre total de gonocytes et le pourcentage de gonocytes en phase S du cycle cellulaire ont donc été déterminés après des immunofluorescences sur des testicules embryonnaires à E15.5, dont les mères ont été exposés à un mélange de CBD et de THC à 5 mg/kg par jour de E6.5 à E15.5. Nous avons observé une augmentation non significative du nombre total de gonocytes en condition traitée par rapport à la condition contrôle. Le pourcentage de gonocytes en phase S du cycle cellulaire n'est pas significativement modifié. Afin d'étendre les phases du cycle cellulaire analysées, nous avons déterminé le pourcentage de gonocytes de cellules en phase G1/S du cycle cellulaire dans des testicules embryonnaires à E15.5, dont les mères ont été exposés à un mélange de CBD et de THC à 5 mg/kg par jour de E6.5 à E15.5. Nous avons mis en évidence une augmentation significative du nombre de gonocytes prolifératifs par rapport à la condition contrôle.

Nous avons ensuite regardé par qPCR si l'expression de deux facteurs de régulation du cycle cellulaire, CDKN1B et CCND3, était modifiée dans des testicules embryonnaires à E15.5 dont les mères ont été exposées à un mélange de CBD et de THC à 5 mg/kg par jour de E6.5 à E15.5. CDKN1B est un facteur inhibiteur de l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire tandis que CCND3 est un régulateur positif de la transition G1/S du cycle cellulaire (Matsushime et

al., 1994; Meyerson and Harlow, 1994), dont l'activité est inhibée dans les cellules quiescentes.

De façon cohérente avec nos résultats d'immunofluorescence, l'exposition du testicule embryonnaire à E15.5 à un mélange de CBD et de THC entraîne une diminution significative de l'expression de CDKN1B. Il semblerait que l'exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC entraîne une levée de l'inhibition de l'entrée dans le cycle cellulaire des gonocytes, se traduisant par un ralentissement de leur entrée en quiescence. Ceci entraîne une augmentation de la proportion de gonocytes toujours dans le cycle cellulaire à E15.5, qui résulte en une tendance à l'augmentation de leur nombre total.

Nos résultats de qPCR ont également mis en évidence que l'exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC entraîne la diminution significative de l'expression de CCND3 dans les testicules embryonnaires à E15.5. De plus, nos résultats d'immunofluorescence ont indiqué que le traitement maternel à un mélange de CBD et de THC entraîne à E15.5 une augmentation significative du nombre des gonocytes en phase G1/S mais ne modifie pas le nombre de gonocytes en phase S. L'ensemble de ces données suggère que l'exposition au CBD et au THC altère l'entrée en quiescence des gonocytes, les faisant rentrer en phase G1 du cycle cellulaire, mais qu'ils ne sont pas capables de progresser en phase S. Il est probable que les facteurs intrinsèques et environnementaux des gonocytes à E15.5 ne soient pas favorables à leur progression dans le cycle cellulaire, à un âge où ils sont censés être en quiescence. La diminution de l'expression de CCND3 pourrait traduire un mécanisme de compensation de la perte de CDKN1 dans les cellules, évitant un emballement de la prolifération cellulaire et l'augmentation significative de leur nombre total. L'expression d'autres cyclines impliquées dans la transition G1/S du cycle cellulaire pourrait être investiguée par qPCR.

La régulation du cycle cellulaire des cellules germinales est essentielle dans le testicule embryonnaire. Il a ainsi été montré qu'un défaut de ce mécanisme peut conduire à une surprolifération et le développement de TGCT (tératomes) chez la souris (Heaney et al., 2012; Bustamante-Marín et al., 2013). L'altération de l'expression de CDKN1B a été observée dans le développement tumoral dans plusieurs tissus chez la souris et chez l'homme (pour revue : Sgambato et al., 2000; Belletti et al., 2005). Chez l'homme, une diminution de l'expression de CDKN1B a été observée dans certains types de TGCT (Hennenlotter et al., 2011; Miyai et

al., 2012). L'altération de l'expression de CDKN1B dans les testicules embryonnaires murins à E15.5 après une exposition maternelle à un mélange de CBD et de THC pourrait de façon hypothétique rendre les cellules germinales susceptibles à une transformation tumorale. Il serait intéressant de voir si cet effet du traitement CBD/THC sur les gonocytes murins à E15.5 est temporaire. L'effet de ce traitement gestationnel sur les spermatogonies indifférenciées dans le testicule post-natal est en cours d'évaluation dans notre équipe.

Il est important de garder à l'esprit que les qPCR sont réalisés sur des tissus entiers. Une étude a récemment rapporté que le traitement de cellules de Sertoli murines adultes avec 10 μ M de CBD entraîne une diminution de leur prolifération, associée avec un blocage de la transition G1/S du cycle cellulaire et une diminution de l'expression de plusieurs cyclines, dont CCND3 (Li et al., 2022). La modification de l'expression de CCND3 et CDKN1B pourrait également concerner les cellules de Sertoli. La prolifération et la viabilité de ces cellules seront donc prochainement investiguées.

Enfin, chez la souris, l'entrée en quiescence des gonocytes est simultanée avec une perte progressive de leur caractère pluripotent. Nous avons donc étudié par qPCR l'expression de deux gènes spécifiques des gonocytes, impliqués dans le maintien de l'état indifférencié des cellules germinales, NANOS3 et POU5F1. POU5F1 est exprimé dans les PGC, les gonocytes puis dans les pro-spermatogonies au cours du développement (Pesce et al., 1998), dans lesquelles il jouerait un rôle dans leur survie (Kehler et al., 2004). POU5F1 est également exprimé dans les spermatogonies indifférenciées chez l'adulte (Filipponi et al., 2007) dans lesquelles il serait impliqué dans le maintien du caractère germinal et de l'état indifférencié (Dann et al., 2008; Zheng et al., 2016). Dans le testicule embryonnaire, NANOS3 est un gène impliqué dans la survie des PGC (Tsuda et al., 2003; Suzuki et al., 2008). Son expression diminue à partir de E14.5 puis ré-apparaît après la naissance dans les spermatogonies indifférenciées (Lolicato et al., 2008) où il jouerait un rôle dans le maintien de l'état indifférencié des spermatogonies (Inoue et al., 2022). L'expression de ces gènes n'est pas affectée dans les testicules embryonnaires à E15.5 exposés à un mélange de CBD et de THC au cours de la gestation. En revanche, dans les testicules embryonnaires à E13.5 exposés à un mélange de CBD et de THC au cours de la gestation, l'expression de POU5F1 est significativement diminuée par rapport à la condition contrôle, et celle de NANOS3 est diminuée de façon très proche de la significativité. La diminution de l'expression de POU5F1,

et de NANOS3 dans une moindre mesure, dans les gonocytes murins à E13.5 suggère une altération de l'état indifférencié et de la survie des gonocytes. Le nombre total de gonocytes à E13.5 n'étant pas significativement différent par rapport à la condition contrôle, et l'expression de ces gènes n'étant pas altérée à E15.5, cet effet semble être temporaire.

En conclusion, notre étude a montré que l'exposition maternelle de souris gestantes avec un mélange de CBD et de THC à une dose de 5 mg/kg par jour de E5.5 à E13.5 ou E15.5 entraîne des perturbations de la physiologie des cellules germinales. Contrairement à d'autres études chez la souris gestante, la dose employée dans cette étude peut refléter une exposition humaine thérapeutique à du CBD et du THC.

La description complète de l'expression du système des ECB, en particulier des récepteurs CB1 et CB2 dans les testicules embryonnaires à E13.5 et E15.5, nous permettra de formuler des hypothèses mécanistiques de l'action du CBD et du THC sur les gonocytes aux différents âges embryonnaires.

Le modèle murin nous permet de prendre compte un grand nombre de paramètres physiologiques tel que le passage materno-fœtal des phytocannabinoïdes, leur potentielle métabolisation par différents tissus avant d'arriver au testicule fœtal, ainsi que leurs effets possibles au niveau central des embryons. En revanche, des différences entre la physiologie de l'organisme murin et humain ne peuvent être exclues, rendant compliqué de transposer nos résultats à l'humain.

D) Perspectives

Nos résultats montrent ici un impact du traitement CBD et THC sur les cellules germinales embryonnaires pouvant altérer la mise en place de la spermatogenèse. L'autre fonction primordiale du testicule qui se met également en place au cours du développement est la stéroïdogénèse. Des études chez le rongeur ont mis en évidence qu'une exposition au CBD ou au THC au cours de la gestation peut altérer les sécrétions hormonales de l'axe HHT (Dalterio and Bartke, 1981; Dalterio et al., 1984b; Dalterio and deRoos, 1986a; Murphy et al.,

1995). Comme il a été fait dans ces études, le dosage de testostérone et de LH pourrait être effectué sur des embryons entiers à E13.5 et E15.5, dont les mères ont été exposées au mélange de CBD et de THC, nous donnant une information de l'impact du traitement sur la synthèse de ces hormones. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de notre traitement sur l'expression des récepteurs à la GnRH au niveau central de l'embryon, et il est prévu d'étudier l'expression du récepteur à la LH dans le testicule embryonnaire. Nos premiers résultats indiquent une diminution de l'expression du récepteur à la LH dans le testicule embryonnaire à E13.5 après une exposition maternelle à 5mg/kg par jour d'un mélange de CBD et de THC de E6.5 à E13.5 (données non publiées). L'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse dans le testicule embryonnaire pourra également être investiguée par qPCR.

Afin de caractériser les impacts d'une exposition au CBD et au THC au cours du développement sur l'individu à long terme, les effets de ce traitement gestationnel à différents âges post-natals sont en cours d'analyse dans notre équipe. L'établissement et la progression des premières vagues de spermatogénèse, ainsi que la fertilité à l'âge adulte et chez la souris plus âgées seront étudiés.

Conclusion générale

La consommation mondiale de cannabis est en hausse ces 10 dernières années (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022). Cette observation est établie dès 2007, avant l'implémentation de sa légalisation dans les pays concernés. Cependant, le changement du statut légal du cannabis récréationnel et thérapeutique notamment au Canada et aux USA, pourrait être en partie responsable de cette augmentation en raison d'une perception amoindrie des risques accrue de la disponibilité du produit (Martins et al., 2016; Smart and Pacula, 2019; Hall and Lynskey, 2020; Fischer et al., 2021; Chiu et al., 2021).

Si l'écart entre les consommateurs de sexe masculin et féminin reste relativement élevé (15,2% d'usagers dans l'année contre 7,5% d'usagères dans l'année en 2020, OFDT Drogues et addictions, Chiffres clés, 2022), une augmentation du nombre des femmes consommatrices a été observée en France (OFDT Drogues et addictions, Chiffres clés, 2022) et dans le monde (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022). De façon alarmante, une augmentation de la prévalence de femmes consommatrices de cannabis pendant la grossesse a été observée dans le monde ces 20 dernières années (Brown et al., 2017; Young-Wolff et al., 2017; Alshaarawy and Anthony, 2019; United Nations Office on Drugs and Crime, 2022). Au Canada et dans certains états des USA, une corrélation a été établie entre la légalisation de la consommation de cannabis et une augmentation de la prévalence de femmes consommatrices pendant la grossesse (Skelton et al., 2020, 2021; Bayrampour and Asim, 2021), en partie due à une diminution de la perception des risques.

La consommation de cannabis ayant été corrélée avec l'augmentation de l'incidence des tumeurs testiculaires des cellules germinales (TGCT) chez l'homme, la compréhension des effets d'une exposition au cannabis sur le testicule adulte mais aussi lors du développement des cellules germinales au cours de la vie fœtale, est nécessaire. Dans ce contexte, notre étude a visé à décrire les effets des deux composants majoritaires du cannabis, le $\Delta 9$ -THC et le CBD, sur la physiologie testiculaire adulte et fœtale. L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit présente les effets d'une exposition au $\Delta 9$ -THC et au CBD et ne peut rendre compte des effets potentiels d'autres composés du cannabis tels que les terpènes.

L'étude *in vivo* de l'effet du cannabis sur le testicule humain adulte et fœtal étant impossible, des modèles humains *in vitro* et *ex vivo* et des modèles animaux *in vivo* sont nécessaires pour permettre l'étude des nombreux mécanismes en jeu (Jorgensen et al., 2021).

Nous avons en premier lieu analysé l'impact du $\Delta 9$ -THC et du CBD sur le testicule humain adulte et fœtal *ex vivo*. Nous avons montré l'absence apparente d'effets directs d'une exposition de 48 heures et de 9 jours à du $\Delta 9$ -THC et/ou du CBD sur la physiologie du testicule adulte humain. En revanche, l'exposition au $\Delta 9$ -THC et/au CBD du testicule fœtal humain entraîne, dès 72 heures de culture, des modifications de l'apoptose et de la prolifération cellulaire ainsi que la perturbation de sécrétions hormonales indispensables à la différenciation des cellules testiculaires et des tissus impliqués dans la fonction reproductive. Nos résultats indiquent également que ces effets peuvent être exacerbés après 14 jours de culture. Ces observations laissent présager d'altérations ultérieures de la mise en place de la fonction reproductive *in vivo*, pouvant entraîner des pathologies plus ou moins sévères chez l'individu.

De façon complémentaire à ces études où le tissu testiculaire est exposé de façon direct au $\Delta 9$ -THC et au CBD, nous avons conduit une étude *in vivo* chez la souris afin de prendre en compte un ensemble de paramètres tel que le passage placentaire, la métabolisation des phytocannabinoïdes avant d'atteindre le testicule et les potentiels effets au niveau central. Nos résultats ont mis en évidence le passage placentaire du $\Delta 9$ -THC et du CBD après une exposition maternelle, ainsi que des effets de ce traitement au niveau de la physiologie des gonocytes murins. Les conséquences de ce traitement gestationnel sur les individus adultes après la naissance sont en cours d'investigation dans l'équipe.

Nous avons étudié l'effet direct du $\Delta 9$ -THC et CBD sur le testicule fœtal humain de la fin de premier trimestre. Lors de notre étude *in vivo*, nous avons investigué l'impact d'une exposition maternelle sur le testicule embryonnaire jusqu'à plus des deux tiers de la gestation chez la souris. Lors de ces deux études, nous avons observé des effets apparemment opposés sur les gonocytes. L'exposition au $\Delta 9$ -THC et au CBD a eu un effet néfaste sur la prolifération et la viabilité des cellules dans le testicule fœtal humain tandis que cette exposition a entraîné une augmentation de la prolifération des gonocytes dans le testicule embryonnaire murin. La voie d'exposition et la période d'exposition du testicule au cours du développement étant différente entre nos deux études, la comparaison entre les résultats obtenus sur le testicule humain et murin lors de ces études est ardue. C'est l'accumulation de données d'études utilisant des modèles complémentaires, présentant

chacun leurs avantages et leurs inconvénients, qui permet d'évaluer les effets d'une exposition *in vivo* au Δ^9 -THC et au CBD sur le testicule fœtal humain lors de la gestation.

Annexes

Liste des réalisations au cours de la thèse

Articles scientifiques

- **The exposure of human adult testis tissue to cannabinoids THC and CBD does not impact testosterone production**, Janaina Da Silva, Juliette Dochez-Arnault, Christèle Desdoits-Lethimonier, Nathalie Dejuçq-Rainsford and Aurore Gely-Pernot. *Soumis dans The Word Journal of Men's Health en septembre 2022.*
- **Exposure of embryonic human testis tissue to cannabinoids THC and CBD impact biological processes required for germ cell differentiation during development**, J. Dochez-Arnault, C. Desdoits-Lethimonier, I. Matias , M. Lagarrigue-Reboutier, F. Chalmel, B. Evrard, A. Lardenois, C. Lindskog Bergström, S. Mazaud-Guittot, N. Dejuçq-Rainsford, and A. Gely-Pernot. *En cours de preparation.*

Communications

- **The two main components of cannabis, thc and cbd, constitute endocrine disruptors for embryonic human testis**, Juliette Dochez-Arnault, Christèle Desdoits-Lethiminier, Séverine Mazaud-Guittot, Nathalie Dejuçq-Rainsford and Gely-Pernot Aurore. *European Testis Workshop, 30 Mai au 3 Juin 2021, en distanciel. Poster et présentation flash de 3 minutes.*
- **The two main components of cannabis, thc and cbd, consitute endocrine disruptors for embryonic human testis**, Juliette Dochez-Arnault, Christèle Desdoits-Lethiminier, Frédéric Chalmel, Séverine Mazaud-Guittot, Nathalie Dejuçq-Rainsford and Gely-Pernot Aurore. *Rencontres scientifiques du Réseau Doctoral en Santé Publique, 10 et 11 Juin 2021 à Rennes. Poster*

THE TWO MAIN COMPONENTS OF CANNABIS, THC AND CBD, CONSTITUTE ENDOCRINE DISRUPTORS FOR EMBRYONIC HUMAN TESTIS



Juliette Dochez-Arnaud¹, Christèle Desdoits-Lethimier¹, Séverine Mazaud-Guittot¹, Nathalie Dejuq-Rainsford^{1#} and Gely-Pernot Aurore^{1#}



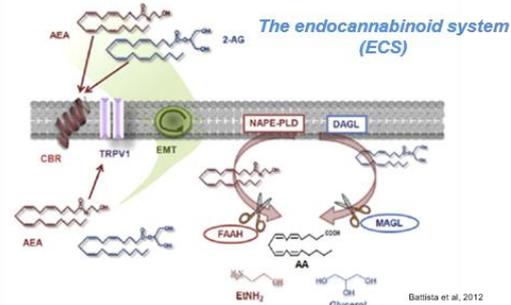
¹Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S1085, F-35000 Rennes, France. #Co-last authors
Corresponding author: aurore.gely-pernot@ehesp.fr; Presenting Author.

INTRODUCTION

Cannabis is the most widely cultivated, produced, trafficked and consumed drug worldwide. Recently, a meta-analysis highlighted an association between cannabis consumption and testicular germ cell tumors (TGCTs) development, **suggesting that recreational and therapeutic uses of cannabinoids (CA) may represent a risk factor for the development of testis cancer in human** (Gurney et al., 2015). The main components of cannabis, the Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) and the cannabidiol (CBD), also the most cannabinoids used in therapy, are the ligands of an endocannabinoid system (ECS) involved in reproductive functions at the central and gonadal levels. This system, well described in human adult testis (Nielsen JE, 2019), is not studied yet during the development of foetal male gonads. **In this study, we initiated the characterisation of the expression of the ECS in the embryonic human testis and we examined the effect of THC and/or CBD on the human embryonic testicular physiology using an organotypic culture model.**

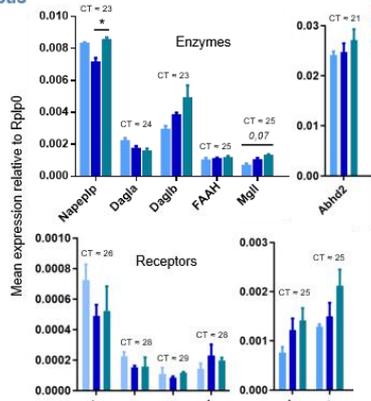
METHODOLOGIES

- ✓ Model: embryonic organotypic culture of testis, Human Fetal Gonad Assay (hFEGA), were testis are cut into explants of less than 1mm³.
- ✓ Organotypic cultures were treated with control, CBD, THC or CBD+THC at an equimolar ratio (ratio1:1) from 10⁻⁸ to 10⁻⁵ M for 72 hours.
- ✓ The effects of treatments were evaluated by histology, by measuring the level of secreted testosterone and AMH in the media, and by checking cellular parameters such as cell death, proliferation.



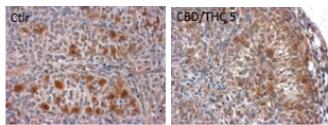
RESULTS

- ✓ Endocannabinoid system is expressed in embryonic human testis



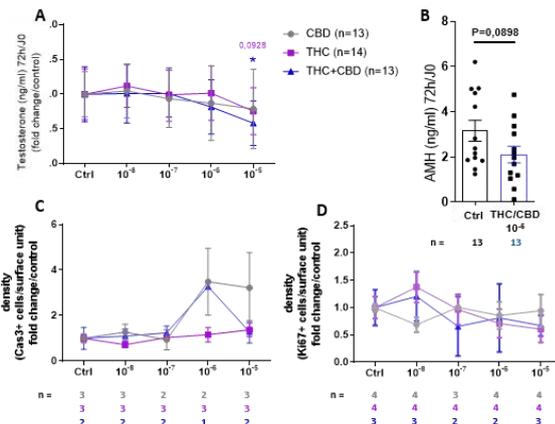
▼ **Figure 1.** Expression of the endocannabinoids system in the human fetal testis. Expression profiles of transcripts coding for enzymes (upper panels) and receptors (lower panels) including different isoforms of CB1 receptor. Quantitative PCR (qPCR) experiments were performed on cDNA from whole human fetal testis at < 10 of amenorrhea weeks (AW) (n=3) , 10-12 AW (n=3) and 12-14 AW (n=3). Data are presented as mean expression (relative to Rplp0) ± SEM (*p<0.05). Cycle thresholds (CT) are indicated above each gene.

- ✓ Exposure of human foetal testis explants to cannabinoids did not affect the morphology of the tissue



▼ **Figure 2.** A treatment with 10⁻⁵M of CBD+THC did not affect the morphology and the testis organization of the human fetal testis. Immunostaining of Lin28, a germ cell marker on human fetal testis explants sections.

- ✓ Exposure of human foetal testis explants to cannabinoids at 12-14 amenorrhea weeks did not affect proliferation and apoptosis of intracordonal cells but is associated with a decrease of testosterone secretion



▼ **Figure 3.** Effects of CBD and/or THC on testosterone and AMH secretion and on apoptosis and proliferation in human fetal testis explants at 12-14 AW. (A) Testosterone and (B) AMH concentration in the medium of human embryonic testis explants organotypic culture after 72h of exposure to Control (Ctrl), CBD, THC or CBD/THC (ratio 1:1). In A, results are expressed as fold change from the untreated first day of culture (72h/0) followed by a normalization with the mean of controls for each treatment (fold change/control). Data are presented as mean ± SEM (*p<0.05). (C) Effects of a CBD and/or THC treatment on apoptosis and cell proliferation. Density results are calculated after immunostaining of human fetal testis explants sections with cleaved Caspase-3 (Cas3) and Ki67, an apoptosis and proliferation marker respectively. Data are presented as the number of positive stained cells per surface area unit (mean ± SEM) Results are expressed as normalized density with the mean of controls for each treatment (fold change/control).

DISCUSSION

Our results shown that ECS is expressed in the human embryonic testis. To complete this analysis, single cell and bulk RNA-seq data from our lab will provide more information. Exposure to a mixture of CBD and THC, caused a significant decrease of the testosterone production by human fetal testis explants without, for now, significantly affecting morphology, AMH secretion, apoptosis and cell proliferation in this tissue. In this context, we suggest that the ECS may be involved in the foetal human testicular differentiation and that phytocannabinoids exposure can disrupt that process. The endocrine disrupting effect observed could lead to disorders of the developing testis during embryonic life and might constitute a risk factor for TGCTs. Studies on younger human foetal testis explants are in progress as well as experiments on embryonic mice that will allow us to discriminate the gonadic and central effects of phytocannabinoids.

ACKNOWLEDGEMENTS The authors would like to thank the University Rennes 1 and Inserm for financial support.

Annexe 1 : Poster présenté au European Testis Workshop 2021

- **The two main components of cannabis, thc and cbd, constitute endocrine disruptors for embryonic human testis**, [Juliette Dochez-Arnault](#), Christèle Desdoits-Lethiminier, Frédéric Chalmel, Séverine Mazaud-Guittot, Nathalie Dejuçq-Rainsford and Gely-Pernot Aurore. Congrès *EUROTOX*, 27 Septembre au 1 Octobre 2021, en distanciel. *Poster*.
- **Evaluation of the impact of cannabinoids used for recreational or therapeutic purposes on the male germ cell differentiation during development**, Juliette Dochez-Arnault, Janaina Da Silva, Christèle Desdoits-Lethimonier, Séverine Mazaud-Guittot, Pierre-Yves Kervarrec, Nathalie Dejuçq-Rainsford and Aurore Gely-Pernot. *Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale Biologie Santé*, 9 et 10 Décembre 2021, Brest. *Presentation orale de 15 minutes*.

Autres

- **Organisation d'un Séminaire InterDisciplinaire (SID)** en santé publique avec des doctorants du Réseau Doctoral en Santé Publique de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé publique. Organisation d'un webinaire et production d'un rapport scientifique et logistique sur le thème « Changement climatique et santé des populations, les enjeux de la mobilisation citoyenne »
- **Membre du club de doctorants et post-doctorants de l'Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail** – 2019 à 2021. Organisation de la journée « Printemps de la recherche » à l'IRSET, le 11 mai 2021 : présentations des sujets de recherche des doctorants de l'IRSET et présentations d'intervenants extérieurs sur le thème « Plan de gestion des données en recherche »
- **Co-encadrement de stagiaires** françaises en 3^{ème} année de licence (2021) et de stagiaires irlandais niveau 3^{ème} année de licence (2022).



WEBINAIRE

CHANGEMENT CLIMATIQUE ET SANTE DES POPULATIONS, LES ENJEUX DE LA MOBILISATION CITOYENNE



18 JANVIER 2021
09h00 - 12h30

Organisé par les doctorants du Réseau Doctoral en Santé Publique :

Yara Carrejo – Ecole doctorale : Biologie Santé

Juliette Dochez-Arnault – Ecole doctorale : Biologie Santé

Marick Fèvre – Ecole doctorale : Société, temps, territoire

Gaëtan Pavard – Ecole doctorale : Biologie Santé

Israa Salma – Ecole doctorale : Sciences économiques et sciences de la gestion

Sommaire



Sylvie Ollitrault - Politiste, directrice de la Recherche - EHESP

Méleonn Gautier – Etudiante en Master 2 Journalisme à Sciences Po Rennes

Mathilde Pascal - Epidémiologiste, Santé Publique France

Emilie Gaillard - Juriste, Sciences Po Rennes, Coordinatrice générale de la Chaire Normandie pour la paix

Loïc Blondiaux - Politiste, Université Paris 1-Panthéon-Sorbonne

Valérie Masson Delmotte - Paléoclimatologue, Université Paris Saclay

Estelle Baurès - Physique- Chimie analytique, Santé Environnement, EHESP / **Cyrille Harpet** - Philosophe des sciences, anthropologie sociale, EHESP

Annexe 2 : Diapositives présentées lors du séminaire interdisciplinaire organisé avec les doctorants membre du Réseau doctoral en santé publique

Listes des formations suivies au cours de la thèse

- 100h de formation de l'école doctorale Biologie Santé de l'Université de Rennes 1
- Formations dans les différents parcours de santé publique de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique

Plan individuel de formation : RECAPITULATIF DES FORMATIONS SUIVIES						Juliette Dochez-Arnault	
Titre de la formation	Organisme organisateur	Lieu	Date	Volume horaire			
Formations scientifiques							
Introduction aux biostatistiques	Ecole doctorale Biologie-Santé	Rennes	02 mars et 11 mars 2020	5			
Introduction à la métabolomique	Ecole doctorale Biologie-Santé	LABERCA, Nantes	10 mars 2020	7			
Introduction à l'éthique	Ecole doctorale Biologie-Santé	Rennes	Juillet 2020	3			
Ethique de la recherche et intégrité scientifique dans les données	Ecole doctorale Biologie-Santé	Rennes	12 mars 2021	3			
Formation à l'expérimentation animale de niveau 1	Ecole doctorale Biologie-Santé	ONIRIS, Nantes	25 septembre au 02 octobre 2020	25			
ComTech Bien être animal	AFSTAL	Distanciel	18 mars	3,5			
Formations professionnelles							
Signer un contrat d'édition	URFIST	Distanciel	19 janvier 2021	4			
Etudier, comprendre et identifier les fake news	URFIST	Distanciel	9 mars 2021	3			
Approfondissement de Zotero	URFIST	Distanciel	12 mars 2021	3,5			
Atouts des réseaux sociaux en recherche	URFIST	Distanciel	15 mars 2021	4			
Introduction au management des organisations	Ecole doctorale Biologie-Santé	Distanciel	17 mars, 24 mars et 31 mars 2021	18			
Rédiger et publier un data paper	URFIST	Distanciel	25 mars 2021	3			
Rédiger un plan de gestion de données	URFIST	Distanciel	07 avril 2021	2			
A la découverte de R	URFSIT	Distanciel	07 mai 2021	2			
Accès à la littérature scientifique	URFIST	Distanciel	17 mai 2021	1,5			
Etre reconnu comme jeune chercheur	URFSIT	Distanciel	19 mai 2021	4			
Publier dans les revues scientifiques	URFIST	Distanciel	27 mai 2021	3			
Bien débiter avec R et Rstudio	URFIST	Distanciel	07 Juin 2021	6			
Les réseaux sociaux et la recherche	URFIST	Distanciel	14 Juin 2021	3			
Les fondamentaux du management et de la communication	Ecole doctorale Biologie-Santé	Rennes	21 et 22 avril 2022	12			
L'entretien de recrutement	Ecole doctorale Biologie-Santé	Rennes	16 et 24 juin 2022	4,4			
Evènements scientifiques							
Printemps de la recherche	IRSET	Rennes	11 mai 2021	15			
Journées scientifiques 2022	Ecole doctorale Biologie-Santé	Brest	10 décembre 2021	5			

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des formations suivies au cours du doctorat de l'école doctorale Biologie-Santé de l'Université de Rennes 1

SUIVI DES CREDITS DE FORMATION							
NOM : DOCHEZ-ARNAULT							
Prénom : Juliette							
1ère année d'inscription : 2019/2020							
Parcours : Santé, Environnement et Travail							
Ecole doctorale : ED BS							
Sujet de thèse : Évaluation de l'impact de cannabinoïdes utilisés à des fins récréationnelles ou thérapeutiques sur le tractus génital mâle							
Type de formation		Catalogue	Titre et date	Crédits prévisionnels	Attestation (colonne complétée par le Réseau)	Crédits validés (colonne complétée par le Réseau)	Commentaires
Formation SP	Parcours	Hors catalogue Equivalence (uniquement 3è cycle)					
12 crédits à valider en dehors du parcours de thèse							
FSP 1	Epidémiologie et biostatistiques	Catalogue	Introduction à l'épidémiologie en santé publique et à l'analyse de données quantitatives 9 et 10/04/20	4,5	oui	1,5	
		Catalogue	Introduction to R: computing, graphics for statistics and epidemiology (MPH 215) 2 au 6/11/20		oui	3	
FSP 2	Droit et politiques de santé	catalogue	Introduction à l'analyse des politiques publiques 17 et 18/02/20	1,5	oui	1,5	
FSP 3	Sciences Humaines et Sociales, Sciences du Comportement	catalogue	Introduction aux méthodes qualitatives 19 au 22/04/21	2,5	oui	2,5	4 jours de formation
FSP 4	Sciences de données et modélisation	catalogue	Modeling of infectious diseases (MPH 229) 14 au 18/12/20	3	oui	3	
FSP 5	Economie et Management en santé	catalogue	La recherche clinique et l'innovation à l'hôpital 24 au 26/11/21	2	oui	2	3 jours = 2 crédits
Séminaire de rentrée			27 au 29/01/20	2	oui	2	développer ses compétences pour construire son projet de thèse et son projet professionnel dans le champ de la recherche en santé publique
SID organisateur			18/01/2021	7	oui	7	Changement climatique et santé des populations, les enjeux de la mobilisation citoyenne : l'expérience de la Convention citoyenne pour le climat
SID auditeur	dans la limite de 3 crédits (1 crédit obligatoire & 2 suivants en activités aux choix)		04/03/2021	1	oui	1	La place du professionnel de santé au sein des violences conjugales
Rencontres 1			3 et 4/03/20	1	oui	1	Auditeur - Lieu : Marseille
Rencontres 2			10 et 11/06/21	1	oui	1	Lieu : Rennes
NID (note interdisciplinaire)				3	à venir		à rédiger en 3ème année
Activités diverses au choix complémentaires dans la limite de 3 crédits : environnementale							
			Toxicologie : utilisations en santé publique 8 au 10/02/21		oui	2	Formation dans le parcours de thèse 3 jours = 2 crédits
	- 3è participation aux Rencontres Scientifiques		Séminaires du mardi	3	oui	1	10 participations au séminaire du mardi = 1 crédit
	- Participation à un SID en qualité d'auditeur (1 crédit par SID supplémentaire dans la limite de 2)						10 participations au 7/12/21
	- Mandat dans les instances de l'EHESP ou du RDSP						
	- Formations professionnalisantes ou dans le parcours du doctorant		17 et 18/03/22		oui	0	3ème participation aux Rencontres Scientifiques
	- Participation aux séminaires du mardi (10 participations = 1 crédit)						
TOTAL				31,5		27,5	

Annexe 4 : Tableau récapitulatif des formations suivies au cours du doctorat de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique

Références bibliographiques

- A A Ugboma, H., L Aburoma, H., Ukaigwe, P., 2012. Adolescent Cannabis Use - a Young Adult and Middle Age Urologic and Reproductive Dilemma: The Niger Delta Malady. *AJMMS* 2, 18–21. <https://doi.org/10.5923/j.ajmms.20120202.05>
- Abán, C., Leguizamón, G.F., Cella, M., Damiano, A., Franchi, A.M., Farina, M.G., 2013. Differential expression of endocannabinoid system in normal and preeclamptic placentas: Effects on nitric oxide synthesis. *Placenta* 34, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.10.009>
- Abel, E.L., 1981. Marihuana and sex: A critical survey. *Drug and Alcohol Dependence* 8, 1–22. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(81\)90082-X](https://doi.org/10.1016/0376-8716(81)90082-X)
- Abel, E.L., Dintcheff, B.A., Day, N., 1980. Effects of marihuana on pregnant rats and their offspring. *Psychopharmacology* 71, 71–74. <https://doi.org/10.1007/BF00433255>
- Abrams, D.I., Vizoso, H.P., Shade, S.B., Jay, C., Kelly, M.E., Benowitz, N.L., 2007. Vaporization as a Smokeless Cannabis Delivery System: A Pilot Study. *Clin Pharmacol Ther* 82, 572–578. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100200>
- Abrams, R.M., Cook, C.E., Davis, K.H., Niederreither, K., Jaeger, M.J., Szeto, H.H., 1985. Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol in pregnant sheep and fetus after inhalation of smoke from a marijuana cigarette. *Alcohol Drug Res* 6, 361–369.
- Abuhasira, R., Shbiro, L., Landschaft, Y., 2018. Medical use of cannabis and cannabinoids containing products – Regulations in Europe and North America. *European Journal of Internal Medicine* 49, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.01.001>
- Accialini, P., Etcheverry, T., Malbrán, M.N., Leguizamón, G., Maté, S., Farina, M., 2020. Anandamide regulates oxytocin/oxytocin receptor system in human placenta at term. *Placenta* 93, 23–25. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.02.012>
- Adamo, C., Antignac, J.-P., Auger, J., Balaguer, P., Bourc'his, D., Bujan, L., Chevrier, C., Cotinot, C., Cravedi, J.-P., Laudet, V., Livera, G., Slama, R., 2011. Reproduction et environnement [Rapport de recherche] Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM).
- Adams, I.R., McLaren, A., 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129, 1155–1164. <https://doi.org/10.1242/dev.129.5.1155>
- Ademi, H., Djari, C., Mayère, C., Neirijnck, Y., Sararols, P., Rands, C.M., Stévant, I., Conne, B., Nef, S., 2022. Deciphering the origins and fates of steroidogenic lineages in the mouse testis. *Cell Reports* 39, 110935. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110935>
- Agirregoitia, E., Carracedo, A., Subirán, N., Valdivia, A., Agirregoitia, N., Peralta, L., Velasco, G., Irazusta, J., 2010. The CB2 cannabinoid receptor regulates human sperm cell motility. *Fertility and Sterility* 93, 1378–1387. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.153>
- Agurell, S., Carlsson, S., Lindgren, J.E., Ohlsson, A., Gillespie, H., Hollister, L., 1981. Interactions of Δ 11-tetrahydrocannabinol with cannabinol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabinol and cannabidiol by mass fragmentography with cannabinol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabinol and cannabidiol by mass fragmentography. *Experientia* 37, 1090–1092. <https://doi.org/10.1007/BF02085029>
- Agurell, S., Halldin, M., Lindgren, J.E., Ohlsson, A., Widman, M., Gillespie, H., Hollister, L., 1986. Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev* 38, 21–43.

- Akingbemi, B.T., 2005. Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 51. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-51>
- Akre, O., Richiardi, L., 2009. Does a testicular dysgenesis syndrome exist? *Human Reproduction* 24, 2053–2060. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep174>
- Aks glaede, L., Sørensen, K., Boas, M., Mouritsen, A., Hagen, C.P., Jensen, R.B., Petersen, J.H., Linneberg, A., Andersson, A.-M., Main, K.M., Skakke bæk, N.E., Juul, A., 2010. Changes in Anti-Müllerian Hormone (AMH) throughout the Life Span: A Population-Based Study of 1027 Healthy Males from Birth (Cord Blood) to the Age of 69 Years. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95, 5357–5364. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1207>
- Alagaratnam, S., Lind, G.E., Kraggerud, S.M., Lothe, R.A., Skotheim, R.I., 2011. The testicular germ cell tumour transcriptome: The TGCT transcriptome. *International Journal of Andrology* 34, e133–e151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01169.x>
- Alagboni, I.A., Olayaki, L.A., Salman, T.M., 2016. Melatonin and vitamin C exacerbate *Cannabis sativa*-induced testicular damage when administered separately but ameliorate it when combined in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 27. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0061>
- Al-Attar, L., Noël, K., Dutertre, M., Belville, C., Forest, M.G., Burgoyne, P.S., Josso, N., Rey, R., 1997. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J. Clin. Invest.* 100, 1335–1343. <https://doi.org/10.1172/JCI119653>
- Albalushi, H., Sahlin, L., Åkesson, E., Kurek, M., Kjartansdóttir, K.R., Lindh, R., Söder, O., Rotstein, E., Hovatta, O., Stukenborg, J.-B., 2019. Hormone Production by Human First-Trimester Gonads in a Functional In Vitro System. *Endocrinology* 160, 133–142. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00734>
- Albers, P., Orazi, A., Ulbright, T.M., Miller, G.A., Haidar, J.H., Donohue, J.P., Foster, R.S., 1995. Prognostic significance of immunohistochemical proliferation markers (Ki-67/MIB-1 and proliferation-associated nuclear antigen), p53 protein accumulation, and neovascularization in clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Mod Pathol* 8, 492–497.
- Albert, O., Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Legrand, A., Guillé, F., Bensalah, K., Dejuq-Rainsford, N., Jégou, B., 2013. Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Hum Reprod* 28, 1890–1898. <https://doi.org/10.1093/humrep/det112>
- Albrecht, K.H., Eicher, E.M., 2001. Evidence That Sry Is Expressed in Pre-Sertoli Cells and Sertoli and Granulosa Cells Have a Common Precursor. *Developmental Biology* 240, 92–107. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0438>
- Aldahhan, R.A., Stanton, P.G., 2021. Heat stress response of somatic cells in the testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 527, 111216. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111216>
- Alghobary, M., Mostafa, T., 2022a. Addiction and human male fertility: A systematic review and a critical appraisal. *Andrology* 10, 1073–1095. <https://doi.org/10.1111/andr.13196>
- Alghobary, M., Mostafa, T., 2022b. Addiction and human male fertility: A systematic review and a critical appraisal. *Andrology* 10, 1073–1095. <https://doi.org/10.1111/andr.13196>

- Almstrup, K., Nielsen, J.E., Mlynarska, O., Jansen, M.T., Jørgensen, A., Skakkebæk, N.E., Rajpert-De Meyts, E., 2010. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Br J Cancer* 103, 1269–1276. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605880>
- Alshaarawy, O., Anthony, J.C., 2019. Cannabis use among women of reproductive age in the United States: 2002–2017. *Addictive Behaviors* 99, 106082. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2019.106082>
- Alves, P., Amaral, C., Teixeira, N., Correia-da-Silva, G., 2020. Cannabis sativa: Much more beyond Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Pharmacological Research* 157, 104822. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104822>
- Amann, R.P., 2008. The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit? *Journal of Andrology* 29, 469–487. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004655>
- Amin, M.R., Ali, D.W., 2019. Pharmacology of Medical Cannabis, in: Bukiya, A.N. (Ed.), *Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 151–165. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_8
- Amoako, A.A., Marczylo, T.H., Marczylo, E.L., Elson, J., Willets, J.M., Taylor, A.H., Konje, J.C., 2013. Anandamide modulates human sperm motility: implications for men with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. *Human Reproduction* 28, 2058–2066. <https://doi.org/10.1093/humrep/det232>
- Anand, U., Otto, W.R., Sanchez-Herrera, D., Facer, P., Yiangou, Y., Korchev, Y., Birch, R., Benham, C., Bountra, C., Chessell, I.P., Anand, P., 2008. Cannabinoid receptor CB2 localisation and agonist-mediated inhibition of capsaicin responses in human sensory neurons. *Pain* 138, 667–680. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.06.007>
- Anand-Ivell, R., Ivell, R., Driscoll, D., Manson, J., 2008. Insulin-like factor 3 levels in amniotic fluid of human male fetuses. *Human Reproduction* 23, 1180–1186. <https://doi.org/10.1093/humrep/den038>
- Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M.M., Page, D.C., 2008. *Stra8* and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14976–14980. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807297105>
- Anderson, R., Cambray, N., Hartley, P., McNeilly, A., 2002. Expression and localization of inhibin alpha, inhibin/activin betaA and betaB and the activin type II and inhibin beta-glycan receptors in the developing human testis. *Reproduction* 779–788. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230779>
- Andersson, A.-M., Toppari, J., Haavisto, A.-M., Petersen, J.H., Simell, T., Simell, O., Skakkebæk, N.E., 1998. Longitudinal Reproductive Hormone Profiles in Infants: Peak of Inhibin B Levels in Infant Boys Exceeds Levels in Adult Men1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83, 675–681. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.2.4603>
- Andreassen, C.H., Lorenzen, M., Nielsen, J.E., Kafai Yahyavi, S., Toft, B.G., Ingerslev, L.R., Clemmensen, C., Rasmussen, L.J., Bokemeyer, C., Juul, A., Jørgensen, A., Blomberg Jensen, M., 2022. RANKL regulates testicular cancer growth and Denosumab treatment has suppressive effects on GCNIS and advanced seminoma. *Br J Cancer* 127, 408–421. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01810-w>
- Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C., Føgh, J., 1984. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human

- teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest* 50, 147–162.
- Androvicova, R., Horacek, J., Tintera, J., Hlinka, J., Rydlo, J., Jezova, D., Balikova, M., Hlozek, T., Miksatkova, P., Kuchar, M., Roman, M., Tomicek, P., Tyls, F., Viktorinova, M., Palenicek, T., 2017. Individual prolactin reactivity modulates response of nucleus accumbens to erotic stimuli during acute cannabis intoxication: an fMRI pilot study. *Psychopharmacology* 234, 1933–1943. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4601-1>
- Aquila, S., Guido, C., Laezza, C., Santoro, A., Pezzi, V., Panza, S., Andò, S., Bifulco, M., 2009. A new role of anandamide in human sperm: Focus on metabolism. *J. Cell. Physiol.* 221, 147–153. <https://doi.org/10.1002/jcp.21837>
- Aquila, S., Guido, C., Santoro, A., Gazzo, P., Laezza, C., Baffa, M., Andò, S., Bifulco, M., 2010. Rimonabant (SR141716) induces metabolism and acquisition of fertilizing ability in human sperm: CB1 receptor blockade in human sperm. *British Journal of Pharmacology* 159, 831–841. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00570.x>
- Arango, N.A., Lovell-Badge, R., Behringer, R.R., 1999. Targeted Mutagenesis of the Endogenous Mouse *Mis* Gene Promoter. *Cell* 99, 409–419. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81527-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81527-5)
- Archambeault, D.R., Yao, H.H.-C., 2010. Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 10526–10531. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000318107>
- Ariyaratne, H.B.S., Chamindrani Mendis-Handagama, S.M.L., 2000. Changes in the Testis Interstitium of Sprague Dawley Rats from Birth to Sexual Maturity1. *Biology of Reproduction* 62, 680–690. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.3.680>
- Arkell, T.R., Lintzeris, N., Kevin, R.C., Ramaekers, J.G., Vandrey, R., Irwin, C., Haber, P.S., McGregor, I.S., 2019. Cannabidiol (CBD) content in vaporized cannabis does not prevent tetrahydrocannabinol (THC)-induced impairment of driving and cognition. *Psychopharmacology* 236, 2713–2724. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05246-8>
- Asch, R.H., Smith, C.G., 1986. Effects of delta 9-THC, the principal psychoactive component of marijuana, during pregnancy in the rhesus monkey. *J Reprod Med* 31, 1071–1081.
- Atkinson, H.C., Begg, E.J., Darlow, B.A., 1988. Drugs in Human Milk: Clinical Pharmacokinetic Considerations. *Clinical Pharmacokinetics* 14, 217–240. <https://doi.org/10.2165/00003088-198814040-00003>
- Atwood, B.K., Wager-Miller, J., Haskins, C., Straiker, A., Mackie, K., 2012. Functional Selectivity in CB₂ Cannabinoid Receptor Signaling and Regulation: Implications for the Therapeutic Potential of CB₂ Ligands. *Mol Pharmacol* 81, 250–263. <https://doi.org/10.1124/mol.111.074013>
- Auchus, R., Miller, W., 2012. Defects in Androgen Biosynthesis Causing 46,XY Disorders of Sexual Development. *Semin Reprod Med* 30, 417–426. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1324726>
- Auger, J., 2018. Spermatogenic Cells—Structure, in: *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, pp. 53–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64561-0>
- Aversa, A., Rossi, F., Francomano, D., Bruzziches, R., Bertone, C., Santiemma, V., Spera, G., 2008. Early endothelial dysfunction as a marker of vasculogenic erectile dysfunction in young habitual cannabis users. *Int J Impot Res* 20, 566–573. <https://doi.org/10.1038/ijir.2008.43>

- Azorlosa, J.L., Heishman, S.J., Stitzer, M.L., Mahaffey, J.M., 1992. Marijuana smoking: effect of varying delta 9-tetrahydrocannabinol content and number of puffs. *J Pharmacol Exp Ther* 261, 114–122.
- Babayeva, M., Asefa, H., Basu, P., Chumki, S., Loewy, Z., 2016. Marijuana Compounds: A Nonconventional Approach to Parkinson's Disease Therapy. *Parkinson's Disease* 2016, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2016/1279042>
- Badawy, Z.S., Chohan, K.R., Whyte, D.A., Penefsky, H.S., Brown, O.M., Souid, A.-K., 2009. Cannabinoids inhibit the respiration of human sperm. *Fertility and Sterility* 91, 2471–2476. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.03.075>
- Baer, R.J., Chambers, C.D., Ryckman, K.K., Oltman, S.P., Rand, L., Jelliffe-Pawlowski, L.L., 2019. Risk of preterm and early term birth by maternal drug use. *J Perinatol* 39, 286–294. <https://doi.org/10.1038/s41372-018-0299-0>
- Baglot, S.L., VanRyzin, J.W., Marquardt, A.E., Aukema, R.J., Petrie, G.N., Hume, C., Reinl, E.L., Bieber, J.B., McLaughlin, R.J., McCarthy, M.M., Hill, M.N., 2022. Maternal-fetal transmission of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites following inhalation and injection exposure during pregnancy in rats. *J Neurosci Res* 100, 713–730. <https://doi.org/10.1002/jnr.24992>
- Bailey, J., 1987. Fetal disposition of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) during late pregnancy in the rhesus monkey. *Toxicology and Applied Pharmacology* 90, 315–321. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(87\)90338-3](https://doi.org/10.1016/0041-008X(87)90338-3)
- Baillie, A.H., 1964. THE HISTOCHEMISTRY AND ULTRASTRUCTURE OF THE GENOCYTE. *J Anat* 98, 641–645.
- Baird, D.C., Meyers, G.J., Hu, J.S., 2018. Testicular Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* 97, 261–268.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Huffman, J.W., Layward, L., 2000. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 404, 84–87. <https://doi.org/10.1038/35003583>
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W.L., Hiley, C.R., 2006. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.11.003>
- Baker, P., O'Shaughnessy, P., 2001. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* 227–234. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220227>
- Baker, T., Datta, P., Rewers-Felkins, K., Thompson, H., Kallem, R.R., Hale, T.W., 2018. Transfer of Inhaled Cannabis Into Human Breast Milk. *Obstetrics & Gynecology* 131, 783–788. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002575>
- Baldi, E., 2000. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci* 5, d110. <https://doi.org/10.2741/baldi>
- Balenga, N.A., Martínez-Pinilla, E., Kargl, J., Schröder, R., Peinhaupt, M., Platzer, W., Bálint, Z., Zamarbide, M., Dopeso-Reyes, I.G., Ricobaraza, A., Pérez-Ortiz, J.M., Kostenis, E., Waldhoer, M., Heinemann, A., Franco, R., 2014. Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB₂ receptors modulates signalling: Heteromerization of GPR55 and CB₂ receptors. *Br J Pharmacol* 171, 5387–5406. <https://doi.org/10.1111/bph.12850>
- Bambang, K.N., Karasu, T., Gebeh, A., Taylor, A.H., Marczylo, T.H., Lam, P., Willets, J.M., Konje, J.C., 2010. From Fertilisation to Implantation in Mammalian Pregnancy—

- Modulation of Early Human Reproduction by the Endocannabinoid System. *Pharmaceuticals* 3, 2910–2929. <https://doi.org/10.3390/ph3092910>
- Bambang, K.N., Lambert, D.G., Lam, P.M.W., Quenby, S., Maccarrone, M., Konje, J.C., 2012. Immunity and early pregnancy events: are endocannabinoids the missing link? *Journal of Reproductive Immunology* 96, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.003>
- Banerjee, A., Singh, A., Srivastava, P., Turner, H., Krishna, A., 2011a. Effects of chronic bhang (cannabis) administration on the reproductive system of male mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 92, 195–205. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20295>
- Banerjee, A., Singh, A., Srivastava, P., Turner, H., Krishna, A., 2011b. Effects of chronic bhang (cannabis) administration on the reproductive system of male mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 92, 195–205. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20295>
- Banerjee, B.N., Galbreath, C., Sofia, R.D., 1975. Teratologic evaluation of synthetic Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rats. *Teratology* 11, 99–101. <https://doi.org/10.1002/tera.1420110112>
- Bansal, S., Maharao, N., Paine, M.F., Unadkat, J.D., 2020. Predicting the Potential for Cannabinoids to Precipitate Pharmacokinetic Drug Interactions via Reversible Inhibition or Inactivation of Major Cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 48, 1008–1017. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000073>
- Barakat, B., Itman, C., Mendis, S.H., Loveland, K.L., 2012. Activins and inhibins in mammalian testis development: New models, new insights. *Molecular and Cellular Endocrinology* 359, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.02.018>
- Barakat, B., O'Connor, A.E., Gold, E., de Kretser, D.M., Loveland, K.L., 2008. Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction* 136, 345–359. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0140>
- Barbonetti, A., Vassallo, M.R.C., Fortunato, D., Francavilla, S., Maccarrone, M., Francavilla, F., 2010. Energetic Metabolism and Human Sperm Motility: Impact of CB1 Receptor Activation. *Endocrinology* 151, 5882–5892. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0484>
- Barchi, M., Innocenzi, E., Giannattasio, T., Dolci, S., Rossi, P., Grimaldi, P., 2019. Cannabinoid Receptors Signaling in the Development, Epigenetics, and Tumours of Male Germ Cells. *IJMS* 21, 25. <https://doi.org/10.3390/ijms21010025>
- Bari, M., 2011. The manifold actions of endocannabinoids on female and male reproductive events. *Front Biosci* 16, 498. <https://doi.org/10.2741/3701>
- Bariani, M.V., Domínguez Rubio, A.P., Cella, M., Burdet, J., Franchi, A.M., Aisemberg, J., 2015. Role of the endocannabinoid system in the mechanisms involved in the LPS-induced preterm labor. *REPRODUCTION* 150, 463–472. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0211>
- Barker, D.J.P., 2007. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261, 412–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x>
- Baroni, T., Arato, I., Mancuso, F., Calafiore, R., Luca, G., 2019. On the Origin of Testicular Germ Cell Tumors: From Gonocytes to Testicular Cancer. *Front. Endocrinol.* 10, 343. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00343>
- Barouki, R., 2017. Endocrine disruptors: Revisiting concepts and dogma in toxicology. *Comptes Rendus Biologies* 340, 410–413. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.005>

- Barr, D., Bishop, A., Needham, L., 2007. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reproductive Toxicology* 23, 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.03.003>
- Barrios, F., Filippini, D., Pellegrini, M., Paronetto, M.P., Di Siena, S., Geremia, R., Rossi, P., De Felici, M., Jannini, E.A., Dolci, S., 2010. Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on *Nanos2* expression and meiotic entry of mouse germ cells. *Journal of Cell Science* 123, 871–880. <https://doi.org/10.1242/jcs.057968>
- Barthold, J., Reinhardt, S., Thorup, J., 2016. Genetic, Maternal, and Environmental Risk Factors for Cryptorchidism: An Update. *Eur J Pediatr Surg* 26, 399–408. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1592416>
- Barthold, J.S., Kumasi-Rivers, K., Upadhyay, J., Shekarriz, B., Imperato-Mcginley, J., 2000. Testicular position in the androgen insensitivity syndrome: implications for the role of androgens in testicular descent. *J Urol* 164, 497–501.
- Batool, A., Karimi, N., Wu, X.-N., Chen, S.-R., Liu, Y.-X., 2019. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 1713–1727. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03022-7>
- Battista, N., Bari, M., Maccarrone, M., 2015. Endocannabinoids and Reproductive Events in Health and Disease, in: Pertwee, R.G. (Ed.), *Endocannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 341–365. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_12
- Battista, N., Meccariello, R., Cobellis, G., Fasano, S., Di Tommaso, M., Pirazzi, V., Konje, J.C., Pierantoni, R., Maccarrone, M., 2012. The role of endocannabinoids in gonadal function and fertility along the evolutionary axis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 355, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.014>
- Battista, N., Rapino, C., Di Tommaso, M., Bari, M., Pasquariello, N., Maccarrone, M., 2008. Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286, S17–S23. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.010>
- Bay, K., Main, K.M., Toppari, J., Skakkebaek, N.E., 2011. Testicular descent: INSL3, testosterone, genes and the intrauterine milieu. *Nat Rev Urol* 8, 187–196. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2011.23>
- Bayrampour, H., Asim, A., 2021. Cannabis Use During the Pre-Conception Period and Pregnancy After Legalization. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 43, 740–745. <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2021.02.119>
- Beale, C., Broyd, S.J., Chye, Y., Suo, C., Schira, M., Galettis, P., Martin, J.H., Yücel, M., Solowij, N., 2018. Prolonged Cannabidiol Treatment Effects on Hippocampal Subfield Volumes in Current Cannabis Users. *Cannabis and Cannabinoid Research* 3, 94–107. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0047>
- Becker, M., Hesse, V., 2020. Minipuberty: Why Does it Happen? *Horm Res Paediatr* 93, 76–84. <https://doi.org/10.1159/000508329>
- Behringer, R.R., Finegold, M.J., Cate, R.L., 1994. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79, 415–425. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90251-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90251-8)
- Belavgeni, A., Bornstein, S.R., von Mässenhausen, A., Tonnus, W., Stumpf, J., Meyer, C., Othmar, E., Latk, M., Kanczkowski, W., Kroiss, M., Hantel, C., Hugo, C., Fassnacht, M., Ziegler, C.G., Schally, A.V., Krone, N.P., Linkermann, A., 2019. Exquisite sensitivity of adrenocortical carcinomas to induction of ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 22269–22274. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912700116>

- Belladelli, F., Chen, T., Basran, S., Greenberg, D.R., Del Giudice, F., Mulloy, E., Chen, C.-H., Cheng, Y.-S., Salonia, A., Eisenberg, M.L., 2022a. The Association between Monthly, Yearly, and Lifetime Cannabis Use, and Semen Parameters in Asian-American Men. *World J Mens Health* 40, e61. <https://doi.org/10.5534/wjmh.220106>
- Belladelli, F., Chen, T., Basran, S., Greenberg, D.R., Del Giudice, F., Mulloy, E., Chen, C.-H., Cheng, Y.-S., Salonia, A., Eisenberg, M.L., 2022b. The Association between Monthly, Yearly, and Lifetime Cannabis Use, and Semen Parameters in Asian-American Men. *World J Mens Health* 40, e61. <https://doi.org/10.5534/wjmh.220106>
- Belladelli, F., Del Giudice, F., Kasman, A., Kold Jensen, T., Jørgensen, N., Salonia, A., Eisenberg, M.L., 2021a. The association between cannabis use and testicular function in men: A systematic review and meta-analysis. *Andrology* 9, 503–510. <https://doi.org/10.1111/andr.12953>
- Belladelli, F., Del Giudice, F., Kasman, A., Kold Jensen, T., Jørgensen, N., Salonia, A., Eisenberg, M.L., 2021b. The association between cannabis use and testicular function in men: A systematic review and meta-analysis. *Andrology* 9, 503–510. <https://doi.org/10.1111/andr.12953>
- Belladelli, F., Fallara, G., Pozzi, E., Corsini, C., Cilio, S., Raffo, M., Boeri, L., Capogrosso, P., Eisenberg, M., Montorsi, F., Salonia, A., 2022c. Effects of recreational cannabis on testicular function in primary infertile men. *Andrology* 10, 1172–1180. <https://doi.org/DOI:10.1111/andr.13235>
- Belletti, B., Nicoloso, M., Schiappacassi, M., Chimienti, E., Berton, S., Lovat, F., Colombatti, A., Baldassarre, G., 2005. p27kip1 Functional Regulation in Human Cancer: A Potential Target for Therapeutic Designs. *CMC* 12, 1589–1605. <https://doi.org/10.2174/0929867054367149>
- Ben Maamar, M., Lesné, L., Hennig, K., Desdoits-Lethimonier, C., Kilcoyne, K.R., Coiffec, I., Rolland, A.D., Chevrier, C., Kristensen, D.M., Lavoué, V., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Dejuq-Rainsford, N., Mitchell, R.T., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2017. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Sci Rep* 7, 44184. <https://doi.org/10.1038/srep44184>
- Ben Maamar, M.B., Lesné, L., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Lassurguère, J., Lavoué, V., Deceuninck, Y., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Pineau, C., Chevrier, C., Dejuq-Rainsford, N., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2015. An Investigation of the Endocrine-Disruptive Effects of Bisphenol A in Human and Rat Fetal Testes. *PLOS ONE* 10, e0117226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117226>
- Bendsen, E., Byskov, A.G., Laursen, S.B., Larsen, H.-P.E., Andersen, C.Y., Westergaard, L.G., 2003. Number of germ cells and somatic cells in human fetal testes during the first weeks after sex differentiation. *Human Reproduction* 18, 13–18. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg057>
- Benevenuto, S.G., Domenico, M.D., Martins, M.A.G., Costa, N.S., de Souza, A.R.L., Costa, J.L., Tavares, M.F.M., Dolhnikoff, M., Veras, M.M., 2017. Recreational use of marijuana during pregnancy and negative gestational and fetal outcomes: An experimental study in mice. *Toxicology* 376, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.020>
- Benjamin, S., Masai, E., Kamimura, N., Takahashi, K., Anderson, R.C., Faisal, P.A., 2017. Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *Journal of Hazardous Materials* 340, 360–383. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.036>

- Berensztein, E.B., Baquedano, M.S., Gonzalez, C.R., Saraco, N.I., Rodriguez, J., Ponzio, R., Rivarola, M.A., Belgorosky, A., 2006. Expression of Aromatase, Estrogen Receptor α and β , Androgen Receptor, and Cytochrome P-450scc in the Human Early Prepubertal Testis. *Pediatr Res* 60, 740–744. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000246072.04663.bb>
- Bergadá, I., Milani, C., Bedecarrás, P., Andreone, L., Ropelato, M.G., Gottlieb, S., Bergadá, C., Campo, S., Rey, R.A., 2006. Time Course of the Serum Gonadotropin Surge, Inhibins, and Anti-Müllerian Hormone in Normal Newborn Males during the First Month of Life. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91, 4092–4098. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1079>
- Bernabò, N., Palestini, P., Chiarini, M., Maccarrone, M., Mattioli, M., Barboni, B., 2012. Endocannabinoid-binding CB1 and TRPV1 receptors as modulators of sperm capacitation. *Communicative & Integrative Biology* 5, 68–70. <https://doi.org/10.4161/cib.18118>
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J.A., Di Marzo, V., Fernández-Ruiz, J.J., 1999. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33, 181–191. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(19990901\)33:3<181::AID-SYN3>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(19990901)33:3<181::AID-SYN3>3.0.CO;2-R)
- Berryman, S.H., Anderson, R.A., Weis, J., Bartke, A., 1992. Evaluation of the co-mutagenicity of ethanol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol with Trenimon. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 278, 47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90285-8](https://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90285-8)
- Berta, P., Hawkins, J.B., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N., Fellous, M., 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448–450. <https://doi.org/10.1038/348448a0>
- Bhambhani, H.P., Kasman, A.M., Wilson-King, G., Eisenberg, M.L., 2020. A Survey Exploring the Relationship Between Cannabis Use Characteristics and Sexual Function in Men. *Sexual Medicine* 8, 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.esxm.2020.06.002>
- Bhang, D.H., Kim, B.-J., Kim, B.G., Schadler, K., Baek, K.-H., Kim, Y.H., Hsiao, W., Ding, B.-S., Rafii, S., Weiss, M.J., Chou, S.T., Kolon, T.F., Ginsberg, J.P., Ryu, B.-Y., Ryeom, S., 2018. Testicular endothelial cells are a critical population in the germline stem cell niche. *Nat Commun* 9, 4379. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06881-z>
- Bhattacharyya, S., Morrison, P.D., Fusar-Poli, P., Martin-Santos, R., Borgwardt, S., Winton-Brown, T., Nosarti, C., O'Carroll, C.M., Seal, M., Allen, P., Mehta, M.A., Stone, J.M., Tunstall, N., Giampietro, V., Kapur, S., Murray, R.M., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Atakan, Z., McGuire, P.K., 2010. Opposite Effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Human Brain Function and Psychopathology. *Neuropsychopharmacol* 35, 764–774. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.184>
- Bhushan, S., Theas, M.S., Guazzone, V.A., Jacobo, P., Wang, M., Fijak, M., Meinhardt, A., Lustig, L., 2020. Immune Cell Subtypes and Their Function in the Testis. *Front Immunol* 11, 583304. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583304>
- Bidlingmaier, F., Dörr, H.G., Eisenmenger, W., Kuhnle, U., Knorr, D., 1983. Testosterone and Androstenedione Concentrations in Human Testis and Epididymis during the First Two Years of Life*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 57, 311–315. <https://doi.org/10.1210/jcem-57-2-311>

- Bidlingmaier, F., Wagner-Barnack, M., Butenandt, O., Knorr, D., 1973. Plasma Estrogens in Childhood and Puberty under Physiologic and Pathologic Conditions. *Pediatr Res* 7, 901–907. <https://doi.org/10.1203/00006450-197311000-00006>
- Bilezikjian, L.M., Vaughan, J.M., Vale, W.W., 1993. Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 133, 2545–2553. <https://doi.org/10.1210/endo.133.6.8243276>
- Bird, K.D., Boleyn, T., Chesher, G.B., Jackson, D.M., Starmer, G.A., Teo, R.K.C., 1980. Intercannabinoid and cannabinoid-ethanol interactions and their effects on human performance. *Psychopharmacology* 71, 181–188. <https://doi.org/10.1007/BF00434409>
- Bisogno, T., Hanuš, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., Di Marzo, V., 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide: Cannabidiol, VR1 receptors and anandamide inactivation. *British Journal of Pharmacology* 134, 845–852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
- Bizzarri, C., Cappa, M., 2020. Ontogeny of Hypothalamus-Pituitary Gonadal Axis and Minipuberty: An Ongoing Debate? *Front. Endocrinol.* 11, 187. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00187>
- Blackard, C., Tennes, K., 1984. Human Placental Transfer of Cannabinoids. *N Engl J Med* 311, 797–797. <https://doi.org/10.1056/NEJM198409203111213>
- Blankman, J.L., Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2007. A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chemistry & Biology* 14, 1347–1356. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.006>
- Block, R.I., Farinpour, R., Schlechte, J.A., 1991. Effects of chronic marijuana use on testosterone, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin and cortisol in men and women. *Drug and Alcohol Dependence* 28, 121–128. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(91\)90068-A](https://doi.org/10.1016/0376-8716(91)90068-A)
- Blume, L.C., Patten, T., Eldeeb, K., Leone-Kabler, S., Ilyasov, A.A., Keegan, B.M., O’Neal, J.E., Bass, C.E., Hantgan, R.R., Lowther, W.T., Selley, D.E., Howlett, A.C., 2017. Cannabinoid Receptor Interacting Protein 1a Competition with β -Arrestin for CB₁ Receptor Binding Sites. *Mol Pharmacol* 91, 75–86. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104638>
- Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S., Hass, U., 2010. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology* 30, 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.03.011>
- Boger, D.L., Fecik, R.A., Patterson, J.E., Miyauchi, H., Patricelli, M.P., Cravatt, B.F., 2000. Fatty acid amide hydrolase substrate specificity. *Bioorg Med Chem Lett* 10, 2613–2616. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00528-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00528-X)
- Boggs, D.L., Nguyen, J.D., Morgenson, D., Taffe, M.A., Ranganathan, M., 2018. Clinical and Preclinical Evidence for Functional Interactions of Cannabidiol and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacol.* 43, 142–154. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.209>
- Bonde, J.P., Flachs, E.M., Rimborg, S., Glazer, C.H., Giwercman, A., Ramlau-Hansen, C.H., Hougaard, K.S., Høyer, B.B., Hærving, K.K., Petersen, S.B., Rylander, L., Specht, I.O., Toft, G., Bräuner, E.V., 2016a. The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive

- disorders: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 23, 104–125. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw036>
- Bonde, J.P., Flachs, E.M., Rimborg, S., Glazer, C.H., Giwercman, A., Ramlau-Hansen, C.H., Hougaard, K.S., Høyer, B.B., Hærving, K.K., Petersen, S.B., Rylander, L., Specht, I.O., Toft, G., Bräuner, E.V., 2016b. The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 23, 104–125. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw036>
- Bonello, M., Xu, F., Li, Z., Burns, L., Austin, M.-P., Sullivan, E., 2014. Mental and Behavioral Disorders Due to Substance Abuse and Perinatal Outcomes: A Study Based on Linked Population Data in New South Wales, Australia. *IJERPH* 11, 4991–5005. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504991>
- Bonhaus, D.W., Chang, L.K., Kwan, J., Martin, G.R., 1998. Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 884–888.
- Booth, J.K., Bohlmann, J., 2019. Terpenes in *Cannabis sativa* – From plant genome to humans. *Plant Science* 284, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.022>
- Booth, W.T., Walker, N.B., Lowther, W.T., Howlett, A.C., 2019. Cannabinoid Receptor Interacting Protein 1a (CRIP1a): Function and Structure. *Molecules* 24, 3672. <https://doi.org/10.3390/molecules24203672>
- Borgelt, L.M., Franson, K.L., Nussbaum, A.M., Wang, G.S., 2013. The Pharmacologic and Clinical Effects of Medical Cannabis. *Pharmacotherapy* 33, 195–209. <https://doi.org/10.1002/phar.1187>
- Borgen, L.A., Marvin Davis, W., Pace, H.B., 1971. Effects of synthetic Δ^9 -tetrahydrocannabinol on pregnancy and offspring in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 20, 480–486. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(71\)90252-3](https://doi.org/10.1016/0041-008X(71)90252-3)
- Bornheim, L.M., Grillo, M.P., 1998. Characterization of cytochrome P450 3A inactivation by cannabidiol: possible involvement of cannabidiol-hydroxyquinone as a P450 inactivator. *Chem Res Toxicol* 11, 1209–1216. <https://doi.org/10.1021/tx9800598>
- Bornheim, L.M., Kim, K.Y., Li, J., Perotti, B.Y., Benet, L.Z., 1995. Effect of cannabidiol pretreatment on the kinetics of tetrahydrocannabinol metabolites in mouse brain. *Drug Metab Dispos* 23, 825–831.
- Boskovic, R., Klein, J., Woodland, C., Karaskov, T., Koren, G., 2001. The role of the placenta in variability of fetal exposure to cocaine and cannabinoids: A twin study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79, 942–945. <https://doi.org/10.1139/y01-080>
- Boukari, K., Meduri, G., Brailly-Tabard, S., Guibourdenche, J., Ciampi, M.L., Massin, N., Martinerie, L., Picard, J.-Y., Rey, R., Lombès, M., Young, J., 2009. Lack of Androgen Receptor Expression in Sertoli Cells Accounts for the Absence of Anti-Mullerian Hormone Repression during Early Human Testis Development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94, 1818–1825. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1909>
- Bouty, A., Ayers, K.L., Pask, A., Heloury, Y., Sinclair, A.H., 2015. The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. *Sex Dev* 9, 239–259. <https://doi.org/10.1159/000441988>
- Bovolin, P., Cottone, E., Pomatto, V., Fasano, S., Pierantoni, R., Cobellis, G., Meccariello, R., 2014a. Endocannabinoids are Involved in Male Vertebrate Reproduction: Regulatory Mechanisms at Central and Gonadal Level. *Front. Endocrinol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00054>

- Bovolín, P., Cottone, E., Pomatto, V., Fasano, S., Pierantoni, R., Cobellis, G., Meccariello, R., 2014b. Endocannabinoids are Involved in Male Vertebrate Reproduction: Regulatory Mechanisms at Central and Gonadal Level. *Front Endocrinol* 5, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00054>
- Bowles, J., Feng, C.-W., Spiller, C., Davidson, T.-L., Jackson, A., Koopman, P., 2010. FGF9 Suppresses Meiosis and Promotes Male Germ Cell Fate in Mice. *Developmental Cell* 19, 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.08.010>
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P., 2006. Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science* 312, 596–600. <https://doi.org/10.1126/science.1125691>
- Bowles, J., Koopman, P., 2010. Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *REPRODUCTION* 139, 943–958. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0075>
- Boyar, R.M., Rosenfeld, R.S., Kapen, S., Finkelstein, J.W., Roffwarg, H.P., Weitzman, E.D., Hellman, L., 1974. Human Puberty SIMULTANEOUS AUGMENTED SECRETION OF LUTEINIZING HORMONE AND TESTOSTERONE DURING SLEEP. *J. Clin. Invest.* 54, 609–618. <https://doi.org/10.1172/JCI107798>
- Brehm, E., Flaws, J.A., 2019. Transgenerational Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Male and Female Reproduction. *Endocrinology* 160, 1421–1435. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00034>
- Breivogel, C.S., Puri, V., Lambert, J.M., Hill, D.K., Huffman, J.W., Razdan, R.K., 2013. The influence of beta-arrestin2 on cannabinoid CB₁ receptor coupling to G-proteins and subcellular localization and relative levels of beta-arrestin1 and 2 in mouse brain. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 33, 367–379. <https://doi.org/10.3109/10799893.2013.838787>
- Brennan, J., Karl, J., Capel, B., 2002. Divergent Vascular Mechanisms Downstream of Sry Establish the Arterial System in the XY Gonad. *Developmental Biology* 244, 418–428. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0578>
- Brenneisen, R., Egli, A., Elsohly, M.A., Henn, V., Spiess, Y., 1996. The effect of orally and rectally administered delta 9-tetrahydrocannabinol on spasticity: a pilot study with 2 patients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 34, 446–452.
- Brents, L.K., 2016. Marijuana, the Endocannabinoid System and the Female Reproductive System. *Yale J Biol Med* 89, 175–191.
- Brown, Q.L., Sarvet, A.L., Shmulewitz, D., Martins, S.S., Wall, M.M., Hasin, D.S., 2017. Trends in Marijuana Use Among Pregnant and Nonpregnant Reproductive-Aged Women, 2002–2014. *JAMA* 317, 207. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.17383>
- Brown, T.T., Dobs, A.S., 2002. Endocrine Effects of Marijuana. *The Journal of Clinical Pharmacology* 42, 90S–96S. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.2002.tb06008.x>
- Buckley, N.E., Hansson, S., Harta, G., Mezey, É., 1997. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82, 1131–1149. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00348-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00348-5)
- Buehr, M., Gu, S., McLaren, A., 1993. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117, 273–281. <https://doi.org/10.1242/dev.117.1.273>
- Bukiya, A.N., 2019. Physiology of the Endocannabinoid System During Development, in: Bukiya, A.N. (Ed.), *Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology*,

- Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 13–37. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_2
- Bullejos, M., Koopman, P., 2001. Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev. Dyn.* 221, 201–205. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1134>
- Bustamante-Marín, X., Garness, J.A., Capel, B., 2013. Testicular teratomas: an intersection of pluripotency, differentiation and cancer biology. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 201–210. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130136bc>
- Byskov, A.G., 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews* 66, 71–117. <https://doi.org/10.1152/physrev.1986.66.1.71>
- Cacciola, G., Chioccarelli, T., Altucci, L., Ledent, C., Mason, J.I., Fasano, S., Pierantoni, R., Cobellis, G., 2013. Low 17beta-Estradiol Levels in Cnr1 Knock-Out Mice Affect Spermatid Chromatin Remodeling by Interfering with Chromatin Reorganization. *Biology of Reproduction* 88, 152–152. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105726>
- Cacciola, G., Chioccarelli, T., Ricci, G., Meccariello, R., Fasano, S., Pierantoni, R., Cobellis, G., 2008. The endocannabinoid system in vertebrate male reproduction: A comparative overview. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286, S24–S30. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.004>
- Calandra, B., Portier, M., Kernéis, A., Delpech, M., Carillon, C., Le Fur, G., Ferrara, P., Shire, D., 1999. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *European Journal of Pharmacology* 374, 445–455. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00349-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00349-0)
- Callaghan, R.C., Allebeck, P., Akre, O., McGlynn, K.A., Sidorchuk, A., 2017. Cannabis Use and Incidence of Testicular Cancer: A 42-Year Follow-up of Swedish Men between 1970 and 2011. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 26, 1644–1652. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0428>
- Callén, L., Moreno, E., Barroso-Chinea, P., Moreno-Delgado, D., Cortés, A., Mallol, J., Casadó, V., Lanciego, J.L., Franco, R., Lluís, C., Canela, E.I., McCormick, P.J., 2012. Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Form Functional Heteromers in Brain. *Journal of Biological Chemistry* 287, 20851–20865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.335273>
- Campolongo, P., Trezza, V., Cassano, T., Gaetani, S., Morgese, M.G., Ubaldi, M., Soverchia, L., Antonelli, T., Ferraro, L., Massi, M., Ciccocioppo, R., Cuomo, V., 2007. Perinatal exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol causes enduring cognitive deficits associated with alteration of cortical gene expression and neurotransmission in rats. *Addiction Biology* 12, 485–495. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00074.x>
- Carakushansky, G., Neu, Richard L., Gardner, Lyttl., 1969. LYSERGIDE AND CANNABIS AS POSSIBLE TERATOGENS IN MAN. *The Lancet* 293, 150–151. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)91156-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)91156-8)
- Cargnelutti, F., Di Nisio, A., Pallotti, F., Sabovic, I., Spaziani, M., Tarsitano, M.G., Paoli, D., Foresta, C., 2021. Effects of endocrine disruptors on fetal testis development, male puberty, and transition age. *Endocrine* 72, 358–374. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02436-9>
- Carreau, S., Wolczynski, S., Galeraud-Denis, I., 2010. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 1571–1579. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0113>

- Carreira, L.D., Matias, F.C., Campos, M.G., 2022. Clinical Data on Canabinoids: Translational Research in the Treatment of Autism Spectrum Disorders. *Biomedicines* 10, 796. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040796>
- Carroll, K., Pottinger, A.M., Wynter, S., DaCosta, V., 2020. Marijuana use and its influence on sperm morphology and motility: identified risk for fertility among Jamaican men. *Andrologia* 8, 136–142. <https://doi.org/10.1111/andr.12670>
- Carter, R.C., Wainwright, H., Molteno, C.D., Georgieff, M.K., Dodge, N.C., Warton, F., Meintjes, E.M., Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., 2016. Alcohol, Methamphetamine, and Marijuana Exposure Have Distinct Effects on the Human Placenta. *Alcohol Clin Exp Res* 40, 753–764. <https://doi.org/10.1111/acer.13022>
- Carvalho, R.K., Andersen, M.L., Mazaro-Costa, R., 2019. The effects of cannabidiol on male reproductive system: A literature review. *Journal of Applied Toxicology* 40, 132–150. <https://doi.org/10.1002/jat.3831>
- Carvalho, R.K., Santos, M.L., Souza, M.R., Rocha, T.L., Guimarães, F.S., Anselmo-Franci, J.A., Mazaro-Costa, R., 2018a. Chronic exposure to cannabidiol induces reproductive toxicity in male Swiss mice: MALE REPRODUCTIVE EFFECTS OF CBD. *J Appl Toxicol* 38, 1215–1223. <https://doi.org/10.1002/jat.3631>
- Carvalho, R.K., Souza, M.R., Santos, M.L., Guimarães, F.S., Pobbe, R.L.H., Andersen, M.L., Mazaro-Costa, R., 2018b. Chronic cannabidiol exposure promotes functional impairment in sexual behavior and fertility of male mice. *Reproductive Toxicology* 81, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.013>
- Castaneto, M.S., Gorelick, D.A., Desrosiers, N.A., Hartman, R.L., Pirard, S., Huestis, M.A., 2014. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence* 144, 12–41. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005>
- Castel, P., Simon, P., Barbier, M., Sunyach, C., Tassistro, V., Manzoni, O., Pelissier, A.-L., Courbiere, B., 2020. Focus sur le système endocannabinoïde et la reprotoxicité du cannabis chez la femme à l’heure du débat sur sa dépénalisation en France. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* 48, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2020.01.024>
- Catanzaro, G., Battista, N., Rossi, G., Di Tommaso, M., Pucci, M., Pirazzi, V., Cecconi, S., Maccarrone, M., 2011. Effect of capacitation on the endocannabinoid system of mouse sperm. *Molecular and Cellular Endocrinology* 343, 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.01.022>
- Chakrabarti, A., Onaivi, E.S., Chaudhuri, G., 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Sequence* 5, 385–388. <https://doi.org/10.3109/10425179509020870>
- Challapalli, P.V.N., Stinchcomb, A.L., 2002. In vitro experiment optimization for measuring tetrahydrocannabinol skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics* 241, 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00262-4)
- Chan, F., Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Yang, Q.-E., Bieberich, C.J., Shashikant, C.S., Oatley, J.M., 2014. Functional and molecular features of the Id4⁺ germline stem cell population in mouse testes. *Genes Dev.* 28, 1351–1362. <https://doi.org/10.1101/gad.240465.114>
- Chan, H.-W., McKirdy, N.C., Peiris, H.N., Rice, G.E., Mitchell, M.D., 2013. The role of endocannabinoids in pregnancy. *REPRODUCTION* 146, R101–R109. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0508>

- Chang, J.C., Tarr, J.A., Holland, C.L., De Genna, N.M., Richardson, G.A., Rodriguez, K.L., Sheeder, J., Kraemer, K.L., Day, N.L., Rubio, D., Jarlenski, M., Arnold, R.M., 2019. Beliefs and attitudes regarding prenatal marijuana use: Perspectives of pregnant women who report use. *Drug and Alcohol Dependence* 196, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.11.028>
- Chang, X., Bian, Y., He, Q., Yao, J., Zhu, J., Wu, J., Wang, K., Duan, T., 2017. Suppression of STAT3 Signaling by Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) Induces Trophoblast Dysfunction. *Cell Physiol Biochem* 42, 537–550. <https://doi.org/10.1159/000477603>
- Chasnoff, I.J., Griffith, D.R., Freier, C., Murray, J., 1992. Cocaine/polydrug use in pregnancy: two-year follow-up. *Pediatrics* 89, 284–289.
- Chassot, A.-A., Le Rolle, M., Jolivet, G., Stevant, I., Guigonis, J.-M., Da Silva, F., Nef, S., Pailhoux, E., Schedl, A., Ghyselink, N.B., Chaboissier, M.-C., 2020. Retinoic acid synthesis by ALDH1A proteins is dispensable for meiosis initiation in the mouse fetal ovary. *Sci. Adv.* 6, eaaz1261. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1261>
- Chemes, H.E., 2001. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J Androl* 24, 2–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2001.00260.x>
- Chemes, H.E., Rey, R.A., Nistal, M., Regadera, J., Musse, M., González-Peramato, P., Serrano, Á., 2008. Physiological Androgen Insensitivity of the Fetal, Neonatal, and Early Infantile Testis Is Explained by the Ontogeny of the Androgen Receptor Expression in Sertoli Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93, 4408–4412. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0915>
- Chen, L.-Y., Brown, P.R., Willis, W.B., Eddy, E.M., 2014. Peritubular Myoid Cells Participate in Male Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance. *Endocrinology* 155, 4964–4974. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1406>
- Chen, X., Zheng, C., Qian, J., Sutton, S., Wang, Z., Lv, J., Liu, C., Zhou, N., 2015. Involvement of β -arrestin-2 and Clathrin in Agonist-Mediated Internalization of the Human Cannabinoid CB2 Receptor. *CMP* 7, 67–80. <https://doi.org/10.2174/1874467207666140714115824>
- Chen, Xp, Yang, W., Fan, Y., Luo, J., Hong, K., Wang, Z., Yan, J., Chen, X, Lu, J., Benovic, J., Zhou, N., 2010. Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to Gs and Gi: Coupling of cannabinoid CB1 receptors to Gs and Gi. *British Journal of Pharmacology* 161, 1817–1834. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01006.x>
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2012. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacol Rev* 64, 16–64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>
- Cheng, L., Albers, P., Berney, D.M., Feldman, D.R., Daugaard, G., Gilligan, T., Looijenga, L.H.J., 2018. Testicular cancer. *Nat Rev Dis Primers* 4, 29. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0029-0>
- Cheng, L., Lyu, B., Roth, L.M., 2017. Perspectives on testicular germ cell neoplasms. *Human Pathology* 59, 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.08.002>
- Chia, V.M., Quraishi, S.M., Devesa, S.S., Purdue, M.P., Cook, M.B., McGlynn, K.A., 2010. International Trends in the Incidence of Testicular Cancer, 1973-2002. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 19, 1151–1159. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0031>
- Chiarini-Garcia, H., Hornick, J.R., Griswold, M.D., Russell, L.D., 2001. Distribution of Type A Spermatogonia in the Mouse Is Not Random1. *Biology of Reproduction* 65, 1179–1185. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.4.1179>

- Chicca, A., Marazzi, J., Nicolussi, S., Gertsch, J., 2012. Evidence for Bidirectional Endocannabinoid Transport across Cell Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 287, 34660–34682. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373241>
- Chieffi, P., Chieffi, S., 2013. Molecular biomarkers as potential targets for therapeutic strategies in human testicular germ cell tumors: An overview: HUMAN TESTICULAR GERM CELL TUMORS. *J. Cell. Physiol.* 228, 1641–1646. <https://doi.org/10.1002/jcp.24328>
- Childs, A.J., Cowan, G., Kinnell, H.L., Anderson, R.A., Saunders, P.T.K., 2011. Retinoic Acid Signalling and the Control of Meiotic Entry in the Human Fetal Gonad. *PLoS ONE* 6, e20249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020249>
- Chioccarelli, T., Cacciola, G., Altucci, L., Lewis, S.E.M., Simon, L., Ricci, G., Ledent, C., Meccariello, R., Fasano, S., Pierantoni, R., Cobellis, G., 2010. Cannabinoid Receptor 1 Influences Chromatin Remodeling in Mouse Spermatids by Affecting Content of Transition Protein 2 mRNA and Histone Displacement. *Endocrinology* 151, 5017–5029. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0133>
- Chioccarelli, T., Manfredola, F., Porreca, V., Fasano, S., Altucci, L., Pierantoni, R., Cobellis, G., 2020. The Cannabinoid Receptor CB1 Stabilizes Sperm Chromatin Condensation Status During Epididymal Transit by Promoting Disulphide Bond Formation. *IJMS* 21, 3117. <https://doi.org/10.3390/ijms21093117>
- Chiquoine, A.D., 1954. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat. Rec.* 118, 135–146. <https://doi.org/10.1002/ar.1091180202>
- Chiu, V., Leung, J., Hall, W., Stjepanović, D., Degenhardt, L., 2021. Public health impacts to date of the legalisation of medical and recreational cannabis use in the USA. *Neuropharmacology* 193, 108610. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108610>
- Chojnacka, K., Zarzycka, M., Mruk, D.D., 2016. Biology of the Sertoli Cell in the Fetal, Pubertal, and Adult Mammalian Testis. *Results Probl Cell Differ* 58, 225–251. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_9
- Chopra, G.S., Jandu, B.S., 1976. PSYCHOCLINICAL EFFECTS OF LONG-TERM MARIJUANA USE IN 275 INDIAN CHRONIC USERS. A COMPARATIVE ASSESSMENT OF EFFECTS IN INDIAN AND USA USERS. *Ann NY Acad Sci* 282, 95–108. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1976.tb49889.x>
- Choudhary, D., Jansson, I., Stoilov, I., Sarfarazi, M., Schenkman, J.B., 2005. Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1–4) during development and in different adult tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 436, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.02.001>
- Chowdhury, A.R., 1987. Effect of pharmacological agents on male reproduction. *Adv Contracept Deliv Syst* 3, 347–352.
- Christensen, H.D., Freudenthal, R.I., Gidley, J.T., Rosenfeld, R., Boegli, G., Testino, L., Brine, D.R., Pitt, C.G., Wall, M.E., 1971. Activity of Δ^8 - and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Related Compounds in the Mouse. *Science* 172, 165–167. <https://doi.org/10.1126/science.172.3979.165>
- Christofides, A., Konstantinidou, E., Jani, C., Boussiotis, V.A., 2021. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism* 114, 154338. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154338>

- Christopoulos, A., Changeux, J.-P., Catterall, W.A., Fabbro, D., Burris, T.P., Cidlowski, J.A., Olsen, R.W., Peters, J.A., Neubig, R.R., Pin, J.-P., Sexton, P.M., Kenakin, T.P., Ehlert, F.J., Spedding, M., Langmead, C.J., 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. Multisite Pharmacology: Recommendations for the Nomenclature of Receptor Allosterism and Allosteric Ligands. *Pharmacol Rev* 66, 918–947. <https://doi.org/10.1124/pr.114.008862>
- Cigorraga, S.B., Dufau, M.L., Catt, K.J., 1978. Regulation of luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in gonadotropin-desensitized leydig cells. *J Biol Chem* 253, 4297–4304.
- Clark, A.M., Garland, K.K., Russell, L.D., 2000. Desert hedgehog (Dhh) Gene Is Required in the Mouse Testis for Formation of Adult-Type Leydig Cells and Normal Development of Peritubular Cells and Seminiferous Tubules. *Biology of Reproduction* 63, 1825–1838. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1825>
- Clark, J.M., Eddy, E.M., 1975. Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Developmental Biology* 47, 136–155. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90269-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90269-9)
- Clement, P., Giuliano, F., 2015. Anatomy and physiology of genital organs – men, in: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 19–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63247-0.00003-1>
- Clements, J.A., Reyes, F.I., Winter, J.S.D., Faiman, C., 1976. Studies on Human Sexual Development. III. Fetal Pituitary and Serum, and Amniotic Fluid Concentrations of LH, CG, and FSH. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 42, 9–19. <https://doi.org/10.1210/jcem-42-1-9>
- Clermont, Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* 52, 198–236. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198>
- Clermont, Y., 1969. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Am. J. Anat.* 126, 57–71. <https://doi.org/10.1002/aja.1001260106>
- Clermont, Y., 1966. Renewal of spermatogonia in man. *Am. J. Anat.* 118, 509–524. <https://doi.org/10.1002/aja.1001180211>
- Clermont, Y., 1963. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.* 112, 35–51. <https://doi.org/10.1002/aja.1001120103>
- Close, C.E., Roberts, P.L., Berger, R.E., 1990. Cigarettes, Alcohol and Marijuana are Related to Pyospermia in Infertile Men. *Journal of Urology* 144, 900–903. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)39618-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)39618-0)
- Cobellis, G., Noviello, C., Nino, F., Romano, M., Mariscoli, F., Martino, A., Parmeggiani, P., Papparella, A., 2014. Spermatogenesis and cryptorchidism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 63. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00063>
- Cobellis, G., Ricci, G., Cacciola, G., Orlando, P., Petrosino, S., Cascio, M.G., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Chioccarelli, T., Altucci, L., Fasano, S., Meccariello, R., Pierantoni, R., Ledent, C., Di Marzo, V., 2010. A Gradient of 2-Arachidonoylglycerol Regulates Mouse Epididymal Sperm Cell Start-Up1. *Biology of Reproduction* 82, 451–458. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.079210>
- Codesal, J., Regadera, J., Nistal, M., Regadera-Sejas, J., Paniagua, R., 1990. Involution of human fetal Leydig cells. An immunohistochemical, ultrastructural and quantitative study. *J Anat* 172, 103–114.

- Cohen, K., Weizman, A., Weinstein, A., 2019. Positive and Negative Effects of Cannabis and Cannabinoids on Health. *Clin Pharmacol Ther* 105, 1139–1147. <https://doi.org/10.1002/cpt.1381>
- Cohen, S., 1976. THE 94-DAY CANNABIS STUDY. *Ann NY Acad Sci* 282, 211–220. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1976.tb49900.x>
- Colizzi, M., Bhattacharyya, S., 2018. Cannabis use and the development of tolerance: a systematic review of human evidence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 93, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.07.014>
- Combes, A.N., Lesieur, E., Harley, V.R., Sinclair, A.H., Little, M.H., Wilhelm, D., Koopman, P., 2009a. Three-dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel tubulogenic mechanism in development. *Dev. Dyn.* 238, 1033–1041. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21925>
- Combes, A.N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., Koopman, P., 2009b. Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology* 326, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.040>
- Cone, E.J., Johnson, R.E., Moore, J.D., Roache, J.D., 1986. Acute effects of smoking marijuana on hormones, subjective effects and performance in male human subjects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 24, 1749–1754. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90515-0)
- Conley, A.J., Bird, I.M., 1997. The Role of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of Gonadal and Adrenal Steroidogenesis via the Δ 5 and Δ 4 Pathways of Steroidogenesis in Mammals. *Biology of Reproduction* 56, 789–799. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.4.789>
- Connan-Perrot, S., Léger, T., Lelandais, P., Desdoits-Lethimonier, C., David, A., Fowler, P.A., Mazaud-Guittot, S., 2021. Six Decades of Research on Human Fetal Gonadal Steroids. *IJMS* 22, 6681. <https://doi.org/10.3390/ijms22136681>
- Conner, S.N., Bedell, V., Lipsey, K., Macones, G.A., Cahill, A.G., Tuuli, M.G., 2016. Maternal Marijuana Use and Adverse Neonatal Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology* 128, 713–723. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001649>
- Consroe, P., Kennedy, K., Schram, K., 1991. Assay of plasma cannabidiol by capillary gas chromatography/ion trap mass spectroscopy following high-dose repeated daily oral administration in humans. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 40, 517–522. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90357-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90357-8)
- Cook, M.B., Akre, O., Forman, D., Madigan, M.P., Richiardi, L., McGlynn, K.A., 2010. A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer—experiences of the son. *International Journal of Epidemiology* 39, 1605–1618. <https://doi.org/10.1093/ije/dyq120>
- Cool, J., Carmona, F.D., Szucsik, J.C., Capel, B., 2008. Peritubular Myoid Cells Are Not the Migrating Population Required for Testis Cord Formation in the XY Gonad. *Sex Dev* 2, 128–133. <https://doi.org/10.1159/000143430>
- Cool, J., DeFalco, T., Capel, B., 2012. Testis formation in the fetal mouse: dynamic and complex *de novo* tubulogenesis: Tubulogenesis in the fetal mouse testis. *WIREs Dev Biol* 1, 847–859. <https://doi.org/10.1002/wdev.62>
- Cool, J., DeFalco, T.J., Capel, B., 2011. Vascular-mesenchymal cross-talk through Vegf and Pdgf drives organ patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 167–172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010299108>

- Corbier, P., Edwards, D.A., Roffi, J., 1992. The neonatal testosterone surge: A comparative study. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique* 100, 127–131. <https://doi.org/10.3109/13813459209035274>
- Corradi, P.F., Corradi, R.B., Greene, L.W., 2016a. Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. *Urologic Clinics of North America* 43, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.01.001>
- Corradi, P.F., Corradi, R.B., Greene, L.W., 2016b. Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. *Urol Clin North Am* 43, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.01.001>
- Correa, F., Wolfson, M.L., Valchi, P., Aisemberg, J., Franchi, A.M., 2016. Endocannabinoid system and pregnancy. *Reproduction* 152, R191–R200. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0167>
- Corsi, D.J., Murphy, M.S.Q., Cook, J., 2021. The Effects of Cannabis on Female Reproductive Health Across the Life Course. *Cannabis and Cannabinoid Research* 6, 275–287. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0065>
- Corsi, D.J., Walsh, L., Weiss, D., Hsu, H., El-Chaar, D., Hawken, S., Fell, D.B., Walker, M., 2019. Association Between Self-reported Prenatal Cannabis Use and Maternal, Perinatal, and Neonatal Outcomes. *JAMA* 322, 145. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.8734>
- Cortes, D., 1990. Histological Versus Stereological Methods Applied at Spermatogonia During Normal Human Development. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 24, 11–15. <https://doi.org/10.3109/00365599009180352>
- Cortes, D., Müller, J., Skakkebaek, N.E., 1987. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl* 10, 589–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00358.x>
- Costa, M.A., 2016. The endocannabinoid system: A novel player in human placentation. *Reproductive Toxicology* 61, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.03.002>
- Counis, R., Laverrière, J.-N., Garrel, G., Bleux, C., Cohen-Tannoudji, J., Lerrant, Y., Kottler, M.-L., Magre, S., 2005. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 243–254. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005017>
- Coveney, D., Cool, J., Oliver, T., Capel, B., 2008. Four-dimensional analysis of vascularization during primary development of an organ, the gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7212–7217. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707674105>
- Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., Lichtman, A.H., 2001. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9371–9376. <https://doi.org/10.1073/pnas.161191698>
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83–87. <https://doi.org/10.1038/384083a0>
- Crippa, J.A., Guimarães, F.S., Campos, A.C., Zuardi, A.W., 2018. Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. *Front. Immunol.* 9, 2009. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02009>
- Crippa, J.A.S., Derenusson, G.N., Ferrari, T.B., Wichert-Ana, L., Duran, F.L., Martin-Santos, R., Simões, M.V., Bhattacharyya, S., Fusar-Poli, P., Atakan, Z., Filho, A.S., Freitas-Ferrari, M.C., McGuire, P.K., Zuardi, A.W., Busatto, G.F., Hallak, J.E.C., 2011. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a

- preliminary report. *J Psychopharmacol* 25, 121–130.
<https://doi.org/10.1177/0269881110379283>
- Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., Di Marzo, V., 2006. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139, 1405–1415. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.074>
- Culty, M., 2009. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defect Res C* 87, 1–26. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20142>
- Cunha, G.R., Sinclair, A., Risbridger, G., Hutson, J., Baskin, L.S., 2015. Current understanding of hypospadias: relevance of animal models. *Nat Rev Urol* 12, 271–280. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2015.57>
- Cunha, J.M., Carlini, E.A., Pereira, A.E., Ramos, O.L., Pimentel, C., Gagliardi, R., Sanvito, W.L., Lander, N., Mechoulam, R., 1980. Chronic Administration of Cannabidiol to Healthy Volunteers and Epileptic Patients. *Pharmacology* 21, 175–185. <https://doi.org/10.1159/000137430>
- Cupp, A.S., Uzumcu, M., Skinner, M.K., 2003. Chemotactic Role of Neurotrophin 3 in the Embryonic Testis That Facilitates Male Sex Determination1. *Biology of Reproduction* 68, 2033–2037. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012617>
- Cushman, P., 1975a. Plasma Testosterone Levels in Healthy Male Marijuana Smokers. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse* 2, 269–275. <https://doi.org/10.3109/00952997509002740>
- Cushman, P., 1975b. Plasma Testosterone Levels in Healthy Male Marijuana Smokers. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2, 269–275. <https://doi.org/10.3109/00952997509002740>
- da Silva, S.M., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., Lovell-Badge, R., 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14, 62–68. <https://doi.org/10.1038/ng0996-62>
- Daling, J.R., Doody, D.R., Sun, X., Trabert, B.L., Weiss, N.S., Chen, C., Biggs, M.L., Starr, J.R., Dey, S.K., Schwartz, S.M., 2009. Association of marijuana use and the incidence of testicular germ cell tumors. *Cancer* 115, 1215–1223. <https://doi.org/10.1002/cncr.24159>
- Dalterio, S., Badr, F., Bartke, A., Mayfield, D., 1982. Cannabinoids in Male Mice: Effects on Fertility and Spermatogenesis. *Science* 216, 315–316. <https://doi.org/10.1126/science.6801767>
- Dalterio, S., Bartke, A., 1981. FETAL TESTOSTERONE IN MICE: EFFECT OF GESTATIONAL AGE AND CANNABINOID EXPOSURE. *Journal of Endocrinology* 91, 509–514. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0910509>
- Dalterio, S., Bartke, A., Burstein, S., 1977. Cannabinoids Inhibit Testosterone Secretion by Mouse Testes in Vitro. *Science* 196, 1472–1473. <https://doi.org/10.1126/science.867048>
- Dalterio, S., Bartke, A., Roberson, C., Watson, D., Burstein, S., 1978. Direct and pituitary-mediated effects of Δ^9 -THC and cannabiniol on the testis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 8, 673–678. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(78\)90265-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(78)90265-4)
- Dalterio, S., Steger, R., Mayfield, D., Bartke, A., 1984a. Early cannabinoid exposure influences neuroendocrine and reproductive functions in mice: II. Postnatal effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 20, 115–123. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(84\)90111-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(84)90111-4)

- Dalterio, S., Steger, R., Mayfield, D., Bartke, A., 1984b. Early cannabinoid exposure influences neuroendocrine and reproductive functions in male mice: I. Prenatal exposure. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 20, 107–113. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(84\)90110-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(84)90110-2)
- Dalterio, S., Steger, R., Peluso, J., de Paolo, L., 1987. Acute Δ^9 -tetrahydrocannabinol exposure: Effects of hypothalamic-pituitary-testicular activity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 26, 533–537. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(87\)90161-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(87)90161-4)
- Dalterio, S.L., 1980. Perinatal or adult exposure to cannabinoids alters male reproductive functions in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 12, 143–153. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90429-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90429-3)
- Dalterio, S.L., Bartke, A., Mayfield, D., 1983. Cannabinoids stimulate and inhibit testosterone production and. *Life Sciences* 32, 605–612. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(83\)90205-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(83)90205-9)
- Dalterio, S.L., deRoos, D.G., 1986a. Maternal cannabinoid exposure Effects on spermatogenesis in male offspring. *Int J Androl* 9, 250–258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00888.x>
- Dalterio, S.L., deRoos, D.G., 1986b. Maternal cannabinoid exposure Effects on spermatogenesis in male offspring. *Int J Androl* 9, 250–258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00888.x>
- Dalton, W.S., Martz, R., Lemberger, L., Rodda, B.E., Forney, R.B., 1976. Influence of cannabidiol on delta-9-tetrahydrocannabinol effects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 19, 300–309. <https://doi.org/10.1002/cpt1976193300>
- Dann, C.T., Alvarado, A.L., Molyneux, L.A., Denard, B.S., Garbers, D.L., Porteus, M.H., 2008. Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Requires OCT4, a Factor Downregulated During Retinoic Acid-Induced Differentiation. *Stem Cells* 26, 2928–2937. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0134>
- Das, S.K., Paria, B.C., Chakraborty, I., Dey, S.K., 1995. Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4332–4336. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4332>
- Datta, M.W., Renshaw, A.A., Dutta, A., Hoffman, M.A., Loughlin, K.R., 2000a. Evaluation of Cyclin Expression in Testicular Germ Cell Tumors: Cyclin E Correlates with Tumor Type, Advanced Clinical Stage, and Pulmonary Metastasis. *Mod Pathol* 13, 667–672. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880117>
- Datta, M.W., Renshaw, A.A., Dutta, A., Hoffman, M.A., Loughlin, K.R., 2000b. Evaluation of Cyclin Expression in Testicular Germ Cell Tumors: Cyclin E Correlates with Tumor Type, Advanced Clinical Stage, and Pulmonary Metastasis. *Mod Pathol* 13, 667–672. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880117>
- Davey, R.A., Grossmann, M., 2016. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev* 37, 3–15.
- Dax, E.M., Pilotte, N.S., Adler, W.H., Nagel, J.E., Lange, W.R., 1989. The effects of 9-ene-tetrahydrocannabinol on hormone release and immune function. *Journal of Steroid Biochemistry* 34, 263–270. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(89\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0022-4731(89)90090-3)
- Day, N.L., Richardson, G.A., Goldschmidt, L., Robles, N., Taylor, P.M., Stoffer, D.S., Cornelius, M.D., Geva, D., 1994. Effect of prenatal marijuana exposure on the cognitive development of offspring at age three. *Neurotoxicology and Teratology* 16, 169–175. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(94\)90114-7](https://doi.org/10.1016/0892-0362(94)90114-7)

- De Domenico, E., Todaro, F., Rossi, G., Dolci, S., Geremia, R., Rossi, P., Grimaldi, P., 2017a. Overactive type 2 cannabinoid receptor induces meiosis in fetal gonads and impairs ovarian reserve. *Cell Death Dis* 8, e3085. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.496>
- De Domenico, E., Todaro, F., Rossi, G., Dolci, S., Geremia, R., Rossi, P., Grimaldi, P., 2017b. Overactive type 2 cannabinoid receptor induces meiosis in fetal gonads and impairs ovarian reserve. *Cell Death Dis* 8, e3085–e3085. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.496>
- De Felici, M., 2013. Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells, in: Coticchio, G., Albertini, D.F., De Santis, L. (Eds.), *Oogenesis*. Springer London, London, pp. 19–37. https://doi.org/10.1007/978-0-85729-826-3_2
- de filippis, d., iuvone, t., d'amico, a., esposito, g., steardo, l., herman, a. g., pelckmans, p. a., de winter, b. y., de man, j. g., 2008. Effect of cannabidiol on sepsis-induced motility disturbances in mice: involvement of CB₁ receptors and fatty acid amide hydrolase. *Neurogastroenterology & Motility* 20, 919–927. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01114.x>
- De Genna, N.M., Willford, J.A., Richardson, G.A., 2022. Long-term effects of prenatal cannabis exposure: Pathways to adolescent and adult outcomes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 214, 173358. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173358>
- de Jong, J., Stoop, H., Gillis, A.J.M., Hersmus, R., van Gurp, R.J.H.L.M., van de Geijn, G.-J.M., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Schneider, D.T., Sherlock, J.K., Baeten, J., Kitazawa, S., van Zoelen, E.J., van Roozendaal, K., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H.J., 2008. Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes Chromosom. Cancer* 47, 185–196. <https://doi.org/10.1002/gcc.20520>
- de Kretser, D.M., Buzzard, J.J., Okuma, Y., O'Connor, A.E., Hayashi, T., Lin, S.-Y., Morrison, J.R., Loveland, K.L., Hedger, M.P., 2004a. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Molecular and Cellular Endocrinology* 225, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.07.008>
- de Kretser, D.M., Buzzard, J.J., Okuma, Y., O'Connor, A.E., Hayashi, T., Lin, S.-Y., Morrison, J.R., Loveland, K.L., Hedger, M.P., 2004b. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Molecular and Cellular Endocrinology* 225, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.07.008>
- de Meijer, E.P.M., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V.M.C., Ranalli, P., Mandolino, G., 2003. The Inheritance of Chemical Phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics* 163, 335–346. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.1.335>
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A.S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., Di Marzo, V., 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes: Novel pharmacology of minor plant cannabinoids. *British Journal of Pharmacology* 163, 1479–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x>
- de Rooij, D.G., 2015. The spermatogonial stem cell niche in mammals, in: *Sertoli Cell Biology*. Elsevier, pp. 99–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417047-6.00004-1>
- de Rooij, D.G., Griswold, M.D., 2012. Questions About Spermatogonia Posed and Answered Since 2000. *Journal of Andrology* 33, 1085–1095. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016832>
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., Berta, P., 1998. Direct Interaction of SRY-Related Protein SOX9 and Steroidogenic Factor 1 Regulates Transcription of the Human Anti-Müllerian

Hormone Gene. Mol Cell Biol 18, 6653–6665.
<https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6653>

- De Santa Barbara, P., Moniot, B., Poulat, F., Berta, P., 2000. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev. Dyn.* 217, 293–298. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200003\)217:3<293::AID-DVDY7>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200003)217:3<293::AID-DVDY7>3.0.CO;2-P)
- De Toni, L., Garolla, A., Menegazzo, M., Magagna, S., Di Nisio, A., Šabović, I., Rocca, M.S., Scattolini, V., Filippi, A., Foresta, C., 2016. Heat Sensing Receptor TRPV1 Is a Mediator of Thermotaxis in Human Spermatozoa. *PLoS ONE* 11, e0167622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167622>
- DeFalco, T., Potter, S.J., Williams, A.V., Waller, B., Kan, M.J., Capel, B., 2015. Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. *Cell Reports* 12, 1107–1119. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.015>
- Dekker, G.A., Lee, S.Y., North, R.A., McCowan, L.M., Simpson, N.A.B., Roberts, C.T., 2012. Risk Factors for Preterm Birth in an International Prospective Cohort of Nulliparous Women. *PLoS ONE* 7, e39154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039154>
- Demirakca, T., Sartorius, A., Ende, G., Meyer, N., Welzel, H., Skopp, G., Mann, K., Hermann, D., 2010. Diminished gray matter in the hippocampus of cannabis users: Possible protective effects of cannabidiol. *Drug and Alcohol Dependence* S0376871610003364. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.09.020>
- Desdoits-Lethimonier, C., Albert, O., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Courant, F., Lesné, L., Guillé, F., Dejuq-Rainsford, N., Jégou, B., 2012. Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. *Hum Reprod* 27, 1451–1459. <https://doi.org/10.1093/humrep/des069>
- Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Gaudriault, P., Zalko, D., Antignac, J.P., Deceuninck, Y., Platel, C., Dejuq-Rainsford, N., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2017a. Parallel assessment of the effects of bisphenol A and several of its analogs on the adult human testis. *Human Reproduction* 32, 1465–1473. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex093>
- Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Gaudriault, P., Zalko, D., Antignac, J.P., Deceuninck, Y., Platel, C., Dejuq-Rainsford, N., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2017b. Parallel assessment of the effects of bisphenol A and several of its analogs on the adult human testis. *Human Reprod* 32, 1465–1473. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex093>
- Desrosiers, N.A., Himes, S.K., Scheidweiler, K.B., Concheiro-Guisan, M., Gorelick, D.A., Huestis, M.A., 2014. Phase I and II Cannabinoid Disposition in Blood and Plasma of Occasional and Frequent Smokers Following Controlled Smoked Cannabis. *Clinical Chemistry* 60, 631–643. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.216507>
- Deutsch, D.G., 2016. A Personal Retrospective: Elevating Anandamide (AEA) by Targeting Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) and the Fatty Acid Binding Proteins (FABPs). *Front Pharmacol* 7, 370. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00370>
- Devane, W.A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science* 258, 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>
- Dhawan, K., Sharma, A., 2003. Restoration of chronic- Δ^9 -THC-induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linn: Reversal of

- chronic-THC-toxicity by BZF in rats. *British Journal of Pharmacology* 138, 117–120. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705015>
- Dhopeshwarkar, A., Mackie, K., 2016. Functional Selectivity of CB2 Cannabinoid Receptor Ligands at a Canonical and Noncanonical Pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 358, 342–351. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.232561>
- Di Giacomo, D., De Domenico, E., Sette, C., Geremia, R., Grimaldi, P., 2016. Type 2 cannabinoid receptor contributes to the physiological regulation of spermatogenesis. *FASEB j.* 30, 1453–1463. <https://doi.org/10.1096/fj.15-279034>
- Di Marzo, V., 2018. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat Rev Drug Discov* 17, 623–639. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.115>
- Di Marzo, V., Piscitelli, F., 2015. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics* 12, 692–698. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0374-6>
- Dieckmann, K.-P., Skakkebaek, N.E., 1999. Carcinoma in situ of the testis: Review of biological and clinical features. *Int. J. Cancer* 83, 815–822. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19991210\)83:6<815::AID-IJC21>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19991210)83:6<815::AID-IJC21>3.0.CO;2-Z)
- Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., Piomelli, D., 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10819–10824. <https://doi.org/10.1073/pnas.152334899>
- Dinis-Oliveira, R.J., 2016. Metabolomics of Δ^9 -tetrahydrocannabinol: implications in toxicity. *Drug Metabolism Reviews* 48, 80–87. <https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1137307>
- Dixit, V.P., Gupta, C.L., Agrawal, M., 1977. Testicular degeneration and necrosis induced by chronic administration of cannabis extract in dogs. *Endokrinologie* 69, 299–305.
- Dixit, V.P., Lohiya, N.K., 1975. Effects of Cannabis extract on the response of accessory sex organs of adult male mice to testosterone. *Indian J Physiol Pharmacol* 19, 98–100.
- Dixit, V.P., Sharma, V.N., Lohiya, N.K., 1974. The effect of chronically administered cannabis extract on the testicular function of mice. *European Journal of Pharmacology* 26, 111–114. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(74\)90081-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(74)90081-8)
- Dolci, S., Campolo, F., De Felici, M., 2015. Gonadal development and germ cell tumors in mouse and humans. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 45, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.002>
- Donovan, P., 1986. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44, 831–838. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90005-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90005-X)
- D'Souza, D.C., Perry, E., MacDougall, L., Ammerman, Y., Cooper, T., Wu, Y., Braley, G., Gueorguieva, R., Krystal, J.H., 2004. The Psychotomimetic Effects of Intravenous Delta-9-Tetrahydrocannabinol in Healthy Individuals: Implications for Psychosis. *Neuropsychopharmacol* 29, 1558–1572. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300496>
- du Plessis, S., Agarwal, A., Mohanty, G., van der Linde, M., 2015. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J Androl* 17, 230. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.135123>
- du Plessis, S.S., Agarwal, A., Syriac, A., 2015a. Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *J Assist Reprod Genet* 32, 1575–1588. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0553-8>

- du Plessis, S.S., Agarwal, A., Syriac, A., 2015b. Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *J Assist Reprod Genet* 32, 1575–1588. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0553-8>
- Due, W., Dieckmann, K.P., Loy, V., 1988. Immunohistological determination of proliferative activity in seminomas. *Journal of Clinical Pathology* 41, 304–307. <https://doi.org/10.1136/jcp.41.3.304>
- Dumas, A., Simmat-Durand, L., Lejeune, C., 2014. Grossesse et usage de substances psychoactives en France. Synthèse de la littérature. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 43, 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2014.05.008>
- Dumont, L., Rives-Feraille, A., Delessard, M., Saulnier, J., Rondanino, C., Rives, N., 2021. Activation of the cannabinoid receptor type 2 by the agonist JWH133 promotes the first wave of in vitro spermatogenesis. *Andrology* 9, 673–688. <https://doi.org/10.1111/andr.12928>
- Dyba, T., Randi, G., Bray, F., Martos, C., Giusti, F., Nicholson, N., Gavin, A., Flego, M., Neamtiu, L., Dimitrova, N., Negrão Carvalho, R., Ferlay, J., Bettio, M., 2021. The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *European Journal of Cancer* 157, 308–347. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.07.039>
- Dym, M., Fawcett, D.W., 1970. The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartmentation of the Seminiferous Epithelium. *Biology of Reproduction* 3, 308–326. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/3.3.308>
- Eckert, D., Nettersheim, D., Heukamp, L.C., Kitazawa, S., Biermann, K., Schorle, H., 2008. TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture. *Cell Tissue Res* 331, 529–538. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0527-y>
- Ehmcke, J., Schlatt, S., 2006. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction* 132, 673–680. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01081>
- El Marroun, H., Tiemeier, H., Steegers, E.A.P., Jaddoe, V.W.V., Hofman, A., Verhulst, F.C., van den Brink, W., Huizink, A.C., 2009. Intrauterine Cannabis Exposure Affects Fetal Growth Trajectories: The Generation R Study. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 48, 1173–1181. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e3181bfa8ee>
- El Marroun, H., Tiemeier, H., Steegers, E.A.P., Roos-Hesselink, J.W., Jaddoe, V.W.V., Hofman, A., Verhulst, F.C., van den Brink, W., Huizink, A.C., 2010. A prospective study on intrauterine cannabis exposure and fetal blood flow. *Early Human Development* 86, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.03.006>
- Eladak, S., Moison, D., Guerquin, M.-J., Matilionyte, G., Kilcoyne, K., N'Tumba-Byn, T., Messiaen, S., Deceuninck, Y., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Antignac, J.-P., Mitchell, R., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2018. Effects of environmental Bisphenol A exposures on germ cell development and Leydig cell function in the human fetal testis. *PLoS ONE* 13, e0191934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191934>
- Elamo, H.P., Virtanen, H.E., Toppari, J., 2022. Genetics of cryptorchidism and testicular regression. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 36, 101619. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2022.101619>

- Elbendary, M.A., El-Gamal, O.M., Salem, K.A., 2009. Analysis of Risk Factors for Organic Erectile Dysfunction in Egyptian Patients Under the Age of 40 Years. *Journal of Andrology* 30, 520–524. <https://doi.org/10.2164/jandrol.108.007195>
- ElSohly, M.A., Radwan, M.M., Gul, W., Chandra, S., Galal, A., 2017. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L., in: Kinghorn, A.D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J. (Eds.), *Phytocannabinoids, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1
- ElSohly, M.A., Slade, D., 2005. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences* 78, 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.011>
- El-Talatini, M.R., Taylor, A.H., Elson, J.C., Brown, L., Davidson, A.C., Konje, J.C., 2009. Localisation and Function of the Endocannabinoid System in the Human Ovary. *PLoS ONE* 4, e4579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004579>
- Emmen, J.M., McLuskey, A., Grootegoed, J.A., Brinkmann, A.O., 1998. Androgen action during male sex differentiation includes suppression of cranial suspensory ligament development. *Human Reproduction* 13, 1272–1280. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.5.1272>
- Encyclopaedia Britannica, 2013 [WWW Document], n.d. URL <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis> (accessed 6.30.22).
- Endo, T., Mikedis, M.M., Nicholls, P.K., Page, D.C., de Rooij, D.G., 2019. Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules* 9, 775. <https://doi.org/10.3390/biom9120775>
- English, D.R., Hulse, G.K., Milne, E., Holman, C.D., Bower, C.I., 1997. Maternal cannabis use and birth weight: a meta-analysis. *Addiction* 92, 1553–1560.
- Englund, A., Morrison, P.D., Nottage, J., Hague, D., Kane, F., Bonaccorso, S., Stone, J.M., Reichenberg, A., Brenneisen, R., Holt, D., Feilding, A., Walker, L., Murray, R.M., Kapur, S., 2013. Cannabidiol inhibits THC-elicited paranoid symptoms and hippocampal-dependent memory impairment. *J Psychopharmacol* 27, 19–27. <https://doi.org/10.1177/0269881112460109>
- Ernesto Perez, L., Smith, C.G., Asch, R.H., 1981. Δ^9 -tetrahydrocannabinol inhibits fructose utilization and motility in human, rhesus monkey, and rabbit sperm in vitro*. *Fertility and Sterility* 35, 703–705. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)45569-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)45569-X)
- Esposito, G., Pesce, M., Seguela, L., Sanseverino, W., Lu, J., Corpetti, C., Sarnelli, G., 2020. The potential of cannabidiol in the COVID-19 pandemic. *Br J Pharmacol* 177, 4967–4970. <https://doi.org/10.1111/bph.15157>
- Eubler, K., Herrmann, C., Tiefenbacher, A., Köhn, F.-M., Schwarzer, J.U., Kunz, L., Mayerhofer, A., 2018. Ca^{2+} Signaling and IL-8 Secretion in Human Testicular Peritubular Cells Involve the Cation Channel TRPV2. *Int J Mol Sci* 19, E2829. <https://doi.org/10.3390/ijms19092829>
- Eubler, K., Rantakari, P., Gerke, H., Herrmann, C., Missel, A., Schmid, N., Walenta, L., Lahiri, S., Imhof, A., Strauss, L., Poutanen, M., Mayerhofer, A., 2021. Exploring the Ion Channel TRPV2 and Testicular Macrophages in Mouse Testis. *Int J Mol Sci* 22, 4727. <https://doi.org/10.3390/ijms22094727>
- Ezechukwu, H.C., Diya, C.A., Shrestha, N., Hryciw, D.H., 2020. Role for endocannabinoids in early pregnancy: recent advances and the effects of cannabis use. *American Journal*

- of Physiology-Endocrinology and Metabolism 319, E557–E561.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00210.2020>
- Fabritius, M., Chtioui, H., Battistella, G., Annoni, J.-M., Dao, K., Favrat, B., Fornari, E., Lauer, E., Maeder, P., Giroud, C., 2013. Comparison of cannabinoid concentrations in oral fluid and whole blood between occasional and regular cannabis smokers prior to and after smoking a cannabis joint. *Anal Bioanal Chem* 405, 9791–9803.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7412-1>
- Facchini, G., Rossetti, S., Berretta, M., Cavaliere, C., D’Aniello, C., Iovane, G., Mollo, G., Capasso, M., Della Pepa, C., Pesce, L., Facchini, S., Imbimbo, C., Pisconti, S., 2019. Prognostic and predictive factors in testicular cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 23, 3885–3891.
https://doi.org/10.26355/eurev_201905_17816
- Falcon, M., Pichini, S., Joya, J., Pujadas, M., Sanchez, A., Vall, O., Algar, O.G., Luna, A., de la Torre, R., Rotolo, M.C., Pellegrini, M., 2012. Maternal hair testing for the assessment of fetal exposure to drug of abuse during early pregnancy: Comparison with testing in placental and fetal remains. *Forensic Science International* 218, 92–96.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.022>
- Fang, X., Hu, S., Xu, B., Snyder, G.D., Harmon, S., Yao, J., Liu, Y., Sangras, B., Falck, J.R., Weintraub, N.L., Spector, A.A., 2006. 14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor- α . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 290, H55–H63.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00427.2005>
- Fantus, R.J., Lokeshwar, S.D., Kohn, T.P., Ramasamy, R., 2020. The effect of tetrahydrocannabinol on testosterone among men in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey. *World J Urol* 38, 3275–3282.
<https://doi.org/10.1007/s00345-020-03110-5>
- Faria, M.J.S., Simões, Z.L.P., Lunardi, L.O., Hartfelder, K., 2003. Apoptosis Process in Mouse Leydig Cells during Postnatal Development. *Microsc Microanal* 9, 68–73.
<https://doi.org/10.1017/S1431927603030101>
- Fasano, S., Meccariello, R., Cobellis, G., Chianese, R., Cacciola, G., Chioccarelli, T., Pierantoni, R., 2009. The endocannabinoid system: an ancient signaling involved in the control of male fertility. *Ann N Y Acad Sci* 1163, 112–124. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04437.x>
- Fawzy, F., Hussein, A., Eid, M.M., El Kashash, A.M., Salem, H.K., 2015. Cryptorchidism and Fertility. *Clin Med Insights Reprod Health* 9, 39–43.
<https://doi.org/10.4137/CMRH.S25056>
- Fayomi, A.P., Orwig, K.E., 2018. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research* 29, 207–214.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.04.009>
- Feinshtein, V., Erez, O., Ben-Zvi, Z., Eshkoli, T., Sheizaf, B., Sheiner, E., Holcberg, G., 2013. Cannabidiol enhances xenobiotic permeability through the human placental barrier by direct inhibition of breast cancer resistance protein: an ex vivo study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 209, 573.e1-573.e15.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.08.005>
- Femández-Ruiz, J.J., Muñoz, R.M., Romero, J., Villanua, M.A., Makriyannis, A., Ramos, JoséA., 1997. Time course of the effects of different cannabimimetics on prolactin and gonadotrophin secretion: Evidence for the presence of CB1 receptors in

- hypothalamic structures and their involvement in the effects of cannabimimetics. *Biochemical Pharmacology* 53, 1919–1927. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00168-8)
- Feng, C.-W., Bowles, J., Koopman, P., 2014. Control of mammalian germ cell entry into meiosis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382, 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.026>
- Feng, S., Ferlin, A., Truong, A., Bathgate, R., Wade, J.D., Corbett, S., Han, S., Tannour-Louet, M., Lamb, D.J., Foresta, C., AgoulNIK, A.I., 2009. INSL3/RXFP2 Signaling in Testicular Descent: Mice and Men. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1160, 197–204. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03841.x>
- Ferguson, L., AgoulNIK, A.I., 2013. Testicular cancer and cryptorchidism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 32. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00032>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fernandez, E., Peterseil, V., Hackl, G., Menges, S., Meijer, E., Staginnus, C., 2020. Distribution of Chemical Phenotypes (Chemotypes) in European Agricultural Hemp (*Cannabis sativa* L.) Cultivars. *J Forensic Sci* 65, 715–721. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14242>
- Fernández-Ruiz, J.J., Berrendero, F., Hernández, M.L., Romero, J., Ramos, J.A., 1999. Role of endocannabinoids in brain development. *Life Sciences* 65, 725–736. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00295-7)
- Fetterman, P.S., Keith, E.S., Waller, C.W., Guerrero, O., Doorenbos, N.J., Quimby, M.W., 1971. Mississippi-Grown *Cannabis sativa* L.: Preliminary Observation on Chemical Definition of Phenotype and Variations in Tetrahydrocannabinol Content versus Age, Sex, and Plant Part. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 60, 1246–1249. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600832>
- Fijak, M., Bhushan, S., Meinhardt, A., 2010. Immunoprivileged Sites: The Testis, in: Cuturi, M.C., Anegón, I. (Eds.), *Suppression and Regulation of Immune Responses, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 459–470. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0_29
- Filipponi, D., Hobbs, R.M., Ottolenghi, S., Rossi, P., Jannini, E.A., Pandolfi, P.P., Dolci, S., 2007. Repression of kit Expression by Plzf in Germ Cells. *Mol Cell Biol* 27, 6770–6781. <https://doi.org/10.1128/MCB.00479-07>
- Fischer, B., Lee, A., Robinson, T., Hall, W., 2021. An overview of select cannabis use and supply indicators pre- and post-legalization in Canada. *Subst Abuse Treat Prev Policy* 16, 77. <https://doi.org/10.1186/s13011-021-00405-7>
- Fisher, S.E., Atkinson, M., Chang, B., 1987. Effect of Δ -9-Tetrahydrocannabinol on the in Vitro Uptake of α -Amino Isobutyric Acid by Term Human Placental Slices. *Pediatr Res* 21, 104–107. <https://doi.org/10.1203/00006450-198701000-00022>
- Fleischman, R.W., Hayden, D.W., Rosenkrantz, H., Braude, M.C., 1975. Teratologic evaluation of Δ 9-tetrahydrocannabinol in mice, including a review of the literature. *Teratology* 12, 47–50. <https://doi.org/10.1002/tera.1420120106>
- Flenkenthaler, F., Windschüttl, S., Fröhlich, T., Schwarzer, J.U., Mayerhofer, A., Arnold, G.J., 2014. Secretome Analysis of Testicular Peritubular Cells: A Window into the Human

- Testicular Microenvironment and the Spermatogonial Stem Cell Niche in Man. *J. Proteome Res.* 13, 1259–1269. <https://doi.org/10.1021/pr400769z>
- Flück, C.E., Meyer-Böni, M., Pandey, A.V., Kempná, P., Miller, W.L., Schoenle, E.J., Bignon-Lauber, A., 2011. Why Boys Will Be Boys: Two Pathways of Fetal Testicular Androgen Biosynthesis Are Needed for Male Sexual Differentiation. *The American Journal of Human Genetics* 89, 201–218. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.009>
- Flück, C.E., Pandey, A.V., 2014. Steroidogenesis of the testis – new genes and pathways. *Annales d'Endocrinologie* 75, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.002>
- Fonseca, B.M., Correia-da-Silva, G., Taylor, A.H., Konje, J.C., Bell, S.C., Teixeira, N.A., 2009. Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development. *Reprod Biol Endocrinol* 7, 121. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-121>
- Fonseca, B.M., Correia-da-Silva, G., Taylor, A.H., Lam, P.M.W., Marczylo, T.H., Konje, J.C., Bell, S.C., Teixeira, N.A., 2010. N-Acylethanolamine Levels and Expression of Their Metabolizing Enzymes during Pregnancy. *Endocrinology* 151, 3965–3974. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1424>
- Fonseca, B.M., Correia-da-Silva, G., Taylor, A.H., Lam, P.M.W., Marczylo, T.H., Konje, J.C., Teixeira, N.A., 2012. Characterisation of the endocannabinoid system in rat haemochorial placenta. *Reproductive Toxicology* 34, 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.036>
- Fonseca, B.M., Correia-da-Silva, G., Teixeira, N.A., 2013. The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation. *Apoptosis* 18, 1526–1535. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0892-9>
- Fonseca, B.M., Rebelo, I., 2021. Cannabis and Cannabinoids in Reproduction and Fertility: Where We Stand. *Reprod. Sci.* <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00588-1>
- Forest, M.G., Cathiard, A.M., Bertrand, J.A., 1973. EVIDENCE OF TESTICULAR ACTIVITY IN EARLY INFANCY. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 37, 148–151. <https://doi.org/10.1210/jcem-37-1-148>
- Forest, M.G., Sizonenko, P.C., Cathiard, A.M., Bertrand, J., 1974. Hypophyso-Gonadal Function in Humans during the First Year of Life. *J. Clin. Invest.* 53, 819–828. <https://doi.org/10.1172/JCI107621>
- Forrester, M.B., Merz, R.D., 2006. Risk of Selected Birth Defects with Prenatal Illicit Drug Use, Hawaii, 1986–2002. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 70, 7–18. <https://doi.org/10.1080/15287390600748799>
- Fraguas-Sánchez, A.I., Torres-Suárez, A.I., 2018. Medical Use of Cannabinoids. *Drugs* 78, 1665–1703. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0996-1>
- França, L.R., Hess, R.A., Dufour, J.M., Hofmann, M.C., Griswold, M.D., 2016. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4, 189–212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>
- Françavilla, F., Battista, N., Barbonetti, A., Vassallo, M.R.C., Rapino, C., Antonangelo, C., Pasquariello, N., Catanzaro, G., Barboni, B., Maccarrone, M., 2009. Characterization of the Endocannabinoid System in Human Spermatozoa and Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Their Fertilizing Ability. *Endocrinology* 150, 4692–4700. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0057>

- Francou, M.M., Girela, J.L., De Juan, A., Ten, J., Bernabeu, R., De Juan, J., 2017. Human sperm motility, capacitation and acrosome reaction are impaired by 2-arachidonoylglycerol endocannabinoid. *Histology and Histopathology* 1351–1358. <https://doi.org/10.14670/HH-11-911>
- Freeman, A.M., Petrilli, K., Lees, R., Hindocha, C., Mokrysz, C., Curran, H.V., Saunders, R., Freeman, T.P., 2019. How does cannabidiol (CBD) influence the acute effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans? A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 107, 696–712. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.036>
- Freeman, T.P., Hindocha, C., Green, S.F., Bloomfield, M.A.P., 2019. Medicinal use of cannabis based products and cannabinoids. *BMJ* l1141. <https://doi.org/10.1136/bmj.l1141>
- Freeman, T.P., Pope, R.A., Wall, M.B., Bisby, J.A., Luijten, M., Hindocha, C., Mokrysz, C., Lawn, W., Moss, A., Bloomfield, M.A.P., Morgan, C.J.A., Nutt, D.J., Curran, H.V., 2018. Cannabis Dampens the Effects of Music in Brain Regions Sensitive to Reward and Emotion. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 21, 21–32. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx082>
- Freudenthal, R.I., Martin, J., Wall, M.E., 1972. Distribution of Δ 9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *British Journal of Pharmacology* 44, 244–249. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1972.tb07260.x>
- Fride, E., 2008. Multiple Roles for the Endocannabinoid System During the Earliest Stages of Life: Pre- and Postnatal Development. *J Neuroendocrinol* 20, 75–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01670.x>
- Fried, P.A., Charlebois, A.T., 1979a. Effects upon rat offspring following cannabis inhalation before and/or after mating. *Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie* 33, 125–132. <https://doi.org/10.1037/h0081710>
- Fried, P.A., Charlebois, A.T., 1979b. Cannabis administered during pregnancy: First- and second-generation effects in rats. *Psychobiology* 7, 307–310. <https://doi.org/10.3758/BF03326647>
- Fried, P.A., Watkinson, B., Willan, A., 1984a. Marijuana use during pregnancy and decreased length of gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 150, 23–27. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(84\)80103-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(84)80103-9)
- Fried, P.A., Watkinson, B., Willan, A., 1984b. Marijuana use during pregnancy and decreased length of gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 150, 23–27. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(84\)80103-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(84)80103-9)
- Friedrich, G., Nepita, W., André, T., 1990. [Serum testosterone concentrations in cannabis and opiate users]. *Beitr Gerichtl Med* 48, 57–66.
- Frydman, N., Poulain, M., Arkoun, B., Duquenne, C., Tourpin, S., Messiaen, S., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., Benachi, A., Livera, G., 2017. Human foetal ovary shares meiotic preventing factors with the developing testis. *Hum. Reprod. humrep;dew343v1*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew343>
- Fujimoto, T., Miyayama, Y., Fuyuta, M., 1977. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat. Rec.* 188, 315–329. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880305>
- Fukawa, T., Kanayama, H., 2018. Current knowledge of risk factors for testicular germ cell tumors. *Int. J. Urol.* 25, 337–344. <https://doi.org/10.1111/iju.13519>
- Funahashi, T., Ikeuchi, H., Yamaori, S., Kimura, T., Yamamoto, I., Watanabe, K., 2005. In Vitro Inhibitory Effects of Cannabinoids on Progesterone 17.ALPHA.-Hydroxylase Activity in

- Rat Testis Microsomes. *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE* 51, 369–375. <https://doi.org/10.1248/jhs.51.369>
- Fusar-Poli, P., Crippa, J.A., Bhattacharyya, S., Borgwardt, S.J., Allen, P., Martin-Santos, R., Seal, M., Surguladze, S.A., O'Carroll, C., Atakan, Z., Zuardi, A.W., McGuire, P.K., 2009. Distinct Effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Neural Activation During Emotional Processing. *Arch Gen Psychiatry* 66, 95. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2008.519>
- Fuss, A., 1912. Über die Geschlechtszellen des Menschen und der Säugetiere. *Archiv f. mikr. Anat.* 81, a1–a23. <https://doi.org/10.1007/BF02980550>
- Gabrielli, M., Battista, N., Riganti, L., Prada, I., Antonucci, F., Cantone, L., Matteoli, M., Maccarrone, M., Verderio, C., 2015. Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Rep* 16, 213–220. <https://doi.org/10.15252/embr.201439668>
- Gado, F., Meini, S., Bertini, S., Digiaco, M., Macchia, M., Manera, C., 2019. Allosteric modulators targeting cannabinoid cb1 and cb2 receptors: implications for drug discovery. *Future Medicinal Chemistry* 11, 2019–2037. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0005>
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussosoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Fur, G., Casellas, P., 1995. Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *Eur J Biochem* 232, 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x>
- Galve-Roperh, I., Palazuelos, J., Aguado, T., Guzmán, M., 2009. The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259, 371–382. <https://doi.org/10.1007/s00406-009-0028-y>
- Gammon, C.M., Freeman, G.M., Xie, W., Petersen, S.L., Wetsel, W.C., 2005. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion by Cannabinoids. *Endocrinology* 146, 4491–4499. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1672>
- Gantz, I., Muraoka, A., Yang, Y.K., Samuelson, L.C., Zimmerman, E.M., Cook, H., Yamada, T., 1997. Cloning and chromosomal localization of a gene (GPR18) encoding a novel seven transmembrane receptor highly expressed in spleen and testis. *Genomics* 42, 462–466. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4752>
- Gardner, P.J., Holyoke, E.A., 1964. Fine structure of the seminiferous tubule of the Swiss mouse. I. The limiting membrane, sertoli cell, spermatogonia, and spermatocytes. *Anat. Rec.* 150, 391–404. <https://doi.org/10.1002/ar.1091500407>
- Gaskell, T.L., Esnal, A., Robinson, L.L.L., Anderson, R.A., Saunders, P.T.K., 2004. Immunohistochemical Profiling of Germ Cells Within the Human Fetal Testis: Identification of Three Subpopulations. *Biology of Reproduction* 71, 2012–2021. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028381>
- Gassei, K., Schlatt, S., 2007. Testicular Morphogenesis: Comparison of In Vivo and In Vitro Models to Study Male Gonadal Development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1120, 152–167. <https://doi.org/10.1196/annals.1411.015>
- Gaston, T.E., Friedman, D., 2017. Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 70, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.016>
- Gatta-Cherifi, B., Matias, I., Vallée, M., Tabarin, A., Marsicano, G., Piazza, P.V., Cota, D., 2012. Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid

- anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity. *Int J Obes* 36, 880–885. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.165>
- Gebeh, A.K., Willets, J.M., Bari, M., Hirst, R.A., Marczylo, T.H., Taylor, A.H., Maccarrone, M., Konje, J.C., 2013. Elevated Anandamide and Related *N*-Acylethanolamine Levels Occur in the Peripheral Blood of Women With Ectopic Pregnancy and Are Mirrored by Changes in Peripheral Fatty Acid Amide Hydrolase Activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98, 1226–1234. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3390>
- Gees, M., Owsianik, G., Nilius, B., Voets, T., 2012. TRP Channels, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 563–608. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110026>
- Generoso, W.M., Cain, K.T., Cornett, C.V., Shelby, M.D., 1985. Tests for induction of dominant-lethal mutations and heritable translocations with tetrahydrocannabinol in male mice. *Mutation Research Letters* 143, 51–53. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(85\)90104-6](https://doi.org/10.1016/0165-7992(85)90104-6)
- Gérard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M., 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochemical Journal* 279, 129–134. <https://doi.org/10.1042/bj2790129>
- Ghasemiesfe, M., Barrow, B., Leonard, S., Keyhani, S., Korenstein, D., 2019a. Association Between Marijuana Use and Risk of Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* 2, e1916318. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.16318>
- Ghasemiesfe, M., Barrow, B., Leonard, S., Keyhani, S., Korenstein, D., 2019b. Association Between Marijuana Use and Risk of Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* 2, e1916318. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.16318>
- Gieringer, D., St. Laurent, J., Goodrich, S., 2004. Cannabis Vaporizer Combines Efficient Delivery of THC with Effective Suppression of Pyrolytic Compounds. *Journal of Cannabis Therapeutics* 4, 7–27. https://doi.org/10.1300/J175v04n01_02
- Gieringer, D.H., 2001. Cannabis “Vaporization”: A Promising Strategy for Smoke Harm Reduction. *Journal of Cannabis Therapeutics* 1, 153–170. https://doi.org/10.1300/J175v01n03_10
- Gilbert, M.T., Sulik, K.K., Fish, E.W., Baker, L.K., Dehart, D.B., Parnell, S.E., 2016. Dose-dependent teratogenicity of the synthetic cannabinoid CP-55,940 in mice. *Neurotoxicology and Teratology* 58, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.12.004>
- Ginsburg, M., Snow, M.H., McLaren, A., 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521–528. <https://doi.org/10.1242/dev.110.2.521>
- Glass, M., Felder, C.C., 1997. Concurrent Stimulation of Cannabinoid CB1 and Dopamine D2 Receptors Augments cAMP Accumulation in Striatal Neurons: Evidence for a G_s Linkage to the CB1 Receptor. *J. Neurosci.* 17, 5327–5333. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05327.1997>
- Goldschmidt, L., Day, N.L., Richardson, G.A., 2000. Effects of prenatal marijuana exposure on child behavior problems at age 10. *Neurotoxicology and Teratology* 22, 325–336. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(00\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(00)00066-0)

- Gonçalves, E.C.D., Baldasso, G.M., Bicca, M.A., Paes, R.S., Capasso, R., Dutra, R.C., 2020. Terpenoids, Cannabimimetic Ligands, beyond the Cannabis Plant. *Molecules* 25, 1567. <https://doi.org/10.3390/molecules25071567>
- Gondos, B., 1981. Cellular interrelationships in the human fetal ovary and testis. *Prog Clin Biol Res* 59B, 373–381.
- Gondos, B., Hobel, C.J., 1971. Ultrastructure of germ cell development in the human fetal testis. *Z. Zellforsch.* 119, 1–20. <https://doi.org/10.1007/BF00330535>
- González, S., Bisogno, T., Wenger, T., Manzanares, J., Milone, A., Berrendero, F., Di Marzo, V., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., 2000. Sex Steroid Influence on Cannabinoid CB1 Receptor mRNA and Endocannabinoid Levels in the Anterior Pituitary Gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270, 260–266. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2406>
- González, S., Manzanares, J., Berrendero, F., Wenger, T., Corchero, J., Bisogno, T., Romero, J., Fuentes, J.A., Di Marzo, V., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J., 1999. Identification of Endocannabinoids and Cannabinoid CB₁ Receptor mRNA in the Pituitary Gland. *Neuroendocrinology* 70, 137–145. <https://doi.org/10.1159/000054468>
- Goodwin, R.S., Gustafson, R.A., Barnes, A., Nebro, W., Moolchan, E.T., Huestis, M.A., 2006. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and 11-Nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Human Plasma After Controlled Oral Administration of Cannabinoids: Therapeutic Drug Monitoring 28, 545–551. <https://doi.org/10.1097/00007691-200608000-00010>
- Gorzalka, B.B., Dang, S.S., 2012. Minireview: Endocannabinoids and Gonadal Hormones: Bidirectional Interactions in Physiology and Behavior. *Endocrinology* 153, 1016–1024. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1643>
- Gorzalka, B.B., Hill, M.N., Chang, S.C.H., 2010. Male–female differences in the effects of cannabinoids on sexual behavior and gonadal hormone function. *Hormones and Behavior* 58, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.08.009>
- Grant, K.S., Conover, E., Chambers, C.D., 2020. Update on the developmental consequences of cannabis use during pregnancy and lactation. *Birth Defects Research* 112, 1126–1138. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1766>
- Grant, K.S., Petroff, R., Isoherranen, N., Stella, N., Burbacher, T.M., 2018. Cannabis use during pregnancy: Pharmacokinetics and effects on child development. *Pharmacology & Therapeutics* 182, 133–151. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.014>
- Greenbaum, M.P., Iwamori, T., Buchold, G.M., Matzuk, M.M., 2011. Germ Cell Intercellular Bridges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a005850–a005850. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005850>
- Greene, M.L., Saunders, D.R., 1974. Metabolism of tetrahydrocannabinol by the small intestine. *Gastroenterology* 66, 365–372.
- Greenland, S., Staisch, K.J., Brown, N., Gross, S.J., 1982. The effects of marijuana use during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 143, 408–413. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(82\)90082-5](https://doi.org/10.1016/0002-9378(82)90082-5)
- Grimaldi, P., Di Giacomo, D., Geremia, R., 2013. The Endocannabinoid System and Spermatogenesis. *Front. Endocrinol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00192>
- Grimaldi, P., Orlando, P., Di Siena, S., Lolicato, F., Petrosino, S., Bisogno, T., Geremia, R., De Petrocellis, L., Di Marzo, V., 2009a. The endocannabinoid system and pivotal role of

- the CB₂ receptor in mouse spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11131–11136. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812789106>
- Grimaldi, P., Rossi, G., Catanzaro, G., Maccarrone, M., 2009b. Chapter 10 Modulation of the Endocannabinoid-Degrading Enzyme Fatty Acid Amide Hydrolase by Follicle-Stimulating Hormone, in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 231–261. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(09\)81010-8](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(09)81010-8)
- Grino, P.B., Griffin, J.E., Wilson, J.D., 1990. Testosterone at High Concentrations Interacts with the Human Androgen Receptor Similarly to Dihydrotestosterone*. *Endocrinology* 126, 1165–1172. <https://doi.org/10.1210/endo-126-2-1165>
- Griswold, M.D., 2016. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews* 96, 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>
- Griswold, S.L., Behringer, R.R., 2009. Fetal Leydig Cell Origin and Development. *Sex Dev* 3, 1–15. <https://doi.org/10.1159/000200077>
- Grotenhermen, F., 2003. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids: Clinical Pharmacokinetics 42, 327–360. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00003>
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245–250. <https://doi.org/10.1038/346245a0>
- Guerquin, M.-J., Duquenne, C., Lahaye, J.-B., Tourpin, S., Habert, R., Livera, G., 2010. New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Developmental Biology* 346, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.08.002>
- Guimiot, F., Chevrier, L., Dreux, S., Chevenne, D., Caraty, A., Delezoide, A.L., de Roux, N., 2012. Negative Fetal FSH/LH Regulation in Late Pregnancy Is Associated with Declined Kisspeptin/KISS1R Expression in the Tuberal Hypothalamus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, E2221–E2229. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2078>
- Gundersen, T.D., Jørgensen, N., Andersson, A.-M., Bang, A.K., Nordkap, L., Skakkebaek, N.E., Priskorn, L., Juul, A., Jensen, T.K., 2015. Association Between Use of Marijuana and Male Reproductive Hormones and Semen Quality: A Study Among 1,215 Healthy Young Men. *Am. J. Epidemiol.* 182, 473–481. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv135>
- Gunn, J.K.L., Rosales, C.B., Center, K.E., Nuñez, A., Gibson, S.J., Christ, C., Ehiri, J.E., 2016. Prenatal exposure to cannabis and maternal and child health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 6, e009986. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009986>
- Guo, F., Yan, L., Guo, H., Li, L., Hu, B., Zhao, Y., Yong, J., Hu, Y., Wang, X., Wei, Y., Wang, W., Li, R., Yan, J., Zhi, X., Zhang, Y., Jin, H., Zhang, W., Hou, Y., Zhu, P., Li, J., Zhang, L., Liu, S., Ren, Y., Zhu, X., Wen, L., Gao, Y.Q., Tang, F., Qiao, J., 2015. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell* 161, 1437–1452. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.015>
- Guo, J., Grow, E.J., Mlcochova, H., Maher, G.J., Lindskog, C., Nie, X., Guo, Y., Takei, Y., Yun, J., Cai, L., Kim, R., Carrell, D.T., Goriely, A., Hotaling, J.M., Cairns, B.R., 2018. The adult human testis transcriptional cell atlas. *Cell Res* 28, 1141–1157. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0099-2>
- Guo, J., Nie, X., Giebler, M., Mlcochova, H., Wang, Y., Grow, E.J., Kim, R., Tharmalingam, M., Matilionyte, G., Lindskog, C., Carrell, D.T., Mitchell, R.T., Goriely, A., Hotaling, J.M., Cairns, B.R., 2020. The Dynamic Transcriptional Cell Atlas of Testis Development

- during Human Puberty. *Cell Stem Cell* 26, 262-276.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.005>
- Guo, J., Sosa, E., Chitiashvili, T., Nie, X., Rojas, E.J., Oliver, E., Plath, K., Hotaling, J.M., Stukenborg, J.-B., Clark, A.T., Cairns, B.R., 2021. Single-cell analysis of the developing human testis reveals somatic niche cell specification and fetal germline stem cell establishment. *Cell Stem Cell* 28, 764-778.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.12.004>
- Guo, Y., Wang, H., Okamoto, Y., Ueda, N., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., Schmid, H.H.O., Das, S.K., Dey, S.K., 2005. N-Acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing Phospholipase D Is an Important Determinant of Uterine Anandamide Levels during Implantation. *Journal of Biological Chemistry* 280, 23429–23432. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500168200>
- Guraya, S.S., 2000. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa, in: *International Review of Cytology*. Elsevier, pp. 1–64. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(00\)99001-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(00)99001-6)
- Gurney, J., Shaw, C., Stanley, J., Signal, V., Sarfati, D., 2015a. Cannabis exposure and risk of testicular cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 15, 897. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1905-6>
- Gurney, J., Shaw, C., Stanley, J., Signal, V., Sarfati, D., 2015b. Cannabis exposure and risk of testicular cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 15, 897. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1905-6>
- Gurney, J.K., Florio, A.A., Znaor, A., Ferlay, J., Laversanne, M., Sarfati, D., Bray, F., McGlynn, K.A., 2019. International Trends in the Incidence of Testicular Cancer: Lessons from 35 Years and 41 Countries. *European Urology* 76, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.07.002>
- Gurney, J.K., McGlynn, K.A., Stanley, J., Merriman, T., Signal, V., Shaw, C., Edwards, R., Richiardi, L., Hutson, J., Sarfati, D., 2017. Risk factors for cryptorchidism. *Nat Rev Urol* 14, 534–548. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.90>
- Guy, G.W., Robson, P.J., 2004. A Phase I, Double Blind, Three-Way Crossover Study to Assess the Pharmacokinetic Profile of Cannabis Based Medicine Extract (CBME) Administered Sublingually in Variant Cannabinoid Ratios in Normal Healthy Male Volunteers (GWPK0215). *Journal of Cannabis Therapeutics* 3, 121–152. https://doi.org/10.1300/J175v03n04_02
- Habayeb, O.M.H., Taylor, A.H., Bell, S.C., Taylor, D.J., Konje, J.C., 2008a. Expression of the Endocannabinoid System in Human First Trimester Placenta and Its Role in Trophoblast Proliferation. *Endocrinology* 149, 5052–5060. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1799>
- Habayeb, O.M.H., Taylor, A.H., Evans, M.D., Cooke, M.S., Taylor, D.J., Bell, S.C., Konje, J.C., 2004. Plasma Levels of the Endocannabinoid Anandamide in Women—A Potential Role in Pregnancy Maintenance and Labor? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, 5482–5487. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0681>
- Habayeb, O.M.H., Taylor, A.H., Finney, M., Evans, M.D., Konje, J.C., 2008b. Plasma Anandamide Concentration and Pregnancy Outcome in Women With Threatened Miscarriage. *JAMA* 299, 1135. <https://doi.org/10.1001/jama.299.10.1135>
- Habert, R., Lejeune, H., Saez, J.M., 2001. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 179, 47–74. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00461-0)

- Habert, R., Muczynski, V., Lehraiki, A., Lambrot, R., L'Åšcureuil, C., Levacher, C., Coffigny, H., Pairault, C., Moison, D., Frydman, R., Rouiller-Fabre, V., 2010. Adverse effects of endocrine disruptors on the foetal testis development: focus on the phthalates. *Folia Histochem Cytobiol.* 47, 67–74. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0056-5>
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., 1995. Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene. *Development* 121, 1603–1614. <https://doi.org/10.1242/dev.121.6.1603>
- Hadziselimovic, F., 2017. On the descent of the epididymo-testicular unit, cryptorchidism, and prevention of infertility. *Basic Clin Androl* 27, 21. <https://doi.org/10.1186/s12610-017-0065-8>
- Hadžiselimovič, F., Thommen, L., Girard, J., Herzog, B., 1986. The Significance of Postnatal Gonadotropin Surge for Testicular Development in Normal and Cryptorchid Testes. *Journal of Urology* 136, 274–276. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)44839-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)44839-7)
- Hagen, C., McNeilly, A.S., 1977. The gonadotrophins and their subunits in foetal pituitary glands and circulation. *Journal of Steroid Biochemistry* 8, 537–544. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(77\)90259-X](https://doi.org/10.1016/0022-4731(77)90259-X)
- Haider, S.G., 2004. Cell Biology of Leydig Cells in the Testis, in: *International Review of Cytology*. Elsevier, pp. 181–241. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)33005-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)33005-6)
- Hájková, A., Techlovská, Š., Dvořáková, M., Chambers, J.N., Kumpošt, J., Hubálková, P., Prezeau, L., Blahos, J., 2016. SGIP1 alters internalization and modulates signaling of activated cannabinoid receptor 1 in a biased manner. *Neuropharmacology* 107, 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.008>
- Hakkola, J., Raunio, H., Purkunen, R., Pelkonen, O., Saarikoski, S., Cresteil, T., Pasanen, M., 1996. Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochemical Pharmacology* 52, 379–383. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00216-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00216-X)
- Hakkola, J., Raunio, H., Purkunen, R., Saarikoski, S., Vähäkangas, K., Pelkonen, O., Edwards, R.J., Boobis, A.R., Pasanen, M., 2001. Cytochrome P450 3A Expression in the Human Fetal Liver: Evidence that CYP3A5 Is Expressed in Only a Limited Number of Fetal Livers. *Neonatology* 80, 193–201. <https://doi.org/10.1159/000047142>
- Halikas, J., Weller, R., Morse, C., 1982. Effects of Regular Marijuana Use on Sexual Performance. *Journal of Psychoactive Drugs* 14, 59–70. <https://doi.org/10.1080/02791072.1982.10471911>
- Hall, W., Lynskey, M., 2020. Assessing the public health impacts of legalizing recreational cannabis use: the US experience. *World Psychiatry* 19, 179–186. <https://doi.org/10.1002/wps.20735>
- Hallak, J.E.C., Machado-de-Sousa, J.P., Crippa, J.A.S., Sanches, R.F., Trzesniak, C., Chaves, C., Bernardo, S.A., Regalo, S.C., Zuardi, A.W., 2010. Performance of schizophrenic patients in the Stroop Color Word Test and electrodermal responsiveness after acute administration of cannabidiol (CBD). *Rev. Bras. Psiquiatr.* 32, 56–61. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462010000100011>
- Halldin, M.M., Widman, M., V Bahr, C., Lindgren, J.E., Martin, B.R., 1982. Identification of in vitro metabolites of delta 1-tetrahydrocannabinol formed by human livers. *Drug Metab Dispos* 10, 297–301.
- Hallmark, N., Walker, M., McKinnell, C., Mahood, I.K., Scott, H., Bayne, R., Coutts, S., Anderson, R.A., Greig, I., Morris, K., Sharpe, R.M., 2007. Effects of monobutyl and di(n-butyl) phthalate in vitro on steroidogenesis and Leydig cell aggregation in fetal

- testis explants from the rat: comparison with effects in vivo in the fetal rat and neonatal marmoset and in vitro in the human. *Environ Health Perspect* 115, 390–396. <https://doi.org/10.1289/ehp.9490>
- Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J., Wink, D., 1998. Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8268–8273. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8268>
- Hampson, A.J., Hill, W.A.G., Zan-Phillips, M., Makriyannis, A., Leung, E., Eglen, R.M., Bornheim, L.M., 1995. Anandamide hydroxylation by brain lipoxygenase: metabolite structures and potencies at the cannabinoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1259, 173–179. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00157-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00157-8)
- Haney, M., Malcolm, R.J., Babalonis, S., Nuzzo, P.A., Cooper, Z.D., Bedi, G., Gray, K.M., McRae-Clark, A., Lofwall, M.R., Sparenborg, S., Walsh, S.L., 2016. Oral Cannabidiol does not Alter the Subjective, Reinforcing or Cardiovascular Effects of Smoked Cannabis. *Neuropsychopharmacol* 41, 1974–1982. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.367>
- Hanley, N.A., Hagan, D.M., Clement-Jones, M., Ball, S.G., Strachan, T., Salas-Cortés, L., McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., Ostrer, H., Wilson, D.I., 2000. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of Development* 91, 403–407. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00307-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00307-X)
- Hannema, S.E., Hughes, I.A., 2007. Regulation of Wolffian Duct Development. *Horm Res Paediatr* 67, 142–151. <https://doi.org/10.1159/000096644>
- Hansen, K.B., Rosenkilde, M.M., Knop, F.K., Wellner, N., Diep, T.A., Rehfeld, J.F., Andersen, U.B., Holst, J.J., Hansen, H.S., 2011. 2-Oleoyl Glycerol Is a GPR119 Agonist and Signals GLP-1 Release in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96, E1409–E1417. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0647>
- Hanuš, L.O., Meyer, S.M., Muñoz, E., Tagliatela-Scafati, O., Appendino, G., 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat. Prod. Rep.* 33, 1357–1392. <https://doi.org/10.1039/C6NP00074F>
- Harbison, R.D., Mantilla-Plata, B., 1972. Prenatal toxicity, maternal distribution and placental transfer of tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 180, 446–453.
- Harclerode, J., Nyquist, S.E., Nazar, B., Lowe, D., 1978. Effects of cannabis on sex hormones and testicular enzymes of the rodent. *Adv Biosci* 22–23, 395–405. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-023759-6.50035-4>
- Hardell, L., Bavel, B., Lindstrom, G., Eriksson, M., Carlberg, M., 2006. In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. *Int J Androl* 29, 228–234. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00622.x>
- Hart, S.N., Cui, Y., Klaassen, C.D., Zhong, X., 2009. Three Patterns of Cytochrome P450 Gene Expression during Liver Maturation in Mice. *Drug Metab Dispos* 37, 116–121. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.023812>
- Harvey, D.J., Mechoulam, R., 1990. Metabolites of cannabidiol identified in human urine. *Xenobiotica* 20, 303–320. <https://doi.org/10.3109/00498259009046849>
- Hatch, E.E., Bracken, M.B., 1986. EFFECT OF MARIJUANA USE IN PREGNANCY ON FETAL GROWTH. *American Journal of Epidemiology* 124, 986–993. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114488>

- Hayakawa, K., Mishima, K., Hazekawa, M., Sano, K., Irie, K., Orito, K., Egawa, T., Kitamura, Y., Uchida, N., Nishimura, R., Egashira, N., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2008. Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol via CB1 receptor-dependent mechanism. *Brain Research* 1188, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.09.090>
- Hayatbakhsh, M.R., Flenady, V.J., Gibbons, K.S., Kingsbury, A.M., Hurrion, E., Mamun, A.A., Najman, J.M., 2012. Birth outcomes associated with cannabis use before and during pregnancy. *Pediatr Res* 71, 215–219. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.25>
- Heaney, J.D., Anderson, E.L., Michelson, M.V., Zechel, J.L., Conrad, P.A., Page, D.C., Nadeau, J.H., 2012. Germ cell pluripotency, premature differentiation and susceptibility to testicular teratomas in mice. *Development* 139, 1577–1586. <https://doi.org/10.1242/dev.076851>
- Hecht, F., Beals, R., Lees, M., Jolly, H., Roberts, P., 1968. LYSERGIC-ACID-DIETHYLAMIDE AND CANNABIS AS POSSIBLE TERATOGENS IN MAN. *The Lancet* 292, 1087. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(68\)91569-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(68)91569-9)
- Hedger, M.P., Winnall, W.R., 2012. Regulation of activin and inhibin in the adult testis and the evidence for functional roles in spermatogenesis and immunoregulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 359, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.031>
- Hedges, J.C., Hanna, C.B., Bash, J.C., Boniface, E.R., Burch, F.C., Mahalingaiah, S., Roberts, V.H.J., Terrobias, J.J.D., Mishler, E.C., Jensen, J.V., Easley, C.A., Lo, J.O., 2022. Chronic exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol impacts testicular volume and male reproductive health in rhesus macaques. *Fertility and Sterility* 117, 698–707. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.12.028>
- Heger, N.E., Hall, S.J., Sandrof, M.A., McDonnell, E.V., Hensley, J.B., McDowell, E.N., Martin, K.A., Gaido, K.W., Johnson, K.J., Boekelheide, K., 2012. Human fetal testis xenografts are resistant to phthalate-induced endocrine disruption. *Environ Health Perspect* 120, 1137–1143. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104711>
- Hehemann, M.C., Raheem, O.A., Rajanahally, S., Holt, S., Chen, T., Fustok, J.N., Song, K., Rylander, H., Chow, E., Ostrowski, K.A., Muller, C.H., Walsh, T.J., 2021. Evaluation of the impact of marijuana use on semen quality: a prospective analysis. *Therapeutic Advances in Urology* 13, 17562872211032484. <https://doi.org/10.1177/17562872211032484>
- Heidenreich, A., Schenkman, N.S., Sesterhenn, I.A., Mostofi, F.K., McCarthy, W.F., Heidenreich, B., Moul, J.W., 1997. Immunohistochemical Expression of Ki-67 to Predict Lymph Node Involvement in Clinical Stage I Nonseminomatous Germ Cell Tumors. *Journal of Urology* 158, 620–625. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)64571-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)64571-3)
- Heinrich, A., DeFalco, T., 2020. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology* 8, 903–914. <https://doi.org/10.1111/andr.12703>
- Heishman, S.J., Stitzer, M.L., Yingling, J.E., 1989. Effects of tetrahydrocannabinol content on marijuana smoking behavior, subjective reports, and performance. *Pharmacol Biochem Behav* 34, 173–179. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90369-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90369-9)
- Helal, M.A., Mehmet, H., Thomas, N.S.B., Cox, P.M., Ralph, D.J., Bajoria, R., Chatterjee, R., 2002. Ontogeny of Human Fetal Testicular Apoptosis during First, Second, and Third Trimesters of Pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 1189–1193. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.3.7836>

- Heller, C.G., Clermont, Y., 1963. Spermatogenesis in Man: An Estimate of Its Duration. *Science* 140, 184–186. <https://doi.org/10.1126/science.140.3563.184>
- Hembree, W.C., Nahas, G.G., Zeidenberg, P., Huang, H.F., 1978. Changes in human spermatozoa associated with high dose marijuana smoking. *Adv Biosci* 22–23, 429–439. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-023759-6.50038-x>
- Hemminki, K., Li, X., 2002. Cancer risks in Nordic immigrants and their offspring in Sweden. *European Journal of Cancer* 38, 2428–2434. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00496-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00496-3)
- Hennenlotter, J., Amend, B., Vogel, U., Renninger, M., Springer, C., Kuehs, U., Stenzl, A., Bedke, J., 2011. Differential Akt signalling in non-seminomatous testicular germ cell tumors. *Anticancer Res* 31, 3783–3788.
- Herbison, A.E., 2016. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol* 12, 452–466. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.70>
- Herkenham, M., Lynn, A., Johnson, M., Melvin, L., de Costa, B., Rice, K., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-02-00563.1991>
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1932–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1932>
- Hermann, B.P., Sukhwani, M., Hansel, M.C., Orwig, K.E., 2010. Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *REPRODUCTION* 139, 479–493. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0255>
- Hess, R.A., Renato de Franca, L., 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol* 636, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1
- Higgs, H.N., Glomset, J.A., 1994. Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9574–9578. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.20.9574>
- Hilger, D., Masureel, M., Kobilka, B.K., 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* 25, 4–12. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>
- Hillard, C.J., 2018. Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? *Neuropsychopharmacol.* 43, 155–172. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.130>
- Hillard, C.J., 2000. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 61, 3–18. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(00\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(00)00051-4)
- Hillard, C.J., Beatka, M., Sarvaideo, J., 2016. Endocannabinoid Signaling and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160005>
- Hilscher, B., Hilscher, W., Balthoff-Ohnolz, B., Krömer, U., Birke, A., Pelzer, H., Gauss, G., 1974. Kinetics of gametogenesis: I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis. *Cell Tissue Res.* 154. <https://doi.org/10.1007/BF00219667>

- Hirai, S., Naito, M., Terayama, H., Qu, N., Kuerban, M., Musha, M., Ikeda, A., Miura, M., Itoh, M., 2012. The Origin of Lymphatic Capillaries in Murine Testes. *Journal of Andrology* 33, 745–751. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.015156>
- Hložek, T., Uttl, L., Kadeřábek, L., Balíková, M., Lhotková, E., Horsley, R.R., Nováková, P., Šichová, K., Štefková, K., Tylš, F., Kuchař, M., Páleníček, T., 2017. Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *European Neuropsychopharmacology* 27, 1223–1237. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.10.037>
- Hogarth, C.A., Griswold, M.D., 2013. Retinoic acid regulation of male meiosis. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 20, 217–223. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32836067cf>
- Hogarth, C.A., Griswold, M.D., 2010. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J. Clin. Invest.* 120, 956–962. <https://doi.org/10.1172/JCI41303>
- Holl, K., Lundin, E., Surcel, H.-M., Grankvist, K., Koskela, P., Dillner, J., Hallmans, G., Wadell, G., Olafsdottir, G.H., Ögmundsdottir, H.M., Pukkala, E., Lehtinen, M., Stattin, P., Lukanova, A., 2009. Endogenous steroid hormone levels in early pregnancy and risk of testicular cancer in the offspring: A nested case-referent study. *Int. J. Cancer* 124, 2923–2928. <https://doi.org/10.1002/ijc.24312>
- Hollister, L.E., Gillespie, H., 1975. Interactions in man of delta-9-tetrahydrocannabinol; II. Cannabinol and cannabidiol. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 18, 80–83. <https://doi.org/10.1002/cpt197518180>
- Holmes, S.D., Lipshultz, L.I., Smith, R.G., 1983. Effect of Cannabinoids on Human Sertoli Cell Function In Vitro. *Archives of Andrology* 11, 245–251. <https://doi.org/10.3109/01485018308987489>
- Holstein, A.F., Wartenberg, H., Vossmeier, J., 1971. [Cytology of the prenatal development of human gonads. 3. Development of leydig cells in the testis of embryos and fetuses]. *Z Anat Entwicklungsgesch* 135, 43–66.
- Honecker, F., Stoop, H., de Krijger, R.R., Chris Lau, Y.-F., Bokemeyer, C., Looijenga, L.H., 2004. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J. Pathol.* 203, 849–857. <https://doi.org/10.1002/path.1587>
- Horne, A.W., Phillips, J.A., Kane, N., Lourenco, P.C., McDonald, S.E., Williams, A.R.W., Simon, C., Dey, S.K., Critchley, H.O.D., 2008. CB1 Expression Is Attenuated in Fallopian Tube and Decidua of Women with Ectopic Pregnancy. *PLoS ONE* 3, e3969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003969>
- Howlett, A.C., 2005. Cannabinoid Receptor Signaling, in: Pertwee, R.G. (Ed.), *Cannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 53–79. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_2
- Howlett, A.C., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews* 54, 161–202. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>
- Howlett, A.C., Abood, M.E., 2017. CB 1 and CB 2 Receptor Pharmacology, in: *Advances in Pharmacology*. Elsevier, pp. 169–206. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.007>
- Howlett, A.C., Scott, D.K., Wilken, G.H., 1989. Regulation of adenylate cyclase by cannabinoid drugs. *Biochemical Pharmacology* 38, 3297–3304. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90628-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90628-X)

- Hsiao, P., Clavijo, R.I., 2018. Adverse Effects of Cannabis on Male Reproduction. *European Urology Focus* 4, 324–328. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2018.08.006>
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.-J., Azhar, S., 2010. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond)* 7, 47. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-47>
- Hu, Y.-C., Nicholls, P.K., Soh, Y.Q.S., Daniele, J.R., Junker, J.P., van Oudenaarden, A., Page, D.C., 2015. Licensing of Primordial Germ Cells for Gametogenesis Depends on Genital Ridge Signaling. *PLoS Genet* 11, e1005019. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005019>
- Huang, H.F.S., Nahas, G.G., Hembree, W.C., 1979. EFFECTS OF MARIHUANA INHALATION ON SPERMATOGENESIS OF THE RAT, in: *Marihuana Biological Effects*. Elsevier, pp. 419–427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-023759-6.50037-8>
- Huang, Y.-H., Chin, C.-C., Ho, H.-N., Chou, C.-K., Shen, C.-N., Kuo, H.-C., Wu, T.-J., Wu, Y.-C., Hung, Y.-C., Chang, C.-C., Ling, T.-Y., 2009. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. *FASEB j.* 23, 2076–2087. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121939>
- Huestis, M.A., 2007. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *C&B* 4, 1770–1804. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790152>
- Huestis, M.A., 2005. Pharmacokinetics and Metabolism of the Plant Cannabinoids, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Cannabinol, in: *Pertwee, R.G. (Ed.), Cannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 657–690. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_23
- Huestis, M.A., Henningfield, J.E., Cone, E.J., 1992. Blood Cannabinoids. I. Absorption of THC and Formation of 11-OH-THC and THCCOOH During and After Smoking Marijuana*. *Journal of Analytical Toxicology* 16, 276–282. <https://doi.org/10.1093/jat/16.5.276>
- Huestis, M.A., Research, I., 1996. Urinary Excretion Profiles of 11-Nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Humans after Single Smoked Doses of Marijuana. *J Anal Toxicol* 20, 12.
- Huestis, M.A., Sempio, C., Newmeyer, M.N., Andersson, M., Barnes, A.J., Abulseoud, O.A., Blount, B.C., Schroeder, J., Smith, M.L., 2020. Free and Glucuronide Urine Cannabinoids after Controlled Smoked, Vaporized and Oral Cannabis Administration in Frequent and Occasional Cannabis Users. *Journal of Analytical Toxicology* 44, 651–660. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa046>
- Huestis, M.A., Solimini, R., Pichini, S., Pacifici, R., Carlier, J., Busardò, F.P., 2019a. Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *CN* 17, 974–989. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190603171901>
- Huestis, M.A., Solimini, R., Pichini, S., Pacifici, R., Carlier, J., Busardò, F.P., 2019b. Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *Curr Neuropharmacol* 17, 974–989. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190603171901>
- Hughes, I.A., Acerini, C.L., 2008. Factors controlling testis descent. *European Journal of Endocrinology* 159, S75–S82. <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0458>
- Huhtaniemi, I., Lautala, P., 1979. Stimulation of steroidogenesis in human fetal testes by the placenta during perfusion. *Journal of Steroid Biochemistry* 10, 109–113. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(79\)90150-X](https://doi.org/10.1016/0022-4731(79)90150-X)
- Huhtaniemi, I., Teerds, K., 2018. Leydig Cells, in: *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, pp. 30–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64558-0>

- Huhtaniemi, I.T., Korenbrot, C.C., Jaffe, R.B., 1977. hCG Binding and Stimulation of Testosterone Biosynthesis in the Human Fetal Testis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 44, 963–967. <https://doi.org/10.1210/jcem-44-5-963>
- Hunault, C.C., Mensinga, T.T., de Vries, I., Kelholt-Dijkman, H.H., Hoek, J., Kruidenier, M., Leenders, M.E.C., Meulenbelt, J., 2008. Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) serum concentrations and pharmacological effects in males after smoking a combination of tobacco and cannabis containing up to 69 mg THC. *Psychopharmacology* 201, 171–181. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1260-2>
- Hundal, H., Lister, R., Evans, N., Antley, A., Englund, A., Murray, R.M., Freeman, D., Morrison, P.D., 2018. The effects of cannabidiol on persecutory ideation and anxiety in a high trait paranoid group. *J Psychopharmacol* 32, 276–282. <https://doi.org/10.1177/0269881117737400>
- Hunt, C.A., Jones, R.T., 1980. Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacol Exp Ther* 215, 35–44.
- Hunt, C.A., Jones, R.T., Hering, R.I., Bachman, J., 1981. Evidence that cannabidiol does not significantly alter the pharmacokinetics of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacokinet Biopharm* 9, 245–260. <https://doi.org/10.1007/BF01059266>
- Hurd, Y., Wang, X., Anderson, V., Beck, O., Minkoff, H., Dowedwards, D., 2005. Marijuana impairs growth in mid-gestation fetuses. *Neurotoxicology and Teratology* 27, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.11.002>
- Husain, S., 1989. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on in vitro energy substrate metabolism in mouse and rat testis. *Physiology & Behavior* 46, 65–68. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90323-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90323-5)
- Hutchings, D.E., Martin, B.R., Gamagaris, Z., Miller, N., Fico, T., 1989. Plasma concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. *Life Sciences* 44, 697–701. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90380-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90380-9)
- Hutchings, D.E., Morgan, B., Brake, S.C., Shi, T., Lasalle, E., 1987. Delta-9-tetrahydrocannabinol during pregnancy in the rat: I. Differential effects on maternal nutrition, embryotoxicity, and growth in the offspring. *Neurotoxicology and Teratology* 9, 39–43. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(87\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0892-0362(87)90068-7)
- Hutson, J.M., 2000. Cryptorchidism and Hypospadias, in: Feingold, K.R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hershman, J.M., Hofland, J., Kalra, S., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C.S., Kuohung, W., Laferrère, B., Levy, M., McGee, E.A., McLachlan, R., Morley, J.E., New, M., Purnell, J., Sahay, R., Singer, F., Sperling, M.A., Stratakis, C.A., Trencé, D.L., Wilson, D.P. (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Hutson, J.M., Hasthorpe, S., Heyns, C.F., 1997. Anatomical and Functional Aspects of Testicular Descent and Cryptorchidism*. *Endocrine Reviews* 18, 259–280. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.2.0298>
- Hutson, J.M., Lopez-Marambio, F.A., 2017. The possible role of AMH in shortening the gubernacular cord in testicular descent: A reappraisal of the evidence. *Journal of Pediatric Surgery* 52, 1656–1660. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.05.021>
- Hutson, J.M., Southwell, B.R., Li, R., Lie, G., Ismail, K., Harisis, G., Chen, N., 2013. The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism. *Endocr Rev* 34, 725–752. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1089>

- Hutson, J.M., Thorup, J.M., Beasley, S.W., 2016. Descent of the Testis. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25910-9>
- Hutson, JohnM., 1985. A BIPHASIC MODEL FOR THE HORMONAL CONTROL OF TESTICULAR DESCENT. *The Lancet* 326, 419–421. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(85\)92739-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(85)92739-4)
- Huyghe, E., Matsuda, T., Thonneau, P., 2003. Increasing Incidence of Testicular Cancer Worldwide: A Review. *Journal of Urology* 170, 5–11. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000053866.68623.da>
- Iannotti, F.A., Vitale, R.M., 2021. The Endocannabinoid System and PPARs: Focus on Their Signalling Crosstalk, Action and Transcriptional Regulation. *Cells* 10, 586. <https://doi.org/10.3390/cells10030586>
- Ibsen, M.S., Connor, M., Glass, M., 2017. Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptor Signaling and Bias. *Cannabis and Cannabinoid Research* 2, 48–60. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0037>
- Ibsen, M.S., Finlay, D.B., Patel, M., Javitch, J.A., Glass, M., Grimsey, N.L., 2019. Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor-Mediated Arrestin Translocation: Species, Subtype, and Agonist-Dependence. *Front. Pharmacol.* 10, 350. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00350>
- Ibtisham, F., Wu, J., Xiao, M., An, L., Banker, Z., Nawab, A., Zhao, Y., Li, G., 2017. Progress and future prospect of *in vitro* spermatogenesis. *Oncotarget* 8, 66709–66727. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19640>
- Idänpään-Heikkilä, J., Fritchie, G.E., Englert, L.F., Ho, B.T., McIsaac, W.M., 1969. Placental transfer of tritiated-1-delta-9-tetrahydrocannabinol. *N Engl J Med* 281, 330.
- Ikeda, A.S., Knopik, V.S., Bidwell, L.C., Parade, S.H., Goodman, S.H., Emory, E.K., Palmer, R.H.C., 2022. A Review of Associations between Externalizing Behaviors and Prenatal Cannabis Exposure: Limitations & Future Directions. *Toxics* 10, 17. <https://doi.org/10.3390/toxics10010017>
- Innocenzi, E., De Domenico, E., Ciccarone, F., Zampieri, M., Rossi, G., Cicconi, R., Bernardini, R., Mattei, M., Grimaldi, P., 2019. Paternal activation of CB2 cannabinoid receptor impairs placental and embryonic growth via an epigenetic mechanism. *Sci Rep* 9, 17034. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53579-3>
- Inoue, H., Sakurai, T., Hasegawa, K., Suzuki, A., Saga, Y., 2022. NANOS3 suppresses premature spermatogonial differentiation to expand progenitors and fine-tunes spermatogenesis in mice. *Biology Open* 11, bio059146. <https://doi.org/10.1242/bio.059146>
- Iribarne, C., Berthou, F., Baird, S., Dréano, Y., Picart, D., Bail, J.P., Beaune, P., Ménez, J.F., 1996. Involvement of Cytochrome P450 3A4 Enzyme in the N-Demethylation of Methadone in Human Liver Microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 365–373. <https://doi.org/10.1021/tx950116m>
- Irving, A., Abdulrazzaq, G., Chan, S.L.F., Penman, J., Harvey, J., Alexander, S.P.H., 2017. Cannabinoid Receptor-Related Orphan G Protein-Coupled Receptors, in: *Advances in Pharmacology*. Elsevier, pp. 223–247. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.04.004>
- Iseger, T.A., Bossong, M.G., 2015. A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans. *Schizophrenia Research* 162, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.033>
- Ishii, K., Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., Shinohara, T., 2012. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of *Etv5* and *Bcl6b* through

- MAP2K1 activation. *Development* 139, 1734–1743.
<https://doi.org/10.1242/dev.076539>
- Issidorides, M., 1979. Observations in chronic hashish users : nuclear abberations in blood and sperm and abnormal acrosomes in spermatozoa, in: *Marihuana : Biological Effects*. Pergamon, New York, pp. 377–388.
- Ivell, R., 2007. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol* 5, 15. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-15>
- Ivell, R., Anand-Ivell, R., 2011. Biological role and clinical significance of insulin-like peptide 3. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 18, 210–216. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283453fe6>
- Ivell, R., Anand-Ivell, R., 2009. Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. *Human Reproduction Update* 15, 463–476. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp011>
- Ivell, R., Anand-Ivell, R., Morley, S.D., 2017. Endocrinology of the Fetal Testis, in: Vitti, P., Hegedus, L. (Eds.), *Thyroid Diseases, Endocrinology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–28. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29456-8_7-1
- Ivell, R., Heng, K., Anand-Ivell, R., 2014. Insulin-Like Factor 3 and the HPG Axis in the Male. *Front. Endocrinol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00006>
- Ivell, R., Wade, J.D., Anand-Ivell, R., 2013. INSL3 as a Biomarker of Leydig Cell Functionality. *Biology of Reproduction* 88, 147–147. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.108969>
- Izzo, A.A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V., Mechoulam, R., 2009. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences* 30, 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.006>
- Jacobson, M.R., Watts, J.J., Boileau, I., Tong, J., Mizrahi, R., 2019. A systematic review of phytocannabinoid exposure on the endocannabinoid system: Implications for psychosis. *European Neuropsychopharmacology* 29, 330–348. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.12.014>
- Jakob, S., Lovell-Badge, R., 2011. Sex determination and the control of *Sox9* expression in mammals: *Sox9* expression in mammals. *FEBS Journal* 278, 1002–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08029.x>
- Jakowiecki, J., Abel, R., Orzeł, U., Pasznik, P., Preissner, R., Filipek, S., 2021. Allosteric Modulation of the CB1 Cannabinoid Receptor by Cannabidiol—A Molecular Modeling Study of the N-Terminal Domain and the Allosteric-Orthosteric Coupling. *Molecules* 26, 2456. <https://doi.org/10.3390/molecules26092456>
- Jakubovic, A., McGeer, E.G., McGeer, P.L., 1979. Effects of cannabinoids on testosterone and protein synthesis in rat testis leydig cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* 15, 41–50. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(79\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0303-7207(79)90069-8)
- Jameson, S.A., Lin, Y.-T., Capel, B., 2012. Testis development requires the repression of *Wnt4* by *Fgf* signaling. *Developmental Biology* 370, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.009>
- Jarlenski, M., Koma, J.W., Zank, J., Bodnar, L.M., Bogen, D.L., Chang, J.C., 2017. Trends in perception of risk of regular marijuana use among US pregnant and nonpregnant reproductive-aged women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 217, 705–707. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.08.015>
- Jeanes, A., Wilhelm, D., Wilson, M.J., Bowles, J., McClive, P.J., Sinclair, A.H., Koopman, P., 2005. Evaluation of candidate markers for the peritubular myoid cell lineage in the

- developing mouse testis. *Reproduction* 130, 509–516.
<https://doi.org/10.1530/rep.1.00718>
- Jeffery, A., Streeter, A.J., Hosking, J., Wilkin, T.J., Nelson, S.M., 2015. Anti-Müllerian hormone in children: a ten-year prospective longitudinal study (EarlyBird 39). *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 28. <https://doi.org/10.1515/jpem-2014-0517>
- Jégou, B., 1993. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* 147, 25–96.
- Jeske, Y.W.A., Bowles, J., Greenfield, A., Koopman, P., 1995. Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat Genet* 10, 480–482.
<https://doi.org/10.1038/ng0895-480>
- Jirásek, J.E., 1977. Morphogenesis of the genital system in the human. *Birth Defects Orig Artic Ser* 13, 13–39.
- Johansson, E., Agurell, S., Hollister, L.E., Halldin, M.M., 1988. Prolonged apparent half-life of Δ 1-tetrahydrocannabinol in plasma of chronic marijuana users. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 40, 374–375. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1988.tb05272.x>
- Johansson, E., Norén, K., Sjövall, J., Halldin, M.M., 1989. Determination of Δ 1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marijuana users by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 3, 35–38.
<https://doi.org/10.1002/bmc.1130030109>
- Johnson, S.D., Phelps, D.L., Cottler, L.B., 2004. The Association of Sexual Dysfunction and Substance Use Among a Community Epidemiological Sample. *Arch Sex Behav* 33, 55–63. <https://doi.org/10.1023/B:ASEB.0000007462.97961.5a>
- Joneja, M.G., 1976. A study of teratological effects of intravenous, subcutaneous, and intragastric administration of Δ 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 36, 151–162. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(76\)90035-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(76)90035-1)
- Jørgensen, A., Nielsen, J.E., Almstrup, K., Toft, B.G., Petersen, B.L., Meyts, E.R.-D., 2013. Dysregulation of the mitosis-meiosis switch in testicular carcinoma *in situ*: Meiosis regulators in testicular carcinoma *in situ*. *J. Pathol.* 229, 588–598.
<https://doi.org/10.1002/path.4154>
- Jørgensen, A., Nielsen, J.E., Blomberg Jensen, M., Graem, N., Rajpert-De Meyts, E., 2012. Analysis of meiosis regulators in human gonads: a sexually dimorphic spatio-temporal expression pattern suggests involvement of DMRT1 in meiotic entry. *Molecular Human Reproduction* 18, 523–534. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas030>
- Jørgensen, A., Rajpert-De Meyts, E., 2014. Regulation of meiotic entry and gonadal sex differentiation in the human: normal and disrupted signaling. *Biomolecular Concepts* 5, 331–341. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0014>
- Jørgensen, A., Svingen, T., Miles, H., Chetty, T., Stukenborg, J.-B., Mitchell, R.T., 2021. Environmental Impacts on Male Reproductive Development: Lessons from Experimental Models. *Horm Res Paediatr* 303–319.
<https://doi.org/10.1159/000519964>
- Jørgensen, N., Rajpert-De Meyts, E., Graem, N., Müller, J., Giwercman, A., Skakkebaek, N.E., 1995. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma *in situ* by normal human fetal germ cells. *Lab Invest* 72, 223–231.

- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40, 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Kaftanovskaya, E.M., Lopez, C., Ferguson, L., Myhr, C., Agoulnik, A.I., 2015. Genetic ablation of androgen receptor signaling in fetal Leydig cell lineage affects Leydig cell functions in adult testis. *FASEB j.* 29, 2327–2337. <https://doi.org/10.1096/fj.14-263632>
- Kalfa, N., Gaspari, L., Ollivier, M., Philibert, P., Bergougnoux, A., Paris, F., Sultan, C., 2019. Molecular genetics of hypospadias and cryptorchidism recent developments. *Clin Genet* 95, 122–131. <https://doi.org/10.1111/cge.13432>
- Kanetsky, P.A., Mitra, N., Vardhanabhuti, S., Li, M., Vaughn, D.J., Letrero, R., Ciosek, S.L., Doody, D.R., Smith, L.M., Weaver, J., Albano, A., Chen, C., Starr, J.R., Rader, D.J., Godwin, A.K., Reilly, M.P., Hakonarson, H., Schwartz, S.M., Nathanson, K.L., 2009. Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nat Genet* 41, 811–815. <https://doi.org/10.1038/ng.393>
- Kang, H.M., Lim, J.H., Noh, K.H., Park, D., Cho, H.-S., Susztak, K., Jung, C.-R., 2019. Effective reconstruction of functional organotypic kidney spheroid for in vitro nephrotoxicity studies. *Sci Rep* 9, 17610. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53855-2>
- Kaplan, S.L., Grumbach, M.M., 1976. THE ONTOGENESIS OF HUMAN FOETAL HORMONES. II. LUTEINIZING HORMONE (LH) AND FOLLICLE STIMULATING HORMONE (FSH). *Acta Endocrinologica* 81, 808–829. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0810808>
- Kaprara, A., Huhtaniemi, I.T., 2018. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism* 86, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.018>
- Karl, J., Capel, B., 1998. Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium. *Developmental Biology* 203, 323–333. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9068>
- Karniol, I.G., Shirakawa, I., Kasinski, N., Pfeferman, A., Carlini, E.A., 1974. Cannabidiol interferes with the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in man. *European Journal of Pharmacology* 28, 172–177. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(74\)90129-0](https://doi.org/10.1016/0014-2999(74)90129-0)
- Karschner, Erin L, Darwin, W.D., Goodwin, R.S., Wright, S., Huestis, M.A., 2011a. Plasma Cannabinoid Pharmacokinetics following Controlled Oral Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Oromucosal Cannabis Extract Administration. *Clinical Chemistry* 57, 66–75. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.152439>
- Karschner, Erin L, Darwin, W.D., Goodwin, R.S., Wright, S., Huestis, M.A., 2011b. Plasma Cannabinoid Pharmacokinetics following Controlled Oral Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Oromucosal Cannabis Extract Administration. *Clinical Chemistry* 57, 66–75. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.152439>
- Karschner, Erin L, Darwin, W.D., McMahon, R.P., Liu, F., Wright, S., Goodwin, R.S., Huestis, M.A., 2011c. Subjective and Physiological Effects After Controlled Sativex and Oral THC Administration. *Clin Pharmacol Ther* 89, 400–407. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.318>
- Karschner, E L, Darwin, W.D., McMahon, R.P., Liu, F., Wright, S., Goodwin, R.S., Huestis, M.A., 2011. Subjective and Physiological Effects After Controlled Sativex and Oral THC Administration. *Clin Pharmacol Ther* 89, 400–407. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.318>
- Karst, M., Salim, K., Burstein, S., Conrad, I., Hoy, L., Schneider, U., 2003. Analgesic Effect of the Synthetic Cannabinoid CT-3 on Chronic Neuropathic Pain: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 290, 1757. <https://doi.org/10.1001/jama.290.13.1757>

- Kauert, G.F., Ramaekers, J.G., Schneider, E., Moeller, M.R., Toennes, S.W., 2007. Pharmacokinetic Properties of 9-Tetrahydrocannabinol in Serum and Oral Fluid. *Journal of Analytical Toxicology* 31, 288–293. <https://doi.org/10.1093/jat/31.5.288>
- Kearney-Ramos, T., Herrmann, E.S., Belluomo, I., Matias, I., Vallée, M., Monlezun, S., Piazza, P.V., Haney, M., 2022. The Relationship Between Circulating Endogenous Cannabinoids and the Effects of Smoked Cannabis. *Cannabis and Cannabinoid Research* can.2021.0185. <https://doi.org/10.1089/can.2021.0185>
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomelí, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Schöler, H.R., Tomilin, A., 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* 5, 1078–1083. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400279>
- Keith, L.H., 1998. Environmental endocrine disruptors. *Pure and Applied Chemistry* 70, 2319–2326. <https://doi.org/10.1351/pac199870122319>
- Kenakin, T., 2019. Biased Receptor Signaling in Drug Discovery. *Pharmacol Rev* 71, 267–315. <https://doi.org/10.1124/pr.118.016790>
- Kenakin, T., 2009. Biased agonism. *F1000 Biol Rep* 1. <https://doi.org/10.3410/B1-87>
- Kennedy, J.S., Waddell, W.J., 1972. Whole-body autoradiography of the pregnant mouse after administration of 14C- Δ^9 -THC. *Toxicology and Applied Pharmacology* 22, 252–258. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(72\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0041-008X(72)90175-5)
- Kent, J., Wheatley, S.C., Andrews, J.E., Sinclair, A.H., Koopman, P., 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122, 2813–2822. <https://doi.org/10.1242/dev.122.9.2813>
- Keov, P., Sexton, P.M., Christopoulos, A., 2011. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: A pharmacological perspective. *Neuropharmacology* 60, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.07.010>
- Kerr, J.B., 1992. 1 Functional cytology of the human testis. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 6, 235–250. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(05\)80149-1](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80149-1)
- Kerr, J.B., Knell, C.M., 1988. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103, 535–544. <https://doi.org/10.1242/dev.103.3.535>
- Khajehali, E., Malone, D.T., Glass, M., Sexton, P.M., Christopoulos, A., Leach, K., 2015. Biased Agonism and Biased Allosteric Modulation at the CB₁ Cannabinoid Receptor. *Mol Pharmacol* 88, 368–379. <https://doi.org/10.1124/mol.115.099192>
- Khalid, S., Almalki, F.A., Hadda, T.B., Bader, A., Abu-Izneid, T., Berredjem, M., Elsharkawy, E.R., Alqahtani, A.M., 2021. Medicinal Applications of Cannabinoids Extracted from *Cannabis sativa* (L.): A New Route in the Fight Against COVID-19? *CPD* 27, 1564–1578. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201202125807>
- Kilaru, A., Chapman, K.D., 2020. The endocannabinoid system. *Essays Biochem* 64, 485–499. <https://doi.org/10.1042/EBC20190086>
- Kilcoyne, K.R., Mitchell, R.T., 2019a. Effect of environmental and pharmaceutical exposures on fetal testis development and function: a systematic review of human experimental data. *Human Reproduction Update* 25, 397–421. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz004>
- Kilcoyne, K.R., Mitchell, R.T., 2019b. Effect of environmental and pharmaceutical exposures on fetal testis development and function: a systematic review of human experimental data. *Human Reproduction Update* 25, 397–421. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz004>

- Kim, K., Liu, W., Cunha, G.R., Russell, D.W., Huang, H., Shapiro, E., Baskin, L.S., 2002. Expression of the androgen receptor and 5 α -reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res* 307, 145–153. <https://doi.org/10.1007/s004410100464>
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., Poulat, F., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R., Capel, B., 2006. Fgf9 and Wnt4 Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *PLoS Biol* 4, e187. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040187>
- Kitadate, Y., Jörg, D.J., Tokue, M., Maruyama, A., Ichikawa, R., Tsuchiya, S., Segi-Nishida, E., Nakagawa, T., Uchida, A., Kimura-Yoshida, C., Mizuno, S., Sugiyama, F., Azami, T., Ema, M., Noda, C., Kobayashi, S., Matsuo, I., Kanai, Y., Nagasawa, T., Sugimoto, Y., Takahashi, S., Simons, B.D., Yoshida, S., 2019. Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche. *Cell Stem Cell* 24, 79-92.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.013>
- Klawans, M.R., Northrup, T.F., Villarreal, Y.R., Berens, P.D., Blackwell, S., Bunag, T., Stotts, A.L., 2019. A comparison of common practices for identifying substance use during pregnancy in obstetric clinics. *Birth* 46, 663–669. <https://doi.org/10.1111/birt.12426>
- Klein, C., Karanges, E., Spiro, A., Wong, A., Spencer, J., Huynh, T., Gunasekaran, N., Karl, T., Long, L.E., Huang, X.-F., Liu, K., Arnold, J.C., McGregor, I.S., 2011. Cannabidiol potentiates Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats. *Psychopharmacology* 218, 443–457. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2342-0>
- Klonisch, T., Fowler, P.A., Hombach-Klonisch, S., 2004. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Developmental Biology* 270, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.018>
- Kluin, Ph.M., Kramer, M.F., Rooij, D.G., 1984. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol* 169, 73–78. <https://doi.org/10.1007/BF00300588>
- Klumpers, L.E., Thacker, D.L., 2019. A Brief Background on Cannabis: From Plant to Medical Indications. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 102, 412–420. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0208>
- Ko, J.Y., Farr, S.L., Tong, V.T., Creanga, A.A., Callaghan, W.M., 2015. Prevalence and patterns of marijuana use among pregnant and nonpregnant women of reproductive age. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 213, 201.e1-201.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.03.021>
- Kobayashi, A., 2005. Sox9 in Testis Determination. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1061, 9–17. <https://doi.org/10.1196/annals.1336.003>
- Koh, K.H., Xie, H., Yu, A.-M., Jeong, H., 2011. Altered Cytochrome P450 Expression in Mice during Pregnancy. *Drug Metab Dispos* 39, 165–169. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.035790>
- Kohno, M., Hasegawa, H., Inoue, A., Muraoka, M., Miyazaki, T., Oka, K., Yasukawa, M., 2006. Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 827–832. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.175>
- Kolodny, R.C., Masters, W.H., Kolodner, R.M., Toro, G., 1974a. Depression of Plasma Testosterone Levels after Chronic Intensive Marihuana Use. *N Engl J Med* 290, 872–874. <https://doi.org/10.1056/NEJM197404182901602>

- Kolodny, R.C., Masters, W.H., Kolodner, R.M., Toro, G., 1974b. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marihuana use. *N Engl J Med* 290, 872–4. <https://doi.org/10.1056/NEJM197404182901602>
- Komeya, M., Kimura, H., Nakamura, H., Yokonishi, T., Sato, T., Kojima, K., Hayashi, K., Katagiri, K., Yamanaka, H., Sanjo, H., Yao, M., Kamimura, S., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Fujii, T., Ogawa, T., 2016. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep* 6, 21472. <https://doi.org/10.1038/srep21472>
- Koopman, P., 2010. The delicate balance between male and female sex determining pathways: potential for disruption of early steps in sexual development. *International Journal of Andrology* 33, 252–258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01001.x>
- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., Lovell-Badge, R., 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348, 450–452. <https://doi.org/10.1038/348450a0>
- Koskenniemi, J.J., Virtanen, H.E., Toppari, J., 2017. Testicular growth and development in puberty: Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity 24, 215–224. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000339>
- Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., Page, D.C., 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2474–2479. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510813103>
- Kozak, K.R., Crews, B.C., Morrow, J.D., Wang, L.-H., Ma, Y.H., Weinander, R., Jakobsson, P.-J., Marnett, L.J., 2002. Metabolism of the Endocannabinoids, 2-Arachidonylglycerol and Anandamide, into Prostaglandin, Thromboxane, and Prostacyclin Glycerol Esters and Ethanolamides. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44877–44885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206788200>
- Kozakiewicz, M.L., Grotegut, C.A., Howlett, A.C., 2021. Endocannabinoid System in Pregnancy Maintenance and Labor: A Mini-Review. *Front. Endocrinol.* 12, 699951. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.699951>
- Krentz, A.D., Murphy, M.W., Kim, S., Cook, M.S., Capel, B., Zhu, R., Matin, A., Sarver, A.L., Parker, K.L., Griswold, M.D., Looijenga, L.H.J., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 2009. The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 22323–22328. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905431106>
- Krishna, D.R., Klotz, U., 1994. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans: Clinical Pharmacokinetics 26, 144–160. <https://doi.org/10.2165/00003088-199426020-00007>
- Kristensen, D.G., Nielsen, J.E., Jørgensen, A., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Almstrup, K., 2014. Evidence that active demethylation mechanisms maintain the genome of carcinoma in situ cells hypomethylated in the adult testis. *Br J Cancer* 110, 668–678. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.727>
- Kristensen, D.M., Desdoits-Lethimonier, C., Mackey, A.L., Dalgaard, M.D., De Masi, F., Munkbøl, C.H., Styrishave, B., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Platel, C., Hay-Schmidt, A., Jensen, T.K., Lesné, L., Mazaud-Guittot, S., Kristiansen, K., Brunak, S., Kjaer, M., Juul, A., Jégou, B., 2018a. Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715035115>

- Kristensen, D.M., Desdoits-Lethimonier, C., Mackey, A.L., Dalgaard, M.D., De Masi, F., Munkbøl, C.H., Styrishave, B., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Platel, C., Hay-Schmidt, A., Jensen, T.K., Lesné, L., Mazaud-Guittot, S., Kristiansen, K., Brunak, S., Kjaer, M., Juul, A., Jégou, B., 2018b. Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715035115>
- Kristensen, D.M., Mazaud-Guittot, S., Gaudriault, P., Lesné, L., Serrano, T., Main, K.M., Jégou, B., 2016. Analgesic use — prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nat Rev Endocrinol* 12, 381–393. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.55>
- Kristensen, D.M., Sonne, S.B., Ottesen, A.M., Perrett, R.M., Nielsen, J.E., Almstrup, K., Skakkebaek, N.E., Leffers, H., Meyts, E.R.-D., 2008. Origin of pluripotent germ cell tumours: The role of microenvironment during embryonic development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 288, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.018>
- Kuiri-Hänninen, T., Sankilampi, U., Dunkel, L., 2014. Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Infancy: Minipuberty. *Horm Res Paediatr* 82, 73–80. <https://doi.org/10.1159/000362414>
- Kulibin, A.Yu., Malolina, E.A., 2020. Formation of the rete testis during mouse embryonic development. *Developmental Dynamics* 249, 1486–1499. <https://doi.org/10.1002/dvdy.242>
- Kumar, A.R., Patilea-Vrana, G.I., Anoshchenko, O., Unadkat, J.D., 2022. Characterizing and Quantifying Extrahepatic Metabolism of (–)- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) and Its Psychoactive Metabolite, (±)-11-Hydroxy- Δ^9 -THC (11-OH-THC). *Drug Metab Dispos* 50, 734–740. <https://doi.org/10.1124/dmd.122.000868>
- La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K.Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol* 16, 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- Lacson, J.C.A., Carroll, J.D., Tuazon, E., Castela, E.J., Bernstein, L., Cortessis, V.K., 2012. Population-based case-control study of recreational drug use and testis cancer risk confirms an association between marijuana use and nonseminoma risk: Marijuana, Cocaine, and Testicular Tumors. *Cancer* 118, 5374–5383. <https://doi.org/10.1002/cncr.27554>
- Lam, P.K., Torfs, C.P., 2006. Interaction between maternal smoking and malnutrition in infant risk of gastroschisis. *Birth Defect Res A* 76, 182–186. <https://doi.org/10.1002/bdra.20238>
- Lam, P.M.W., Marczyklo, T.H., El-Talatini, M., Finney, M., Nallendran, V., Taylor, A.H., Konje, J.C., 2008. Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the measurement of anandamide in human plasma. *Analytical Biochemistry* 380, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.033>
- Lambrot, R., Coffigny, H., Pairault, C., Donnadieu, A.-C., Frydman, R., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., 2006a. Use of Organ Culture to Study the Human Fetal Testis Development: Effect of Retinoic Acid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91, 2696–2703. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2113>
- Lambrot, R., Livera, G., Coffigny, H., Pairault, C., Frydman, R., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., 2006b. A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie* 88, 1831–1835. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.022>

- Lambrot, R., Livera, G., Delbes, G., Pairault, C., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2006c. Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 324, 507–521. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0167-7>
- Lambrot, R., Muczynski, V., Lécureuil, C., Angenard, G., Coffigny, H., Pairault, C., Moison, D., Frydman, R., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., 2009. Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 117, 32–37. <https://doi.org/10.1289/ehp.11146>
- Lanciotti, L., Cofini, M., Leonardi, A., Penta, L., Esposito, S., 2018. Up-To-Date Review About Minipuberty and Overview on Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Activation in Fetal and Neonatal Life. *Front. Endocrinol.* 9, 410. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00410>
- Landucci, E., Pellegrini-Giampietro, D., Gianoncelli, A., Ribaud, G., 2022. Cannabidiol preferentially binds TRPV2: a novel mechanism of action. *Neural Regen Res* 17, 2693. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.335821>
- Lange, S., Shield, K., Koren, G., Rehm, J., Popova, S., 2014. A comparison of the prevalence of prenatal alcohol exposure obtained via maternal self-reports versus meconium testing: a systematic literature review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* 14, 127. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-127>
- Laprairie, R.B., Bagher, A.M., Kelly, M.E.M., Denovan-Wright, E.M., 2015. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB₁ receptor: Negative allosteric modulation of CB₁ by cannabidiol. *British Journal of Pharmacology* 172, 4790–4805. <https://doi.org/10.1111/bph.13250>
- Lasala, C., Carré-Eusèbe, D., Picard, J.-Y., Rey, R., 2004. Subcellular and Molecular Mechanisms Regulating Anti-Müllerian Hormone Gene Expression in Mammalian and Nonmammalian Species. *DNA and Cell Biology* 23, 572–585. <https://doi.org/10.1089/dna.2004.23.572>
- Lattanzi, S., Brigo, F., Trinkka, E., Zaccara, G., Cagnetti, C., Del Giovane, C., Silvestrini, M., 2018. Efficacy and Safety of Cannabidiol in Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs* 78, 1791–1804. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0992-5>
- Lauckner, J.E., Hille, B., Mackie, K., 2005. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB₁ receptor coupling to G_{q/11} G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 19144–19149. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509588102>
- Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.-Y., Lu, H.-C., Hille, B., Mackie, K., 2008. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2699–2704. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711278105>
- Law, B., Mason, P.A., Moffat, A.C., Gleadle, R.I., King, L.J., 1984. Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin. *J Pharm Pharmacol* 36, 289–294. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1984.tb04376.x>
- Lawson, K.A., Hage, W.J., 2007. Clonal Analysis of the Origin of Primordial Germ Cells in the Mouse, in: Marsh, J., Goode, J. (Eds.), *Novartis Foundation Symposia*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, pp. 68–91. <https://doi.org/10.1002/9780470514573.ch5>
- Le Bouffant, R., Guerquin, M.J., Duquenne, C., Frydman, N., Coffigny, H., Rouiller-Fabre, V., Frydman, R., Habert, R., Livera, G., 2010. Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Human Reproduction* 25, 2579–2590. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq195>

- Le Cornet, C., Lortet-Tieulent, J., Forman, D., Béranger, R., Flechon, A., Fervers, B., Schüz, J., Bray, F., 2014. Testicular cancer incidence to rise by 25% by 2025 in Europe? Model-based predictions in 40 countries using population-based registry data. *European Journal of Cancer* 50, 831–839. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.11.035>
- Le Nézet, O., Philippon, A., Lahaie, E., Andler, R., 2021. Les niveaux d'usage de cannabis en France en 2020.
- Lecante, L.L., Leverrier-Penna, S., Gicquel, T., Giton, F., Costet, N., Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Fromenty, B., Lavoué, V., Rolland, A.D., Mazaud-Guittot, S., 2022. Acetaminophen (APAP, Paracetamol) Interferes With the First Trimester Human Fetal Ovary Development in an Ex Vivo Model. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 107, 1647–1661. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac080>
- Lecluze, E., Jégou, B., Rolland, A.D., Chalmel, F., 2018. New transcriptomic tools to understand testis development and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology* 468, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.02.019>
- Lee, K., Hardy, D., 2021. Metabolic Consequences of Gestational Cannabinoid Exposure. *IJMS* 22, 9528. <https://doi.org/10.3390/ijms22179528>
- Lee, M.S., Lanes, A., Ginsburg, E.S., Fox, J.H., 2020. Delta-9 THC can be detected and quantified in the semen of men who are chronic users of inhaled cannabis. *J Assist Reprod Genet* 37, 1497–1504. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01762-1>
- Leemaqz, S.Y., Dekker, G.A., McCowan, L.M., Kenny, L.C., Myers, J.E., Simpson, N.A.B., Poston, L., Roberts, C.T., 2016. Maternal marijuana use has independent effects on risk for spontaneous preterm birth but not other common late pregnancy complications. *Reproductive Toxicology* 62, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.021>
- Leghissa, A., Hildenbrand, Z.L., Schug, K.A., 2018. A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *J. Sep. Sci.* 41, 398–415. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701003>
- Leinonen, P.J., Jaffe, R.B., 1985. Leydig Cell Desensitization by Human Chorionic Gonadotropin Does Not Occur in the Human Fetal Testis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 61, 234–238. <https://doi.org/10.1210/jcem-61-2-234>
- Lejeune, H., Habert, R., Saez, J., 1998. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 20, 1–25. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0200001>
- Lemberger, L., Crabtree, R.E., Rowe, H.M., 1972. 11-Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol: Pharmacology, Disposition, and Metabolism of a Major Metabolite of Marijuana in Man. *Science* 177, 62–64. <https://doi.org/10.1126/science.177.4043.62>
- Lemberger, L., Dalton, B., Martz, R., Rodda, B., Forney, R., 1976. CLINICAL STUDIES ON THE INTERACTION OF PSYCHOPHARMACOLOGIC AGENTS WITH MARIHUANA. *Ann NY Acad Sci* 281, 219–228. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1976.tb27933.x>
- Lemberger, L., Martz, R., Rodda, B., Forney, R., Rowe, H., 1973. Comparative Pharmacology of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and its Metabolite, 11-OH- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. *J. Clin. Invest.* 52, 2411–2417. <https://doi.org/10.1172/JCI107431>
- Lemberger, L., Silberstein, S.D., Axelrod, J., Kopin, I.J., 1970. Marijuana: Studies on the Disposition and Metabolism of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in Man. *Science* 170, 1320–1322. <https://doi.org/10.1126/science.170.3964.1320>
- Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., Swan, S.H., 2017. Temporal trends in sperm count: a systematic review

- and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update* 23, 646–659. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022>
- Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C., Klosterkötter, J., Hellmich, M., Koethe, D., 2012. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2, e94–e94. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.15>
- Leweke, F.M., Schneider, U., Radwan, M., Schmidt, E., Emrich, H.M., 2000. Different effects of nabilone and cannabidiol on binocular depth inversion in Man. *Pharmacol Biochem Behav* 66, 175–181. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(00\)00201-x](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(00)00201-x)
- Lewis, K., Lee, P.A., 2009. Endocrinology of male puberty: Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity 16, 5–9. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32832029be>
- Lewis, S.E., Paro, R., Borriello, L., Simon, L., Robinson, L., Dincer, Z., Riedel, G., Battista, N., Maccarrone, M., 2012. Long-term use of HU210 adversely affects spermatogenesis in rats by modulating the endocannabinoid system: Exocannabinoids impair spermatogenesis. *International Journal of Andrology* 35, 731–740. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01259.x>
- Lewis, S.E.M., Rapino, C., Di Tommaso, M., Pucci, M., Battista, N., Paro, R., Simon, L., Lutton, D., Maccarrone, M., 2012. Differences in the Endocannabinoid System of Sperm from Fertile and Infertile Men. *PLoS ONE* 7, e47704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047704>
- Li, H., Lampe, J.N., 2019. Neonatal cytochrome P450 CYP3A7: A comprehensive review of its role in development, disease, and xenobiotic metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 673, 108078. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108078>
- Li, L., Dong, J., Yan, L., Yong, J., Liu, X., Hu, Y., Fan, X., Wu, X., Guo, H., Wang, X., Zhu, X., Li, R., Yan, J., Wei, Y., Zhao, Y., Wang, W., Ren, Y., Yuan, P., Yan, Z., Hu, B., Guo, F., Wen, L., Tang, F., Qiao, J., 2017. Single-Cell RNA-Seq Analysis Maps Development of Human Germline Cells and Gonadal Niche Interactions. *Cell Stem Cell* 20, 858–873.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.03.007>
- Li, R., Vannitamby, A., Yue, S.S.K., Handelsman, D., Hutson, J., 2017. Mouse minipuberty coincides with gonocyte transformation into spermatogonial stem cells: a model for human minipuberty. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 2430. <https://doi.org/10.1071/RD17100>
- Li, Y., Wu, Q., Li, X., Von Tungeln, L.S., Beland, F.A., Petibone, D., Guo, L., Cournoyer, P., Choudhuri, S., Chen, S., 2022. In vitro effects of cannabidiol and its main metabolites in mouse and human Sertoli cells. *Food and Chemical Toxicology* 159, 112722. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112722>
- Li, Y., Zheng, M., Lau, Y.-F.C., 2014. The Sex-Determining Factors SRY and SOX9 Regulate Similar Target Genes and Promote Testis Cord Formation during Testicular Differentiation. *Cell Reports* 8, 723–733. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.055>
- Ligresti, A., De Petrocellis, L., Di Marzo, V., 2016. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiological Reviews* 96, 1593–1659. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2016>
- Lindgren, J.-E., Ohlsson, A., Agurell, S., Hollister, L., Gillespie, H., 1981. Clinical effects and plasma levels of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) in heavy and light users of cannabis. *Psychopharmacology* 74, 208–212. <https://doi.org/10.1007/BF00427095>

- Ling, N., Ying, S.-Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., Guillemin, R., 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321, 779–782. <https://doi.org/10.1038/321779a0>
- Lisano, J.K., Smith, J.D., Mathias, A.B., Christensen, M., Smoak, P., Phillips, K.T., Quinn, C.J., Stewart, L.K., 2019. Performance and Health-Related Characteristics of Physically Active Males Using Marijuana. *J Strength Cond Res* 33, 1658–1668. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002238>
- List, A., Nazar, B., Nyquist, S., Harclerode, J., 1977. The effects of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the metabolism of gonadal steroids in the rat. *Drug Metab Dispos* 5, 268–272.
- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B.X., Kim, H.-Y., Luquet, S., Palmiter, R.D., Krystal, G., Rai, R., Mahadevan, A., Razdan, R.K., Kunos, G., 2008. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 54, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.05.020>
- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A.C., Zhou, Z., Huang, B.X., Kim, H.-Y., Kunos, G., 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13345–13350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601832103>
- Liu, Q.-R., Pan, C.-H., Hishimoto, A., Li, C.-Y., Xi, Z.-X., Llorente-Berzal, A., Viveros, M.-P., Ishiguro, H., Arinami, T., Onaivi, E.S., Uhl, G.R., 2009. Species differences in cannabinoid receptor 2 (*CNR2* gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes, Brain and Behavior* 8, 519–530. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00498.x>
- Liu, X., Liu, J., Kang, N., Yan, L., Wang, Q., Fu, X., Zhang, Y., Xiao, R., Cao, Y., 2014. Role of Insulin-Transferrin-Selenium in Auricular Chondrocyte Proliferation and Engineered Cartilage Formation in Vitro. *IJMS* 15, 1525–1537. <https://doi.org/10.3390/ijms15011525>
- Liu, X., Zhang, T., Wang, R., Shi, P., Pan, B., Pang, X., 2019. Insulin-Transferrin-Selenium as a Novel Serum-free Media Supplement for the Culture of Human Amnion Mesenchymal Stem Cells. *Ann Clin Lab Sci* 49, 63–71.
- Liu, Z., Galettis, P., Broyd, S.J., van Hell, H., Greenwood, L.-M., de Krey, P., Steigler, A., Zhu, X., Schneider, J., Solowij, N., Martin, J.H., 2020. Model-based analysis on systemic availability of co-administered cannabinoids after controlled vaporised administration. *Intern Med J* 50, 846–853. <https://doi.org/10.1111/imj.14415>
- Lodzki, M., Godin, B., Rakou, L., Mechoulam, R., Gallily, R., Touitou, E., 2003. Cannabidiol—transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *Journal of Controlled Release* 93, 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.001>
- Lolicato, F., Marino, R., Paronetto, M.P., Pellegrini, M., Dolci, S., Geremia, R., Grimaldi, P., 2008. Potential role of Nanos3 in maintaining the undifferentiated spermatogonia population. *Developmental Biology* 313, 725–738. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.011>
- Long, J.Z., LaCava, M., Jin, X., Cravatt, B.F., 2011. An anatomical and temporal portrait of physiological substrates for fatty acid amide hydrolase. *Journal of Lipid Research* 52, 337–344. <https://doi.org/10.1194/jlr.M012153>
- Looijenga, L.H.J., Gillis, A.J.M., Stoop, H., Biermann, K., Oosterhuis, J.W., 2011. Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to

- treatment-resistance: Molecular pathways of germ cell tumour pathogenesis. *International Journal of Andrology* 34, e234–e251. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01157.x>
- Looijenga, L.H.J., Stoop, H., Biermann, K., 2014. Testicular cancer: biology and biomarkers. *Virchows Arch* 464, 301–313. <https://doi.org/10.1007/s00428-013-1522-1>
- López-Cardona, A.P., Ibarra-Lecue, I., Laguna-Barraza, R., Pérez-Cerezales, S., Urigüen, L., Agirregoitia, N., Gutiérrez-Adán, A., Agirregoitia, E., 2018. Effect of chronic THC administration in the reproductive organs of male mice, spermatozoa and in vitro fertilization. *Biochemical Pharmacology* 157, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.045>
- Lourenco, J., Matias, I., Marsicano, G., Mülle, C., 2011. Pharmacological Activation of Kainate Receptors Drives Endocannabinoid Mobilization. *Journal of Neuroscience* 31, 3243–3248. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3512-10.2011>
- Lozano, J., García-Algar, O., Marchei, E., Vall, O., Monleon, T., Giovannandrea, R.D., Pichini, S., 2007. Prevalence of gestational exposure to cannabis in a Mediterranean city by meconium analysis. *Acta Paediatrica* 96, 1734–1737. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00535.x>
- Lu, H.-C., Mackie, K., 2021. Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* 6, 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- Lucaccioni, L., Trevisani, V., Boncompagni, A., Marrozzini, L., Berardi, A., Iughetti, L., 2021. Minipuberty: Looking Back to Understand Moving Forward. *Front. Pediatr.* 8, 612235. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.612235>
- Lucas, C.J., Galettis, P., Schneider, J., 2018. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br J Clin Pharmacol* 84, 2477–2482. <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>
- Lukas-Croisier, C., Lasala, C., Nicaud, J., Bedecarrás, P., Kumar, T.R., Dutertre, M., Matzuk, M.M., Picard, J.-Y., Josso, N., Rey, R., 2003. Follicle-Stimulating Hormone Increases Testicular Anti-Müllerian Hormone (AMH) Production through Sertoli Cell Proliferation and a Nonclassical Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate-Mediated Activation of the AMH Gene. *Molecular Endocrinology* 17, 550–561. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0186>
- Lymperi, S., Giwercman, A., 2018. Endocrine disruptors and testicular function. *Metabolism* 86, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.03.022>
- Maamar, M.B., Lesné, L., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Lassurguère, J., Lavoué, V., Deceuninck, Y., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Pineau, C., Chevrier, C., Dejuq-Rainsford, N., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2015. An Investigation of the Endocrine-Disruptive Effects of Bisphenol A in Human and Rat Fetal Testes. *PLoS ONE* 10, e0117226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117226>
- Maccarrone, M., 2020. Phytocannabinoids and endocannabinoids: different in nature. *Rend. Fis. Acc. Lincei* 31, 931–938. <https://doi.org/10.1007/s12210-020-00957-z>
- Maccarrone, M., 2002. Low fatty acid amide hydrolase and high anandamide levels are associated with failure to achieve an ongoing pregnancy after IVF and embryo transfer. *Molecular Human Reproduction* 8, 188–195. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.2.188>
- Maccarrone, M., Cecconi, S., Rossi, G., Battista, N., Pauselli, R., Finazzi-Agrò, A., 2003. Anandamide Activity and Degradation Are Regulated by Early Postnatal Aging and

- Follicle-Stimulating Hormone in Mouse Sertoli Cells. *Endocrinology* 144, 20–28. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220544>
- Maccarrone, M., Rapino, C., Francavilla, F., Barbonetti, A., 2021a. Cannabinoid signalling and effects of cannabis on the male reproductive system. *Nat Rev Urol* 18, 19–32. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00391-8>
- Maccarrone, M., Rapino, C., Francavilla, F., Barbonetti, A., 2021b. Cannabinoid signalling and effects of cannabis on the male reproductive system. *Nat Rev Urol* 18, 19–32. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00391-8>
- Maccarrone, M., Valensise, H., Bari, M., Lazzarin, N., Romanini, C., Finazzi-Agrò, A., 2001. Progesterone Up-Regulates Anandamide Hydrolase in Human Lymphocytes: Role of Cytokines and Implications for Fertility. *J Immunol* 166, 7183–7189. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7183>
- Maccarrone, M., Valensise, H., Bari, M., Lazzarin, N., Romanini, C., Finazzi-Agrò, A., 2000. Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage. *The Lancet* 355, 1326–1329. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02115-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02115-2)
- Mackie, K., 2005. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sciences* 77, 1667–1673. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.011>
- Maekawa, M., Kamimura, K., Nagano, T., 1996. Peritubular Myoid Cells in the Testis: Their Structure and Function. *Arch. Histol. Cytol.* 59, 1–13. <https://doi.org/10.1679/aohc.59.1>
- Maia, J., Fonseca, B., Teixeira, N., Correia-da-Silva, G., 2020. The fundamental role of the endocannabinoid system in endometrium and placenta: implications in pathophysiological aspects of uterine and pregnancy disorders. *Human Reproduction Update* 26, 586–602. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa005>
- Mainzer, C., Barrichello, C., Debret, R., Remoué, N., Sigaudou-Roussel, D., Sommer, P., 2014. Insulin-transferrin-selenium as an alternative to foetal serum for epidermal equivalents. *Int J Cosmet Sci* 36, 427–435. <https://doi.org/10.1111/ics.12141>
- Majdic, G., McNeilly, A.S., Sharpe, R.M., Evans, L.R., Groome, N.P., Saunders, P.T.K., 1997. Testicular Expression of Inhibin and Activin Subunits and Follistatin in the Rat and Human Fetus and Neonate and During Postnatal Development in the Rat ¹. *Endocrinology* 138, 2136–2147. <https://doi.org/10.1210/endo.138.5.5135>
- Mäkelä, J.-A., Hobbs, R.M., 2019. Molecular regulation of spermatogonial stem cell renewal and differentiation. *Reproduction* 158, R169–R187. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0476>
- Mäkelä, J.-A., Koskenniemi, J.J., Virtanen, H.E., Toppari, J., 2019. Testis Development. *Endocrine Reviews* 40, 857–905. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00140>
- Mäkelä, J.-A., Toppari, J., 2017. Spermatogenesis, in: Simoni, M., Huhtaniemi, I.T. (Eds.), *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*, Endocrinology. Springer International Publishing, Cham, pp. 417–455. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44441-3_13
- Malfait, A.M., Gallily, R., Sumariwalla, P.F., Malik, A.S., Andreakos, E., Mechoulam, R., Feldmann, M., 2000. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9561–9566. <https://doi.org/10.1073/pnas.160105897>
- Mamber, S.W., Krakowka, S., Osborn, J., Saberski, L., Rhodes, R.G., Dahlberg, A.E., Pond-Tor, S., Fitzgerald, K., Wright, N., Beseme, S., McMichael, J., 2020. Can Unconventional

- Immunomodulatory Agents Help Alleviate COVID-19 Symptoms and Severity? *mSphere* 5, e00288-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00288-20>
- Mamoulakis, C., Antypas, S., Sofras, F., Takenaka, A., Sofikitis, N., 2015. Testicular Descent. *HJ*. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1634>
- Mamsen, L.S., Lutterrodt, M.C., Andersen, E.W., Byskov, A.G., Andersen, C.Y., 2011. Germ cell numbers in human embryonic and fetal gonads during the first two trimesters of pregnancy: analysis of six published studies. *Human Reproduction* 26, 2140–2145. <https://doi.org/10.1093/humrep/der149>
- Mandal, T.K., Das, N.S., 2010. Testicular toxicity in cannabis extract treated mice: association with oxidative stress and role of antioxidant enzyme systems. *Toxicol Ind Health* 26, 11–23. <https://doi.org/10.1177/0748233709354553>
- Mantilla-Plata, B., Clewe, G.L., Harbison, R.D., 1975. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-induced changes in prenatal growth and development of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 33, 333–340. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(75\)90099-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(75)90099-X)
- Marchand, G., Masoud, A.T., Govindan, M., Ware, K., King, A., Ruther, S., Brazil, G., Ulibarri, H., Parise, J., Arroyo, A., Coriell, C., Goetz, S., Karrys, A., Sainz, K., 2022. Birth Outcomes of Neonates Exposed to Marijuana in Utero: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* 5, e2145653. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.45653>
- Marini, M., Rosa, I., Guasti, D., Gacci, M., Sgambati, E., Ibba-Manneschi, L., Manetti, M., 2018. Reappraising the microscopic anatomy of human testis: identification of telocyte networks in the peritubular and intertubular stromal space. *Sci Rep* 8, 14780. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33126-2>
- Marshall, W.A., Tanner, J.M., 1970. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Boys. *Archives of Disease in Childhood* 45, 13–23. <https://doi.org/10.1136/adc.45.239.13>
- Marsot, A., Audebert, C., Attolini, L., Lacarelle, B., Micallef, J., Blin, O., 2016. Comparison of Cannabinoid Concentrations in Plasma, Oral Fluid and Urine in Occasional Cannabis Smokers After Smoking Cannabis Cigarette. *J Pharm Pharm Sci* 19, 411. <https://doi.org/10.18433/J3F31D>
- Martin, B.R., Dewey, W.L., Harris, L.S., Beckner, J.S., 1977a. 3H-delta9-tetrahydrocannabinol distribution in pregnant dogs and their fetuses. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 17, 457–470.
- Martin, B.R., Dewey, W.L., Harris, L.S., Beckner, J.S., 1977b. 3H-delta9-tetrahydrocannabinol distribution in pregnant dogs and their fetuses. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 17, 457–470.
- Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R., Capel, B., 1997. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Current Biology* 7, 958–968. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00415-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00415-5)
- Martínez-León, E., Osycka-Salut, C., Signorelli, J., Kong, M., Morales, P., Pérez-Martínez, S., Díaz, E.S., 2019. Fibronectin modulates the endocannabinoid system through the cAMP/PKA pathway during human sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 86, 224–238. <https://doi.org/10.1002/mrd.23097>
- Martínez-Peña, A.A., Perono, G.A., Gritis, S.A., Sharma, R., Selvakumar, S., Walker, O.S., Gurm, H., Holloway, A.C., Raha, S., 2021. The Impact of Early Life Exposure to Cannabis: The Role of the Endocannabinoid System. *IJMS* 22, 8576. <https://doi.org/10.3390/ijms22168576>

- Martini, L., Waldhoer, M., Pusch, M., Kharazia, V., Fong, J., Lee, J.H., Freissmuth, C., Whistler, J.L., 2007. Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *FASEB j.* 21, 802–811. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7132com>
- Martins, S.S., Mauro, C.M., Santaella-Tenorio, J., Kim, J.H., Cerda, M., Keyes, K.M., Hasin, D.S., Galea, S., Wall, M., 2016. State-level medical marijuana laws, marijuana use and perceived availability of marijuana among the general U.S. population. *Drug and Alcohol Dependence* 169, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.10.004>
- Marzo, V.D., Bisogno, T., Sugiura, T., Melck, D., Petrocellis, L.D., 1998. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochemical Journal* 331, 15–19. <https://doi.org/10.1042/bj3310015>
- Maskarinec, M.P., Shipley, G., Novotny, M., Brown, D.J., Forney, R.B., 1978. Endocrine effects of cannabis in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 45, 617–628. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(78\)90123-0](https://doi.org/10.1016/0041-008X(78)90123-0)
- Mason, N.L., Theunissen, E.L., Hutten, N.R.P.W., Tse, D.H.Y., Toennes, S.W., Jansen, J.F.A., Stiers, P., Ramaekers, J.G., 2021. Reduced responsiveness of the reward system is associated with tolerance to cannabis impairment in chronic users. *Addiction Biology* 26. <https://doi.org/10.1111/adb.12870>
- Massa, G., de Zegher, F., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., 1992. Serum Levels of Immunoreactive Inhibin, FSH, and LH in Human Infants at Preterm and Term Birth. *Neonatology* 61, 150–155. <https://doi.org/10.1159/000243737>
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Griswold, M.D., Yoshida, S., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 2010. The Mammalian Doublesex Homolog DMRT1 Is a Transcriptional Gatekeeper that Controls the Mitosis versus Meiosis Decision in Male Germ Cells. *Developmental Cell* 19, 612–624. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.010>
- Matsuda, L.A., Bonner, T.I., Lolait, S.J., 1993. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 327, 535–550. <https://doi.org/10.1002/cne.903270406>
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564. <https://doi.org/10.1038/346561a0>
- Matsunaga, T., Iwawaki, Y., Watanabe, K., Yamamoto, I., Kageyama, T., Yoshimura, H., 1995. Metabolism of Δ^9 -tetrahydrocannabinol by cytochrome P450 isozymes purified from hepatic microsomes of monkeys. *Life Sciences* 56, 2089–2095. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00193-A](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00193-A)
- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., Kato, J.Y., 1994. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14, 2066–2076. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.2066-2076.1994>
- Mattiske, D.M., Pask, A.J., 2021. Endocrine disrupting chemicals in the pathogenesis of hypospadias; developmental and toxicological perspectives. *Current Research in Toxicology* 2, 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.crtox.2021.03.004>
- Matusali, G., Houzet, L., Satie, A.-P., Mahé, D., Aubry, F., Couderc, T., Frouard, J., Bourgeau, S., Bensalah, K., Lavoué, S., Joguet, G., Bujan, L., Cabié, A., Avelar, G., Lecuit, M., Le Tortorec, A., Dejucq-Rainsford, N., 2018a. Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. *J Clin Invest* 128, 4697–4710. <https://doi.org/10.1172/JCI121735>
- Matusali, G., Houzet, L., Satie, A.-P., Mahé, D., Aubry, F., Couderc, T., Frouard, J., Bourgeau, S., Bensalah, K., Lavoué, S., Joguet, G., Bujan, L., Cabié, A., Avelar, G., Lecuit, M., Le

- Tortorec, A., Dejuq-Rainsford, N., 2018b. Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. *J Clin Invest* 128, 4697–4710. <https://doi.org/10.1172/JCI121735>
- Mauduit, C., 1999. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Human Reproduction Update* 5, 535–545. <https://doi.org/10.1093/humupd/5.5.535>
- Mayer, C., Adam, M., Walenta, L., Schmid, N., Heikelä, H., Schubert, K., Flenkenthaler, F., Dietrich, K.-G., Gruschka, S., Arnold, G.J., Fröhlich, T., Schwarzer, J.U., Köhn, F.M., Strauss, L., Welter, H., Poutanen, M., Mayerhofer, A., 2018. Insights into the role of androgen receptor in human testicular peritubular cells. *Andrology* 6, 756–765. <https://doi.org/10.1111/andr.12509>
- Mayerhofer, A., 2013. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *REPRODUCTION* 145, R107–R116. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0497>
- Mazaud-Guittot, S., Nicolaz, C.N., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Maamar, M.B., Balaguer, P., Kristensen, D.M., Chevrier, C., Lavoué, V., Poulain, P., Dejuq-Rainsford, N., Jégou, B., 2013. Paracetamol, Aspirin, and Indomethacin Induce Endocrine Disturbances in the Human Fetal Testis Capable of Interfering With Testicular Descent. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98, E1757–E1767. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2531>
- Mazur, A., Lichti, C.F., Prather, P.L., Zielinska, A.K., Bratton, S.M., Gallus-Zawada, A., Finel, M., Miller, G.P., Radomińska-Pandya, A., Moran, J.H., 2009. Characterization of Human Hepatic and Extrahepatic UDP-Glucuronosyltransferase Enzymes Involved in the Metabolism of Classic Cannabinoids. *Drug Metab Dispos* 37, 1496–1504. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.026898>
- McCarrey, J.R., 2013. Toward a More Precise and Informative Nomenclature Describing Fetal and Neonatal Male Germ Cells in Rodents¹. *Biology of Reproduction* 89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110502>
- McCullagh, D.R., 1932. Dual Endocrine Activity of the Testes. *Science* 76, 19–20. <https://doi.org/10.1126/science.76.1957.19>
- McGlynn, K.A., Cook, M.B., 2009. Etiologic factors in testicular germ-cell tumors. *Future Oncology* 5, 1389–1402. <https://doi.org/10.2217/fon.09.116>
- McGuire, P., Robson, P., Cubala, W.J., Vasile, D., Morrison, P.D., Barron, R., Taylor, A., Wright, S., 2018. Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *AJP* 175, 225–231. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.17030325>
- McHugh, D., Page, J., Dunn, E., Bradshaw, H.B., 2012. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells: Novel CB pharmacology at GPR18. *British Journal of Pharmacology* 165, 2414–2424. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01497.x>
- McIntosh, A.L., Martin, G.G., Huang, H., Landrock, D., Kier, A.B., Schroeder, F., 2018. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol induces endocannabinoid accumulation in mouse hepatocytes: antagonism by Fabp1 gene ablation. *Journal of Lipid Research* 59, 646–657. <https://doi.org/10.1194/jlr.M082644>
- McIver, S.C., Roman, S.D., Nixon, B., Loveland, K.L., McLaughlin, E.A., 2013. The rise of testicular germ cell tumours: the search for causes, risk factors and novel therapeutic targets. *F1000Res* 2, 55. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-55.v1>
- McKay, D.G., Hertig, A.T., Adams, E.C., Danziger, S., 1953. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat. Rec.* 117, 201–219. <https://doi.org/10.1002/ar.1091170206>

- McLaren, A., 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology* 262, 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00214-8)
- McLean, D.J., Friel, P.J., Johnston, D.S., Griswold, M.D., 2003. Characterization of Spermatogonial Stem Cell Maturation and Differentiation in Neonatal Mice. *Biology of Reproduction* 69, 2085–2091. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017020>
- McPartland, J.M., 2018. *Cannabis* Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research* 3, 203–212. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0039>
- McPartland, J.M., Agrawal, J., Gleeson, D., Heasman, K., Glass, M., 2006. Cannabinoid receptors in invertebrates. *J Evolution Biol* 19, 366–373. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.01028.x>
- McPartland, J.M., Glass, M., 2003. Functional mapping of cannabinoid receptor homologs in mammals, other vertebrates, and invertebrates. *Gene* 312, 297–303. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00638-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00638-3)
- McPartland, J.M., Glass, M., Pertwee, R.G., 2007. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences: Ligand affinity and receptor distribution of CB1. *British Journal of Pharmacology* 152, 583–593. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707399>
- McPartland, J.M., Russo, E.B., 2014. Non-phytocannabinoid constituents of cannabis and herbal synergy, in: *Handbook of Cannabis*.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* 50, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-D](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-D)
- Mechoulam, R., Hanuš, L.O., Pertwee, R., Howlett, A.C., 2014. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci* 15, 757–764. <https://doi.org/10.1038/nrn3811>
- Mechoulam, R., Zvi, Z.B., Agurell, S., Nilsson, I.M., Nilsson, J.L.G., Edery, H., Grunfeld, Y., 1973. Δ^6 -Tetrahydrocannabinol-7-oic acid, a urinary Δ^6 -THC metabolite: Isolation and synthesis. *Experientia* 29, 1193–1195. <https://doi.org/10.1007/BF01935065>
- Meehan-Atrash, J., Rahman, I., 2021. Cannabis Vaping: Existing and Emerging Modalities, Chemistry, and Pulmonary Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 34, 2169–2179. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00290>
- Meeker, J.D., 2010. Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health. *Maturitas* 66, 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.03.001>
- Meinhardt, A., DeJucq-Rainsford, N., Bhushan, S., 2022. Testicular macrophages: development and function in health and disease. *Trends in Immunology* 43, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.11.003>
- Melck, D., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Chuang, H., Julius, D., Bifulco, M., Di Marzo, V., 1999. Unsaturated Long-Chain N-Acyl-vanillyl-amides (N-AVAMs): Vanilloid Receptor Ligands That Inhibit Anandamide-Facilitated Transport and Bind to CB1 Cannabinoid Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262, 275–284. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1105>
- Melis, M.R., Succu, S., Mascia, M.S., Sanna, F., Melis, T., Castelli, M.P., Argiolas, A., 2006. The cannabinoid receptor antagonist SR-141716A induces penile erection in male rats:

- Involvement of paraventricular glutamic acid and nitric oxide. *Neuropharmacology* 50, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.09.009>
- Mendelson, J.H., Ellingboe, J., Kuehnle, J.C., Mello, N.K., 1978. Effects of chronic marijuana use on integrated plasma testosterone and luteinizing hormone levels. *J Pharmacol Exp Ther* 207, 611–617.
- Mendelson, Jack H., Kuehnle, J., Ellingboe, J., Babor, T.F., 1974. Plasma Testosterone Levels before, during and after Chronic Marijuana Smoking. *N Engl J Med* 291, 1051–1055. <https://doi.org/10.1056/NEJM197411142912003>
- Mendelson, Jack H., Kuehnle, J., Ellingboe, J., Babor, T.F., 1974. Plasma testosterone levels before, during and after chronic marijuana smoking. *N Engl J Med* 291, 1051–1055.
- Mendis, S.H.S., Meachem, S.J., Sarraj, M.A., Loveland, K.L., 2011. Activin A Balances Sertoli and Germ Cell Proliferation in the Fetal Mouse Testis. *Biology of Reproduction* 84, 379–391. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086231>
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M., Sariola, H., 2000. Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF. *Science* 287, 1489–1493. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1489>
- Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N., Buehr, M., 1993. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 37, 407–415.
- Metz, T.D., Allshouse, A.A., Hogue, C.J., Goldenberg, R.L., Dudley, D.J., Varner, M.W., Conway, D.L., Saade, G.R., Silver, R.M., 2017. Maternal marijuana use, adverse pregnancy outcomes, and neonatal morbidity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 217, 478.e1-478.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.05.050>
- Metz, T.D., Borgelt, L.M., 2018. Marijuana Use in Pregnancy and While Breastfeeding. *Obstetrics & Gynecology* 132, 1198–1210. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002878>
- Metz, T.D., Silver, R.M., McMillin, G.A., Allshouse, A.A., Jensen, T.L., Mansfield, C., Heard, K., Kinney, G.L., Wymore, E., Binswanger, I.A., 2019. Prenatal Marijuana Use by Self-Report and Umbilical Cord Sampling in a State With Marijuana Legalization. *Obstetrics & Gynecology* 133, 98–104. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003028>
- Metz, T.D., Stickrath, E.H., 2015. Marijuana use in pregnancy and lactation: a review of the evidence. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 213, 761–778. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.025>
- Meyerson, M., Harlow, E., 1994. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2077–2086. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.3.2077>
- Mezey, É., Tóth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M., Szallasi, A., 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3655–3660. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3655>
- Mialon, A., Berchtold, A., Michaud, P.-A., Gmel, G., Suris, J.-C., 2012. Sexual Dysfunctions Among Young Men: Prevalence and Associated Factors. *Journal of Adolescent Health* 51, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2012.01.008>
- Michel, M.C., Charlton, S.J., 2018. Biased Agonism in Drug Discovery—Is It Too Soon to Choose a Path? *Mol Pharmacol* 93, 259–265. <https://doi.org/10.1124/mol.117.110890>

- Migliaccio, M., Ricci, G., Suglia, A., Manfrevola, F., Mackie, K., Fasano, S., Pierantoni, R., Chioccarelli, T., Cobellis, G., 2018. Analysis of Endocannabinoid System in Rat Testis During the First Spermatogenetic Wave. *Front. Endocrinol.* 9, 269. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00269>
- Miles, D.C., Wakeling, S.I., Stringer, J.M., van den Bergen, J.A., Wilhelm, D., Sinclair, A.H., Western, P.S., 2013. Signaling through the TGF Beta-Activin Receptors ALK4/5/7 Regulates Testis Formation and Male Germ Cell Development. *PLoS ONE* 8, e54606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054606>
- Miller, M.R., Mannowetz, N., Iavarone, A.T., Safavi, R., Gracheva, E.O., Smith, J.F., Hill, R.Z., Bautista, D.M., Kirichok, Y., Lishko, P.V., 2016. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science* 352, 555–559. <https://doi.org/10.1126/science.aad6887>
- Miller, W.L., Auchus, R.J., 2011. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews* 32, 81–151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Miller, W.L., Bose, H.S., 2011. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *Journal of Lipid Research* 52, 2111–2135. <https://doi.org/10.1194/jlr.R016675>
- Minkoff, H.L., Ecker, J.L., 2022. Prenatal Cannabis Use Before and During the COVID-19 Pandemic. *JAMA* 327, 587. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.23719>
- Mitchell, R.T., Childs, A.J., Anderson, R.A., van den Driesche, S., Saunders, P.T.K., McKinnell, C., Wallace, W.H.B., Kelnar, C.J.H., Sharpe, R.M., 2012. Do phthalates affect steroidogenesis by the human fetal testis? Exposure of human fetal testis xenografts to di-n-butyl phthalate. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E341–348. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2411>
- Mitchell, R.T., E Camacho-Moll, M., Macdonald, J., Anderson, R.A., Kelnar, C.J.H., O'Donnell, M., Sharpe, R.M., Smith, L.B., Grigor, K.M., Wallace, W.H.B., Stoop, H., Wolffenbuttel, K.P., Donat, R., Saunders, P.T., Looijenga, L.H., 2014. Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod Pathol* 27, 1255–1266. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.246>
- Mitchell, R.T., Saunders, P.T.K., Childs, A.J., Cassidy-Kojima, C., Anderson, R.A., Wallace, W.H.B., Kelnar, C.J.H., Sharpe, R.M., 2010. Xenografting of human fetal testis tissue: a new approach to study fetal testis development and germ cell differentiation. *Human Reproduction* 25, 2405–2414. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq183>
- Mitchell, R.T., Sharpe, R.M., Anderson, R.A., McKinnell, C., Macpherson, S., Smith, L.B., Wallace, W.H.B., Kelnar, C.J.H., van den Driesche, S., 2013. Diethylstilboestrol Exposure Does Not Reduce Testosterone Production in Human Fetal Testis Xenografts. *PLoS ONE* 8, e61726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061726>
- Mithraprabhu, S., Mendis, S., Meachem, S.J., Tubino, L., Matzuk, M.M., Brown, C.W., Loveland, K.L., 2010. Activin Bioactivity Affects Germ Cell Differentiation in the Postnatal Mouse Testis In Vivo. *Biol Reprod* 82, 980–990. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.079855>
- Miyabayashi, K., Shima, Y., Inoue, M., Sato, T., Baba, T., Ohkawa, Y., Suyama, M., Morohashi, K., 2017. Alterations in Fetal Leydig Cell Gene Expression during Fetal and Adult Development. *Sex Dev* 11, 53–63. <https://doi.org/10.1159/000453323>
- Miyai, K., Yamamoto, S., Iwaya, K., Asano, T., Tamai, S., Tsuda, H., Matsubara, O., 2012. Altered expression of p27^{Kip1}-interacting cell-cycle regulators in the adult testicular

- germ cell tumors: potential role in tumor development and histological progression. *APMIS* 120, 890–900. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02919.x>
- Mizrak, S.C., van Dissel-Emiliani, F.M.F., 2008. Transient receptor potential vanilloid receptor-1 confers heat resistance to male germ cells. *Fertility and Sterility* 90, 1290–1293. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.081>
- Mizuno, Y., Gotoh, A., Kamidono, S., Kitazawa, S., 1993. ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A NEW HUMAN TESTICULAR GERM CELL TUMOR CELL LINE (TCam-2). *Jpn. j. urol* 84, 1211–1218. <https://doi.org/10.5980/jpnjurol1989.84.1211>
- Moch, H., Cubilla, A.L., Humphrey, P.A., Reuter, V.E., Ulbright, T.M., 2016. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology* 70, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>
- Mohammed, A.M., Huuskonen, P., Juvonen, R., Sahlman, H., Repo, J., Myöhänen, K., Myllynen, P., Woo, C.-S.J., Karttunen, V., Vähäkangas, K., 2020. Activities of metabolizing enzymes in human placenta. *Toxicology Letters* 326, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.02.014>
- Molyneaux, K., Wylie, C., 2004. Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 537–543. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041833km>
- Molyneaux, K.A., Stallock, J., Schaible, K., Wylie, C., 2001. Time-Lapse Analysis of Living Mouse Germ Cell Migration. *Developmental Biology* 240, 488–498. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0436>
- Monfort, A., Ferreira, E., Leclair, G., Lodygensky, G.A., 2022. Pharmacokinetics of Cannabis and Its Derivatives in Animals and Humans During Pregnancy and Breastfeeding. *Front. Pharmacol.* 13, 919630. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.919630>
- Moniot, B., Ujjan, S., Champagne, J., Hirai, H., Aritake, K., Nagata, K., Dubois, E., Nidelet, S., Nakamura, M., Urade, Y., Poulat, F., Boizet-Bonhoure, B., 2014. Prostaglandin D2 acts through the Dp2 receptor to influence male germ cell differentiation in the foetal mouse testis. *Development* 141, 3561–3571. <https://doi.org/10.1242/dev.103408>
- Monneret, C., 2017. What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies* 340, 403–405. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>
- Montaigne, D., Butruille, L., Staels, B., 2021. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nat Rev Cardiol* 18, 809–823. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00569-6>
- Moore, D.G., Turner, J.D., Parrott, A.C., Goodwin, J.E., Fulton, S.E., Min, M.O., Fox, H.C., Braddick, F.M.B., Axelsson, E.L., Lynch, S., Ribeiro, H., Frostick, C.J., Singer, L.T., 2010. During pregnancy, recreational drug-using women stop taking ecstasy (3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine) and reduce alcohol consumption, but continue to smoke tobacco and cannabis: initial findings from the Development and Infancy Study. *J Psychopharmacol* 24, 1403–1410. <https://doi.org/10.1177/0269881109348165>
- Morales, P., Reggio, P.H., 2017. An Update on Non-CB₁, Non-CB₂ Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors. *Cannabis and Cannabinoid Research* 2, 265–273. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0036>
- Moreno, E., Andradas, C., Medrano, M., Caffarel, M.M., Pérez-Gómez, E., Blasco-Benito, S., Gómez-Cañas, M., Pazos, M.R., Irving, A.J., Lluís, C., Canela, E.I., Fernández-Ruiz, J., Guzmán, M., McCormick, P.J., Sánchez, C., 2014. Targeting CB2-GPR55 Receptor Heteromers Modulates Cancer Cell Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 289, 21960–21972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561761>

- Moreno, S.G., Attali, M., Allemand, I., Messiaen, S., Fouchet, P., Coffigny, H., Romeo, P.-H., Habert, R., 2010. TGF β signaling in male germ cells regulates gonocyte quiescence and fertility in mice. *Developmental Biology* 342, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.03.007>
- Morgan, C.J., Freeman, T.P., Schafer, G.L., Curran, H.V., 2010. Cannabidiol Attenuates the Appetitive Effects of Δ 9-Tetrahydrocannabinol in Humans Smoking Their Chosen Cannabis. *Neuropsychopharmacol* 35, 1879–1885. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.58>
- Morgan, C.J.A., Curran, H.V., 2008. Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis. *Br J Psychiatry* 192, 306–307. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.046649>
- Morgan, C.J.A., Freeman, T.P., Hindocha, C., Schafer, G., Gardner, C., Curran, H.V., 2018. Individual and combined effects of acute delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on psychotomimetic symptoms and memory function. *Transl Psychiatry* 8, 181. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0191-x>
- Morgan, C.J.A., Gardener, C., Schafer, G., Swan, S., Demarchi, C., Freeman, T.P., Warrington, P., Rupasinghe, I., Ramoutar, A., Tan, N., Wingham, G., Lewis, S., Curran, H.V., 2012. Sub-chronic impact of cannabinoids in street cannabis on cognition, psychotic-like symptoms and psychological well-being. *Psychol. Med.* 42, 391–400. <https://doi.org/10.1017/S0033291711001322>
- Morgan, C.J.A., Schafer, G., Freeman, T.P., Curran, H.V., 2010. Impact of cannabidiol on the acute memory and psychotomimetic effects of smoked cannabis: naturalistic study. *Br J Psychiatry* 197, 285–290. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.110.077503>
- Morgan, D.J., Muller, C.H., Murataeva, N.A., Davis, B.J., Mackie, K., 2012. Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) attenuates mouse sperm motility and male fecundity: Cannabinoid inhibition of sperm motility. *British Journal of Pharmacology* 165, 2575–2583. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01506.x>
- Morrill, G.A., Kostellow, A.B., Ziegler, D.H., Fujimoto, G.I., 1983. Effects of Cannabinoids on Function of Testis and Secondary Sex Organs in the Fischer Rat. *Pharmacology* 26, 20–28. <https://doi.org/10.1159/000137765>
- Morrison, S.J., Spradling, A.C., 2008. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* 132, 598–611. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038>
- Moscovitz, J., Aleksunes, L., 2013. Establishment of Metabolism and Transport Pathways in the Rodent and Human Fetal Liver. *IJMS* 14, 23801–23827. <https://doi.org/10.3390/ijms141223801>
- Moses, M.M., Behringer, R.R., 2019. A gene regulatory network for Müllerian duct regression. *Environmental Epigenetics* 5, dvz017. <https://doi.org/10.1093/eep/dvz017>
- Mossadegh-Keller, N., Gentek, R., Gimenez, G., Bigot, S., Mailfert, S., Sieweke, M.H., 2017. Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. *Journal of Experimental Medicine* 214, 2829–2841. <https://doi.org/10.1084/jem.20170829>
- Mossadegh-Keller, N., Sieweke, M.H., 2018. Testicular macrophages: Guardians of fertility. *Cellular Immunology* 330, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.03.009>
- Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2015. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocrine Reviews* 36, 564–591. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1101>

- Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 25, 747–806. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0022>
- Muciaccia, B., Boitani, C., Berloco, B.P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M., de Rooij, D.G., Vicini, E., 2013. Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development1. *Biology of Reproduction* 89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.111682>
- Mughal, B.B., Demeneix, B.A., 2017. Flame retardants and increased risk of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 13, 627–628. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.123>
- Mullen, R.D., Behringer, R.R., 2014. Molecular Genetics of Müllerian Duct Formation, Regression and Differentiation. *Sex Dev* 8, 281–296. <https://doi.org/10.1159/000364935>
- Müller, J., Skakkebaek, N.E., 1983. Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. *Int J Androl* 6, 143–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1983.tb00333.x>
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>
- Munsterberg, A., Lovell-Badge, R., 1991. Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113, 613–624. <https://doi.org/10.1242/dev.113.2.613>
- Murataeva, N., Straiker, A., Mackie, K., 2014. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS: 2-AG synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol* 171, 1379–1391. <https://doi.org/10.1111/bph.12411>
- Murphy, L.L., Gher, J., Steger, R.W., Bartke, A., 1994. Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on copulatory behavior and neuroendocrine responses of male rats to female conspecifics. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 48, 1011–1017. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90213-5](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90213-5)
- Murphy, L.L., Gher, J., Szary, A., 1995. Effects of prenatal exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol on reproductive, endocrine and immune parameters of male and female rat offspring. *Endocr* 3, 875–879. <https://doi.org/10.1007/BF02738892>
- Murphy, L.L., Steger, R.W., Smith, S., Bartke, A., 1990. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol, Cannabinol and Cannabidiol, Alone and in Combinations, on Luteinizing Hormone and Prolactin Release and on Hypothalamic Neurotransmitters in the Male Rat. *Neuroendocrinology* 52, 316–321. <https://doi.org/10.1159/000125604>
- Murphy, S.K., Itchon-Ramos, N., Visco, Z., Huang, Z., Grenier, C., Schrott, R., Acharya, K., Boudreau, M.-H., Price, T.M., Raburn, D.J., Corcoran, D.L., Lucas, J.E., Mitchell, J.T., McClernon, F.J., Cauley, M., Hall, B.J., Levin, E.D., Kollins, S.H., 2018. Cannabinoid exposure and altered DNA methylation in rat and human sperm. *Epigenetics* 13, 1208–1221. <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1554521>
- Myllynen, P., Immonen, E., Kummu, M., Vähäkangas, K., 2009. Developmental expression of drug metabolizing enzymes and transporter proteins in human placenta and fetal tissues. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 5, 1483–1499. <https://doi.org/10.1517/17425250903304049>
- Myrup, C., Westergaard, T., Schnack, T., Oudin, A., Ritz, C., Wohlfahrt, J., Melbye, M., 2008. Testicular Cancer Risk in First- and Second-Generation Immigrants to Denmark. *JNCI*:

- Journal of the National Cancer Institute 100, 41–47.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djm276>
- Nabissi, M., Morelli, M.B., Santoni, M., Santoni, G., 2013. Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis* 34, 48–57. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs328>
- Nadulski, T., Sporkert, F., Schnelle, M., Stadelmann, A.M., Roser, P., Schefter, T., Pragst, F., 2005. Simultaneous and Sensitive Analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in Plasma after Oral Application of Small Doses of THC and Cannabis Extract. *Journal of Analytical Toxicology* 29, 782–789. <https://doi.org/10.1093/jat/29.8.782>
- Naef, M., Russmann, S., Petersen-Felix, S., Brenneisen, R., 2004. Development and pharmacokinetic characterization of pulmonary and intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93, 1176–1184. <https://doi.org/10.1002/jps.20037>
- Nagamine, C.M., Morohashi, K., Carlisle, C., Chang, D.K., 1999. Sex Reversal Caused by Mus musculus domesticus Y Chromosomes Linked to Variant Expression of the Testis-Determining Gene Sry. *Developmental Biology* 216, 182–194. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9436>
- Nagano, R., Tabata, S., Nakanishi, Y., Ohsako, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., 2000. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat. Rec.* 258, 210–220. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(20000201\)258:2<210::AID-AR10>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(20000201)258:2<210::AID-AR10>3.0.CO;2-X)
- Nagano, T., Suzuki, F., 1976. The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze-fracture. *Anat. Rec.* 185, 403–417. <https://doi.org/10.1002/ar.1091850403>
- Nahas, G.G., Frick, H.C., Lattimer, J.K., Latour, C., Harvey, D., 2002. Pharmacokinetics of THC in brain and testis, male gametotoxicity and premature apoptosis of spermatozoa. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 17, 103–113. <https://doi.org/10.1002/hup.369>
- Nakagawa, T., Nabeshima, Y., Yoshida, S., 2007. Functional Identification of the Actual and Potential Stem Cell Compartments in Mouse Spermatogenesis. *Developmental Cell* 12, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.002>
- Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R.E., Yoshida, S., 2010. Functional Hierarchy and Reversibility Within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment. *Science* 328, 62–67. <https://doi.org/10.1126/science.1182868>
- Nakanishi, Y., Shiratsuchi, A., 2004. Phagocytic Removal of Apoptotic Spermatogenic Cells by Sertoli Cells: Mechanisms and Consequences. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27, 13–16. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.13>
- Nallendran, V., Lam, P., Marczylo, T., Bankart, M., Taylor, A., Taylor, D., Konje, J., 2010. The plasma levels of the endocannabinoid, anandamide, increase with the induction of labour: Anandamide and induction of labour. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 117, 863–869. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02555.x>
- Naresh Kumar, M., V.B.S.C., T., G.K., V., B., C.S., Guntupalli, S., J.S., B., 2016. Molecular characterization of human ABHD2 as TAG lipase and ester hydrolase. *Bioscience Reports* 36, e00358. <https://doi.org/10.1042/BSR20160033>
- Nasrin, S., Watson, C.J.W., Perez-Paramo, Y.X., Lazarus, P., 2021. Cannabinoid Metabolites as Inhibitors of Major Hepatic CYP450 Enzymes, with Implications for Cannabis-Drug

- Interactions. Drug Metab Dispos 49, 1070–1080. <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000442>
- Nassan, Feiby L., Arvizu, M., Mínguez-Alarcón, L., Williams, P.L., Attaman, J., Petrozza, J., Hauser, R., Chavarro, J., EARTH Study Team, 2019. Marijuana smoking and markers of testicular function among men from a fertility centre. *Hum Reprod* 34, 715–723. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez002>
- Nassan, Feiby L., Arvizu, M., Mínguez-Alarcón, L., Williams, P.L., Attaman, J., Petrozza, J., Hauser, R., Chavarro, J., EARTH Study Team, Ford, J.B., Keller, M.G., 2019. Marijuana smoking and markers of testicular function among men from a fertility centre. *Human Reprod* 34, 715–723. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez002>
- Naumenko, V.A., Tyulenev, Y.A., Yakovenko, S.A., Kurilo, L.F., Shileyko, L.V., Segal, A.S., Zavalishina, L.E., Klimova, R.R., Tsibizov, A.S., Alkhovskii, S.V., Kushch, A.A., 2011. Detection of human cytomegalovirus in motile spermatozoa and spermatogenic cells in testis organotypic culture. *Herpesviridae* 2, 7. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-2-7>
- Navarro, G., Reyes-Resina, I., Rivas-Santisteban, R., Sánchez de Medina, V., Morales, P., Casano, S., Ferreira-Vera, C., Lillo, A., Aguinaga, D., Jagerovic, N., Nadal, X., Franco, R., 2018. Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB1 and CB2 receptors with smaller effect in CB1-CB2 heteroreceptor complexes. *Biochemical Pharmacology* 157, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.046>
- Navarro, G., Varani, K., Lillo, A., Vincenzi, F., Rivas-Santisteban, R., Raïch, I., Reyes-Resina, I., Ferreira-Vera, C., Borea, P.A., Sánchez de Medina, V., Nadal, X., Franco, R., 2020. Pharmacological data of cannabidiol- and cannabigerol-type phytocannabinoids acting on cannabinoid CB1, CB2 and CB1/CB2 heteromer receptors. *Pharmacological Research* 159, 104940. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104940>
- Nef, S., Stévant, I., Greenfield, A., 2019. Characterizing the bipotential mammalian gonad, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 167–194. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.002>
- Nel-Themaat, L., Jang, C.-W., Stewart, M.D., Akiyama, H., Viger, R.S., Behringer, R.R., 2011. Sertoli Cell Behaviors in Developing Testis Cords and Postnatal Seminiferous Tubules of the Mouse. *Biology of Reproduction* 84, 342–350. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086900>
- Nettersheim, D., Jostes, S., Schneider, S., Schorle, H., 2016. Elucidating human male germ cell development by studying germ cell cancer. *Reproduction* 152, R101–R113. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0114>
- Newmeyer, M.N., Swortwood, M.J., Barnes, A.J., Abulseoud, O.A., Scheidweiler, K.B., Huestis, M.A., 2016. Free and Glucuronide Whole Blood Cannabinoids' Pharmacokinetics after Controlled Smoked, Vaporized, and Oral Cannabis Administration in Frequent and Occasional Cannabis Users: Identification of Recent Cannabis Intake. *Clinical Chemistry* 62, 1579–1592. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.263475>
- Nguyen, D.H., Soygur, B., Peng, S.-P., Malki, S., Hu, G., Laird, D.J., 2020. Apoptosis in the fetal testis eliminates developmentally defective germ cell clones. *Nat Cell Biol* 22, 1423–1435. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00603-8>
- Nicholson, A.N., Turner, C., Stone, B.M., Robson, P.J., 2004. Effect of Δ -9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Nocturnal Sleep and Early-Morning

- Behavior in Young Adults. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 24, 305–313. <https://doi.org/10.1097/01.jcp.0000125688.05091.8f>
- Nicolussi, S., Gertsch, J., 2015. Endocannabinoid Transport Revisited, in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 441–485. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.12.011>
- Nidadavolu, P., Bilkei-Gorzo, A., Krämer, M., Schürmann, B., Palmisano, M., Beins, E.C., Madea, B., Zimmer, A., 2021. Efficacy of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) Alone or in Combination With a 1:1 Ratio of Cannabidiol (CBD) in Reversing the Spatial Learning Deficits in Old Mice. *Front. Aging Neurosci.* 13, 718850. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.718850>
- Niehaus, J.L., Liu, Y., Wallis, K.T., Egertová, M., Bhartur, S.G., Mukhopadhyay, S., Shi, S., He, H., Selley, D.E., Howlett, A.C., Elphick, M.R., Lewis, D.L., 2007. CB₁ Cannabinoid Receptor Activity Is Modulated by the Cannabinoid Receptor Interacting Protein CRIP 1a. *Mol Pharmacol* 72, 1557–1566. <https://doi.org/10.1124/mol.107.039263>
- Nielsen, J.E., Rolland, A.D., Rajpert-De Meyts, E., Janfelt, C., Jørgensen, A., Winge, S.B., Kristensen, D.M., Juul, A., Chalmel, F., Jégou, B., Skakkebaek, N.E., 2019a. Characterisation and localisation of the endocannabinoid system components in the adult human testis. *Sci Rep* 9, 12866. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49177-y>
- Nielsen, J.E., Rolland, A.D., Rajpert-De Meyts, E., Janfelt, C., Jørgensen, A., Winge, S.B., Kristensen, D.M., Juul, A., Chalmel, F., Jégou, B., Skakkebaek, N.E., 2019b. Characterisation and localisation of the endocannabinoid system components in the adult human testis. *Sci Rep* 9, 12866. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49177-y>
- Nigam, M., Aschebrook-Kilfoy, B., Shikanov, S., Eggener, S., 2015. Increasing incidence of testicular cancer in the United States and Europe between 1992 and 2009. *World J Urol* 33, 623–631. <https://doi.org/10.1007/s00345-014-1361-y>
- Nistal, M., Abaurrea, M.A., Paniagua, R., 1982. Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to the onset of puberty. *J Anat* 134, 351–363.
- Nistal, M., Paniagua, R., 1983. The postnatal development of the human sertoli cells. *Z Mikrosk Anat Forsch* 97, 739–752.
- Nistal, M., Paniagua, R., Regadera, J., Santamaria, L., Amat, P., 1986. A quantitative morphological study of human Leydig cells from birth to adulthood. *Cell Tissue Res.* 246, 229–236. <https://doi.org/10.1007/BF00215884>
- Nogueras-Ortiz, C., Yudowski, G.A., 2016. The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. *Mol Pharmacol* 90, 620–626. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104539>
- Nomura, D.K., Morrison, B.E., Blankman, J.L., Long, J.Z., Kinsey, S.G., Marcondes, M.C.G., Ward, A.M., Hahn, Y.K., Lichtman, A.H., Conti, B., Cravatt, B.F., 2011. Endocannabinoid Hydrolysis Generates Brain Prostaglandins That Promote Neuroinflammation. *Science* 334, 809–813. <https://doi.org/10.1126/science.1209200>
- Noreen, N., Muhammad, F., Akhtar, B., Azam, F., Anwar, M.I., 2018. Is Cannabidiol a Promising Substance for New Drug Development? A Review of its Potential Therapeutic Applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 28, 73–86. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018021528>
- Norton, J.N., Skinner, M.K., 1989. Regulation of Sertoli Cell Function and Differentiation through the Actions of a Testicular Paracrine Factor P-Mod-S*. *Endocrinology* 124, 2711–2719. <https://doi.org/10.1210/endo-124-6-2711>
- N’Tumba-Byn, T., Moison, D., Lacroix, M., Lecureuil, C., Lesage, L., Prud’homme, S.M., Pozzi-Gaudin, S., Frydman, R., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2012. Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse

- Fetal Leydig Cell Function. *PLoS ONE* 7, e51579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051579>
- Oakberg, E.F., 1971. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.* 169, 515–531. <https://doi.org/10.1002/ar.1091690305>
- Oakberg, E.F., 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 99, 507–516. <https://doi.org/10.1002/aja.1000990307>
- Oatley, J.M., Oatley, M.J., Avarbock, M.R., Tobias, J.W., Brinster, R.L., 2009. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development* 136, 1191–1199. <https://doi.org/10.1242/dev.032243>
- Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies, 2021. Rapport européen sur les drogues 2021: tendances et évolutions. Publications Office, LU.
- Ochiai, W., Hirose, A., Kawamura, T., Komachi, K., Yamamoto, Y., Kitaoka, S., Hatogai, J., Kusunoki, Y., Kon, R., Ikarashi, N., Sugiyama, K., 2016. Role of the Drug-Metabolizing Enzyme CYP during Mouse Liver Development. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 39, 2015–2021. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00479>
- Ochiai, W., Kitaoka, S., Kawamura, T., Hatogai, J., Harada, S., Iizuka, M., Ariumi, M., Takano, S., Nagai, T., Sasatsu, M., Sugiyama, K., 2021. Maternal and Fetal Pharmacokinetic Analysis of Cannabidiol during Pregnancy in Mice. *Drug Metab Dispos* 49, 337–343. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000270>
- O'Donnell, L., 2014. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis* 4, e979623. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979623>
- O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I., Stanton, P.G., 2011. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis* 1, 14–35. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525>
- O'Donnell, L., Smith, L.B., Rebourcet, D., 2022. Sertoli cells as key drivers of testis function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 121, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.06.016>
- OFDT Drogues et addictions, Chiffres clés, 2022.
- Oga, E.A., Mark, K., Coleman-Cowger, V.H., 2018. Cigarette Smoking Status and Substance Use in Pregnancy. *Matern Child Health J* 22, 1477–1483. <https://doi.org/10.1007/s10995-018-2543-9>
- O'Hara, L., McInnes, K., Simitsidellis, I., Morgan, S., Atanassova, N., Slowikowska-Hilczek, J., Kula, K., Szarras-Czapnik, M., Milne, L., Mitchell, R.T., Smith, L.B., 2015. Autocrine androgen action is essential for Leydig cell maturation and function, and protects against late-onset Leydig cell apoptosis in both mice and men. *FASEB j.* 29, 894–910. <https://doi.org/10.1096/fj.14-255729>
- O'Hara, L., Smith, L.B., 2015. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29, 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.006>
- Ohkubo, Y., Shirayoshi, Y., Nakatsuji, N., 1996. Autonomous Regulation of Proliferation and Growth Arrest in Mouse Primordial Germ Cells Studied by Mixed and Clonal Cultures. *Experimental Cell Research* 222, 291–297. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0037>
- Ohlsson, A., Lindgren, J.-E., Andersson, S., Agurell, S., Gillespie, H., Hollister, L.E., 1986. Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and

- intravenous administration. *Biol. Mass Spectrom.* 13, 77–83.
<https://doi.org/10.1002/bms.1200130206>
- Ohlsson, A., Lindgren, J.-E., Wahlén, A., Agurell, S., Hollister, L.E., Gillespie, H.K., 1982. Single dose kinetics of deuterium labelled Δ^1 -tetrahydrocannabinol in heavy and light cannabis users. *Biol. Mass Spectrom.* 9, 6–10.
<https://doi.org/10.1002/bms.1200090103>
- Ohlsson, A., Lindgren, J.-E., Wahlen, A., Agurell, S., Hollister, L.E., Gillespie, H.K., 1980. Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther* 28, 409–416.
<https://doi.org/10.1038/clpt.1980.181>
- Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., Sugiura, T., 2007. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, 928–934. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.078>
- Okamoto, Y., Tsuboi, K., Ueda, N., 2009. Chapter 1 Enzymatic Formation of Anandamide, in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(09\)81001-7](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(09)81001-7)
- Okamoto, Y., Wang, J., Morishita, J., Ueda, N., 2007. Biosynthetic Pathways of the Endocannabinoid Anandamide. *Chemistry & Biodiversity* 4, 1842–1857.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200790155>
- Oláh, M., Milloh, H., Wenger, T., 2008. The role of endocannabinoids in the regulation of luteinizing hormone and prolactin release. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286, S36–S40. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.005>
- Oliver, E., Stukenborg, J.-B., 2020. Rebuilding the human testis in vitro. *Andrology* 8, 825–834. <https://doi.org/10.1111/andr.12710>
- Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H.J., 2005. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5, 210–222. <https://doi.org/10.1038/nrc1568>
- O’Rahilly, R., 1983. The timing and sequence of events in the development of the human reproductive system during the embryonic period proper. *Anat Embryol* 166, 247–261. <https://doi.org/10.1007/BF00305086>
- Orth, J.M., 1982. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* 203, 485–492.
<https://doi.org/10.1002/ar.1092030408>
- Orth, J.M., Gunsalus, G.L., Lamperti, A.A., 1988. Evidence From Sertoli Cell-Depleted Rats Indicates That Spermatid Number in Adults Depends on Numbers of Sertoli Cells Produced During Perinatal Development*. *Endocrinology* 122, 787–794.
<https://doi.org/10.1210/endo-122-3-787>
- O’Shaughnessy, P., 2015. Testicular Development, in: *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 567–594. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00014-4>
- O’Shaughnessy, P.J., 2014. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29, 55–65.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.02.010>
- O’Shaughnessy, P.J., Baker, P., Sohnius, U., Haavisto, A.-M., Charlton, H.M., Huhtaniemi, I., 1998. Fetal Development of Leydig Cell Activity in the Mouse Is Independent of Pituitary Gonadotroph Function*. *Endocrinology* 139, 1141–1146.
<https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5788>

- O'Shaughnessy, P.J., Baker, P.J., Heikkilä, M., Vainio, S., McMahon, A.P., 2000. Localization of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/17-Ketosteroid Reductase Isoform Expression in the Developing Mouse Testis—Androstenedione Is the Major Androgen Secreted by Fetal/Neonatal Leydig Cells*. *Endocrinology* 141, 2631–2637. <https://doi.org/10.1210/endo.141.7.7545>
- O'Shaughnessy, P.J., Baker, P.J., Johnston, H., 2006. The foetal Leydig cell - differentiation, function and regulation. *Int J Androl* 29, 90–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00555.x>
- O'Shaughnessy, P.J., Baker, P.J., Monteiro, A., Cassie, S., Bhattacharya, S., Fowler, P.A., 2007. Developmental Changes in Human Fetal Testicular Cell Numbers and Messenger Ribonucleic Acid Levels during the Second Trimester. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 4792–4801. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1690>
- O'Shaughnessy, P.J., Fowler, P.A., 2014. Development of the human fetal testis. *Annales d'Endocrinologie* 75, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.009>
- O'Shaughnessy, P.J., Fowler, P.A., 2011. Endocrinology of the mammalian fetal testis. *REPRODUCTION* 141, 37–46. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0365>
- Ostler, H., Huang, H.Y., Masch, R.J., Shapiro, E., 2007. A Cellular Study of Human Testis Development. *Sex Dev* 1, 286–292. <https://doi.org/10.1159/000108930>
- O'Sullivan, S.E., 2007. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Cannabinoids and PPARs. *British Journal of Pharmacology* 152, 576–582. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707423>
- O'Sullivan, S.E., Kendall, D.A., 2010. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology* 215, 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.09.007>
- Otulakowski, B., 1992. Innervation of the testis in human fetuses from 16th to 22nd week. *Folia Morphol (Warsz)* 51, 81–85.
- Pace, H.B., Davis, W.M., Borgen, L.A., 1971. TERATOGENESIS AND MARIJUANA. *Ann NY Acad Sci* 191, 123–131. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1971.tb13992.x>
- Pacey, A.A., Povey, A.C., Clyma, J.-A., McNamee, R., Moore, H.D., Baillie, H., Cherry, N.M., Participating Centres of Chaps-UK, 2014. Modifiable and non-modifiable risk factors for poor sperm morphology. *Human Reproduction* 29, 1629–1636. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu116>
- Pacifico, D., Miselli, F., Micheler, M., Carboni, A., Ranalli, P., Mandolino, G., 2006. Genetics and Marker-assisted Selection of the Chemotype in *Cannabis sativa* L. *Mol Breeding* 17, 257–268. <https://doi.org/10.1007/s11032-005-5681-x>
- Pagotto, U., Marsicano, G., Fezza, F., Theodoropoulou, M., Grübler, Y., Stalla, J., Arzberger, T., Milone, A., Losa, M., Di Marzo, V., Lutz, B., Stalla, G.K., 2001. Normal Human Pituitary Gland and Pituitary Adenomas Express Cannabinoid Receptor Type 1 and Synthesize Endogenous Cannabinoids: First Evidence for a Direct Role of Cannabinoids on Hormone Modulation at the Human Pituitary Level ¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 2687–2696. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.6.7565>
- Paland, N., Pechkovsky, A., Aswad, M., Hamza, H., Popov, T., Shahar, E., Louria-Hayon, I., 2021. The Immunopathology of COVID-19 and the Cannabis Paradigm. *Front. Immunol.* 12, 631233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631233>

- Palmer, S.J., Burgoyne, P.S., 1991. In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX—XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* 112, 265–268. <https://doi.org/10.1242/dev.112.1.265>
- Paniagua, R., Codesal, J., Nistal, M., Rodriguez, M.C., Santamaría, L., 1987. Quantification of cell types throughout the cycle of the human seminiferous epithelium and their DNA content: A new approach to the spermatogonial stem cell in man. *Anat Embryol* 176, 225–230. <https://doi.org/10.1007/BF00310055>
- Paniagua, R., Nistal, M., 1984. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *J Anat* 139 (Pt 3), 535–552.
- Paria, B.C., Das, S.K., Dey, S.K., 1995. The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9460–9464. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9460>
- Paria, B.C., Deutsch, D.D., Dey, S.K., 1996. The uterus is a potential site for anandamide synthesis and hydrolysis: Differential profiles of anandamide synthase and hydrolase activities in the mouse uterus during the periimplantation period. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 183–192. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199610\)45:2<183::AID-MRD11>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2<183::AID-MRD11>3.0.CO;2-2)
- Paria, B.C., Ma, W., Andrenyak, D.M., Schmid, P.C., Schmid, H.H.O., Moody, D.E., Deng, H., Makriyannis, A., Dey, S.K., 1998. Effects of Cannabinoids on Preimplantation Mouse Embryo Development and Implantation are Mediated by Brain-Type Cannabinoid Receptors1. *Biology of Reproduction* 58, 1490–1495. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.6.1490>
- Paria, B.C., Song, H., Wang, X., Schmid, P.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H.O., Bonner, T.I., Zimmer, A., Dey, S.K., 2001. Dysregulated Cannabinoid Signaling Disrupts Uterine Receptivity for Embryo Implantation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 20523–20528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100679200>
- Park, B., McPartland, J.M., Glass, M., 2004. Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.04.007>
- Pask, A., 2016. The Reproductive System, in: Wilhelm, D., Bernard, P. (Eds.), *Non-Coding RNA and the Reproductive System, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–12. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8_1
- Patek, C.E., Kerr, J.B., Gosden, R.G., Jones, K.W., Hardy, K., Muggleton-Harris, A.L., Handyside, A.H., Whittingham, D.G., Hooper, M.L., 1991. Sex chimaerism, fertility and sex determination in the mouse. *Development* 113, 311–325. <https://doi.org/10.1242/dev.113.1.311>
- Patilea-Vrana, G.I., Unadkat, J.D., 2021. Development and Verification of a Linked Δ 9-THC/11-OH-THC Physiologically Based Pharmacokinetic Model in Healthy, Nonpregnant Population and Extrapolation to Pregnant Women. *Drug Metab Dispos* 49, 509–520. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000322>
- Paton, W.D.M., Pertwee, R.G., 1972. Effect of cannabis and certain of its constituents on pentobarbitone sleeping time and phenazone metabolism. *British Journal of Pharmacology* 44, 250–261. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1972.tb07261.x>
- Paulozzi, L.J., 1999. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environmental Health Perspectives* 107, 297–302. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107297>

- Pauls, K., Schorle, H., Jeske, W., Brehm, R., Steger, K., Wernert, N., Büttner, R., Zhou, H., 2006. Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. *Human Reproduction* 21, 397–404. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei325>
- Payne, A.H., Hales, D.B., 2004. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocrine Reviews* 25, 947–970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>
- Payne, K.S., Mazur, D.J., Hotaling, J.M., Pastuszak, A.W., 2019a. Cannabis and Male Fertility: A Systematic Review. *Journal of Urology* 202, 674–681. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000248>
- Payne, K.S., Mazur, D.J., Hotaling, J.M., Pastuszak, A.W., 2019b. Cannabis and Male Fertility: A Systematic Review. *J Urol* 202, 674–681. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000248>
- Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., Corsi, L., 2018. *Cannabis sativa* L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed Research International* 2018, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>
- Pellegrini, M., Filipponi, D., Gori, M., Barrios, F., Lolicato, F., Grimaldi, P., Rossi, P., Jannini, E.A., Geremia, R., Dolci, S., 2008. ATRA and KL promote differentiation toward the meiotic program of male germ cells. *Cell Cycle* 7, 3878–3888. <https://doi.org/10.4161/cc.7.24.7262>
- Pelliniemi, L.J., Niemi, M., 1969. Fine structure of the human foetal testis: I. The interstitial tissue. *Z. Zellforsch.* 99, 507–522. <https://doi.org/10.1007/BF00340942>
- Peng, L., Cui, J.Y., Yoo, B., Gunewardena, S.S., Lu, H., Klaassen, C.D., Zhong, X., 2013. RNA-Sequencing Quantification of Hepatic Ontogeny of Phase-I Enzymes in Mice. *Drug Metab Dispos* 41, 2175–2186. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.054635>
- Peng, L., Yoo, B., Gunewardena, S.S., Lu, H., Klaassen, C.D., Zhong, X., 2012. RNA Sequencing Reveals Dynamic Changes of mRNA Abundance of Cytochromes P450 and Their Alternative Transcripts during Mouse Liver Development. *Drug Metab Dispos* 40, 1198–1209. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.045088>
- Perez-Reyes, M., 1990. Marijuana smoking: factors that influence the bioavailability of tetrahydrocannabinol. *NIDA Res Monogr* 99, 42–62.
- Perez-Reyes, M., Timmons, M.C., Davis, K.H., Wall, E.M., 1973. A comparison of the pharmacological activity in man of intravenously administered delta9-tetrahydrocannabinol, cannabitol, and cannabidiol. *Experientia* 29, 1368–1369. <https://doi.org/10.1007/BF01922823>
- Perez-Reyes, M., Wall, M.E., 1982. Presence of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Human Milk. *N Engl J Med* 307, 819–820. <https://doi.org/10.1056/NEJM198209233071311>
- Persaud, T.V., Ellington, A.C., 1968. The effects of cannabis sativa L. (Ganja) on developing rat embryos--preliminary observations. *West Indian Med J* 17, 232–234.
- Persaud, T.V.N., Ellington, A.C., 1967. CANNABIS IN EARLY PREGNANCY. *The Lancet* 290, 1306. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(67\)90416-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(67)90416-3)
- Pertwee, R., 2010. Receptors and Channels Targeted by Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists and Antagonists. *CMC* 17, 1360–1381. <https://doi.org/10.2174/092986710790980050>
- Pertwee, R.G., 2008. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin.

- British Journal of Pharmacology 153, 199–215.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>
- Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P.H., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., Ross, R.A., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev* 62, 588–631. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003004>
- Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D.J., Schöler, H.R., 1998. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mechanisms of Development* 71, 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00002-1)
- Petrelli, G., Mantovani, A., 2002. Environmental risk factors and male fertility and reproduction. *Contraception* 65, 297–300. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(02\)00298-6](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(02)00298-6)
- Phillips, B.T., Gassei, K., Orwig, K.E., 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 1663–1678. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0026>
- Picollet-D'ahan, N., Zuchowska, A., Lemeunier, I., Le Gac, S., 2021. Multiorgan-on-a-Chip: A Systemic Approach To Model and Decipher Inter-Organ Communication. *Trends in Biotechnology* 39, 788–810. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.014>
- Pierucci-Alves, F., Clark, A.M., Russell, L.D., 2001. A Developmental Study of the Desert Hedgehog-Null Mouse Testis1. *Biology of Reproduction* 65, 1392–1402. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1392>
- Piquet-Pellorce, C., Dorval-Coiffec, I., Pham, M.-D., Jégou, B., 2000. Leukemia Inhibitory Factor Expression and Regulation within the Testis. *Endocrinology* 141, 1136–1141. <https://doi.org/10.1210/endo.141.3.7399>
- Pizzol, D., Demurtas, J., Stubbs, B., Soysal, P., Mason, C., Isik, A.T., Solmi, M., Smith, L., Veronese, N., 2019. Relationship Between Cannabis Use and Erectile Dysfunction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Mens Health* 13, 155798831989246. <https://doi.org/10.1177/1557988319892464>
- Plant, T.M., 2015. Neuroendocrine control of the onset of puberty. *Frontiers in Neuroendocrinology* 38, 73–88. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.04.002>
- Plant, T.M., Marshall, G.R., 2001. The Functional Significance of FSH in Spermatogenesis and the Control of Its Secretion in Male Primates. *Endocrine Reviews* 22, 764–786. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0446>
- Pointis, G., Latreille, M.-T., Mignot, T.-M., Janssens, Y., Cedard, L., 1979. Regulation of testosterone synthesis in the fetal mouse testis. *Journal of Steroid Biochemistry* 11, 1609–1612. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(79\)90357-1](https://doi.org/10.1016/0022-4731(79)90357-1)
- Pointis, G., Mahoudeau, J.A., 1977. RESPONSIVENESS OF FOETAL MOUSE TESTIS TO GONADOTROPHINS AT VARIOUS TIMES DURING SEXUAL DIFFERENTIATION. *Journal of Endocrinology* 74, 149–150. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0740149>
- Pollio, A., 2016. The Name of *Cannabis*: A Short Guide for Nonbotanists. *Cannabis and Cannabinoid Research* 1, 234–238. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0027>
- Potter, S.J., DeFalco, T., 2017. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction* 153, R151–R162. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0588>
- Price, T.J., Patwardhan, A., Akopian, A.N., Hargreaves, K.M., Flores, C.M., 2004. Modulation of trigeminal sensory neuron activity by the dual cannabinoid-vanilloid agonists

- anandamide, *N*-arachidonoyl-dopamine and arachidonoyl-2-chloroethylamide: Cannabinoid-vanilloid modulation of trigeminal neuron activity. *British Journal of Pharmacology* 141, 1118–1130. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705711>
- Prince, F.P., 1990. Ultrastructural evidence of mature Leydig cells and Leydig cell regression in the neonatal human testis. *Anat. Rec.* 228, 405–417. <https://doi.org/10.1002/ar.1092280406>
- Pui, H.P., Saga, Y., 2017. Gonocytes-to-spermatogonia transition initiates prior to birth in murine testes and it requires FGF signaling. *Mechanisms of Development* 144, 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.03.002>
- Purdue, M.P., Devesa, S.S., Sigurdson, A.J., McGlynn, K.A., 2005. International patterns and trends in testis cancer incidence. *Int. J. Cancer* 115, 822–827. <https://doi.org/10.1002/ijc.20931>
- Qazi, Q., Mariano, E., Beller, E., Milman, D., Crombleholme, W., 1982. Is marijuana smoking fetotoxic? *Pediatric Research*.
- Qin, N., Neeper, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L., Flores, C.M., 2008. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 28, 6231–6238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008>
- Quinlivan, J.A., Evans, S.F., 2002. The impact of continuing illegal drug use on teenage pregnancy outcomes—a prospective cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 109, 1148–1153. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2002.01536.x>
- Radwan, M.M., Chandra, S., Gul, S., ElSohly, M.A., 2021. Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules* 26, 2774. <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
- Rager, J.E., Bangma, J., Carberry, C., Chao, A., Grossman, J., Lu, K., Manuck, T.A., Sobus, J.R., Szilagyi, J., Fry, R.C., 2020. Review of the environmental prenatal exposome and its relationship to maternal and fetal health. *Reproductive Toxicology* 98, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.02.004>
- Ragia, G., Manolopoulos, V.G., 2020. Inhibition of SARS-CoV-2 entry through the ACE2/TMPRSS2 pathway: a promising approach for uncovering early COVID-19 drug therapies. *Eur J Clin Pharmacol* 76, 1623–1630. <https://doi.org/10.1007/s00228-020-02963-4>
- Rahmoun, M., Lavery, R., Laurent-Chaballier, S., Bellora, N., Philip, G.K., Rossitto, M., Symon, A., Pailhoux, E., Cammas, F., Chung, J., Bagheri-Fam, S., Murphy, M., Bardwell, V., Zarkower, D., Boizet-Bonhoure, B., Clair, P., Harley, V.R., Poulat, F., 2017. In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic Acids Research* 45, 7191–7211. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx328>
- Rajanahally, S., Raheem, O., Rogers, M., Brisbane, W., Ostrowski, K., Lendvay, T., Walsh, T., 2019. The relationship between cannabis and male infertility, sexual health, and neoplasm: a systematic review. *Andrology* 7, 139–147. <https://doi.org/10.1111/andr.12585>
- Rajpert-De Meyts, E., 2006. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Human Reproduction Update* 12, 303–323. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmk006>

- Rajpert-De Meyts, E., 2004. Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Human Reproduction* 19, 1338–1344. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh265>
- Rajpert-De Meyts, E., Bartkova, J., Samson, M., Hoei-Hansen, C.E., Frydelund-Larsen, L., Bartek, J., Skakkebaek, N.E., 2003. The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. *Apmis* 111, 267–279. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.11101301.x>
- Rajpert-De Meyts, E., Hoei-Hansen, C.E., 2007. From Gonocytes to Testicular Cancer: The Role of Impaired Gonadal Development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1120, 168–180. <https://doi.org/10.1196/annals.1411.013>
- Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Brøndum-Nielsen, K., Müller, J., Skakkebaek, N.E., 1998. Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS* 106, 198–206. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1998.tb01336.x>
- Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Græm, N., Müller, J., Cate, R.L., Skakkebaek, N.E., 1999. Expression of Anti-Müllerian Hormone during Normal and Pathological Gonadal Development: Association with Differentiation of Sertoli and Granulosa Cells ¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84, 3836–3844. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.10.6047>
- Rajpert-De Meyts, E., McGlynn, K.A., Okamoto, K., Jewett, M.A.S., Bokemeyer, C., 2016. Testicular germ cell tumours. *The Lancet* 387, 1762–1774. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00991-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00991-5)
- Rajpert-De Meyts, E., Nielsen, J.E., Skakkebaek, N.E., Almstrup, K., 2015. Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochem Cytobiol* 53, 177–188. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2015.0020>
- Ramaswamy, S., Weinbauer, G.F., 2014. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis* 4, e996025. <https://doi.org/10.1080/21565562.2014.996025>
- Ramsey, I.S., Delling, M., Clapham, D.E., 2006. AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>
- Rana, K., Davey, R., Zajac, J., 2014. Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models. *Asian J Androl* 16, 169. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122590>
- Ranaldi, G., Consalvo, R., Sambuy, Y., Scarino, M.L., 2003. Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media. *Toxicology in Vitro* 17, 761–767. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00095-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00095-X)
- Rapino, C., Battista, N., Bari, M., Maccarrone, M., 2014. Endocannabinoids as biomarkers of human reproduction. *Human Reproduction Update* 20, 501–516. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu004>
- Rasheed, A., Hines, R.N., McCarver-May, D.G., 1997. Variation in Induction of Human Placental CYP2E1: Possible Role in Susceptibility to Fetal Alcohol Syndrome? *Toxicology and Applied Pharmacology* 144, 396–400. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8152>
- Reece, A.S., Hulse, G.K., 2020a. Cannabis and Pregnancy Don't Mix. *Mo Med* 117, 530–531.

- Reece, A.S., Hulse, G.K., 2020b. Canadian Cannabis Consumption and Patterns of Congenital Anomalies: An Ecological Geospatial Analysis. *Journal of Addiction Medicine* 14, e195–e210. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000638>
- Reece, A.S., Hulse, G.K., 2020c. Broad Spectrum epidemiological contribution of cannabis and other substances to the teratological profile of northern New South Wales: geospatial and causal inference analysis. *BMC Pharmacol Toxicol* 21, 75. <https://doi.org/10.1186/s40360-020-00450-1>
- Reece, A.S., Hulse, G.K., 2019a. Cannabis Consumption Patterns Explain the East-West Gradient in Canadian Neural Tube Defect Incidence: An Ecological Study. *Global Pediatric Health* 6, 2333794X1989479. <https://doi.org/10.1177/2333794X19894798>
- Reece, A.S., Hulse, G.K., 2019b. Cannabis Teratology Explains Current Patterns of Coloradan Congenital Defects: The Contribution of Increased Cannabinoid Exposure to Rising Teratological Trends. *Clin Pediatr (Phila)* 58, 1085–1123. <https://doi.org/10.1177/0009922819861281>
- Rettori, V., Aguila, M.C., Gimeno, M.F., Franchi, A.M., McCann, S.M., 1990. In vitro effect of delta 9-tetrahydrocannabinol to stimulate somatostatin release and block that of luteinizing hormone-releasing hormone by suppression of the release of prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 10063–10066. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.10063>
- Rey, R., 1998. Endocrine, Paracrine and Cellular Regulation of Postnatal Anti-Müllerian Hormone Secretion by Sertoli Cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 9, 271–276. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(98\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(98)00069-1)
- Rey, R., Josso, N., Racine, C., 2000. Sexual Differentiation, in: Feingold, K.R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., de Herder, W.W., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Hofland, H.J., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., McLachlan, R., Morley, J.E., New, M., Purnell, J., Singer, F., Stratakis, C.A., Trencle, D.L., Wilson, D.P. (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Rey, R., Lordereau-Richard, I., Carel, J.C., Barbet, P., Cate, R.L., Roger, M., Chaussain, J.L., Josso, N., 1993. Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 77, 1220–1226. <https://doi.org/10.1210/jcem.77.5.8077315>
- Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C., Bedecarrás, P., 2003. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 211, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.09.007>
- Rey, R.A., 2014. Mini-puberty and true puberty: Differences in testicular function. *Annales d'Endocrinologie* 75, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.001>
- Rey, R.A., Grinspon, R.P., 2011. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 25, 221–238. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.013>
- Rey, R.A., Musse, M., Venara, M., Chemes, H.E., 2009. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: Its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 72, 787–795. <https://doi.org/10.1002/jemt.20754>
- Reyes, F.I., Boroditsky, R.S., Winter, J.S.D., Faiman, C., 1974. Studies on Human Sexual Development. II. Fetal and Maternal Serum Gonadotropin and Sex Steroid

- Concentrations ¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 38, 612–617. <https://doi.org/10.1210/jcem-38-4-612>
- Ricci, G., Cacciola, G., Altucci, L., Meccariello, R., Pierantoni, R., Fasano, S., Cobellis, G., 2007. Endocannabinoid control of sperm motility: The role of epididymus. *General and Comparative Endocrinology* 153, 320–322. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.02.003>
- Richardson, G., 2002. Prenatal alcohol and marijuana exposure Effects on neuropsychological outcomes at 10 years. *Neurotoxicology and Teratology* 24, 309–320. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(02\)00193-9](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(02)00193-9)
- Richer, G., Baert, Y., Goossens, E., 2020. In-vitro spermatogenesis through testis modelling: Toward the generation of testicular organoids. *Andrology* 8, 879–891. <https://doi.org/10.1111/andr.12741>
- Richiardi, L., Pettersson, A., Akre, O., 2007. Genetic and environmental risk factors for testicular cancer. *Int J Androl* 30, 230–241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00760.x>
- Rivarola, M.A., Pasqualini, T., Chemes, H.E., 1983. Testicular testosterone and dihydrotestosterone during sexual development in humans. *Journal of Steroid Biochemistry* 19, 961–964. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(83\)90040-7](https://doi.org/10.1016/0022-4731(83)90040-7)
- Roberts, V.J., 1997. Tissue-specific expression of inhibin/activin subunit and follistatin mRNAs in mid- to late-gestational age human fetal testis and epididymis. *Endocr* 6, 85–90. <https://doi.org/10.1007/BF02738807>
- Robinson, J.F., Hamilton, E.G., Lam, J., Chen, H., Woodruff, T.J., 2020. Differences in cytochrome p450 enzyme expression and activity in fetal and adult tissues. *Placenta* 100, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.07.009>
- Rochira, V., Granata, A.R.M., Madeo, B., Zirilli, L., Rossi, G., Carani, C., 2005. Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years? *Asian J Androl* 7, 3–20. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2005.00018.x>
- Rodprasert, W., Toppari, J., Virtanen, H.E., 2021. Endocrine Disrupting Chemicals and Reproductive Health in Boys and Men. *Front. Endocrinol.* 12, 706532. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706532>
- Rodprasert, W., Virtanen, H.E., Mäkelä, J.-A., Toppari, J., 2020. Hypogonadism and Cryptorchidism. *Front. Endocrinol.* 10, 906. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00906>
- Romano, F., Tripiciano, A., Muciaccia, B., De Cesaris, P., Ziparo, E., Palombi, F., Filippini, A., 2005. The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. *Contraception* 72, 294–297. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2005.03.009>
- Ronaldson-Bouchard, K., Vunjak-Novakovic, G., 2018. Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development. *Cell Stem Cell* 22, 310–324. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.011>
- Roncero, C., Valriberas-Herrero, I., Mezzatesta-Gava, M., Villegas, J.L., Aguilar, L., Grau-López, L., 2020. Cannabis use during pregnancy and its relationship with fetal developmental outcomes and psychiatric disorders. A systematic review. *Reprod Health* 17, 25. <https://doi.org/10.1186/s12978-020-0880-9>
- Roosen-Runge, E.C., Anderson, D., 1959. THE DEVELOPMENT OF THE INTERSTITIAL CELLS IN THE TESTIS OF THE ALBINO RAT. *Cells Tissues Organs* 37, 125–137. <https://doi.org/10.1159/000141460>

- Rørth, M., Meyts, E.R.-D., Andersson, L., Dieckmann, K.-P., Fosså, S.D., Grigor, K.M., Hendry, W.F., Herr, H.W., Looijenga, L.H.J., Wolter Oosterhuis, J., Skakkebaek, N.E., 2000. Carcinoma in situ in the Testis. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 34, 166–186. <https://doi.org/10.1080/00365590050509896>
- Rosenkrantz, H., Esber, H.J., 1980. Cannabinoid-induced hormone changes in monkeys and rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 6, 297–313. <https://doi.org/10.1080/15287398009529853>
- Rosenkrantz, H., Fleischman, R.W., Grant, R.J., 1981. Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology* 58, 118–131. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(81\)90122-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(81)90122-8)
- Rosenkrantz, H., Hayden, D.W., 1979. Acute and subacute inhalation toxicity of Turkish marihuana, cannabichromene, and cannabidiol in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 48, 375–386. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(79\)90421-6](https://doi.org/10.1016/0041-008X(79)90421-6)
- Ross, A., Capel, B., 2005. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.11.004>
- Ross, M.H., Long, I.R., 1966. Contractile Cells in Human Seminiferous Tubules. *Science* 153, 1271–1273. <https://doi.org/10.1126/science.153.3741.1271>
- Rossato, M., Ion Popa, F., Ferigo, M., Clari, G., Foresta, C., 2005. Human Sperm Express Cannabinoid Receptor Cb₁, the Activation of Which Inhibits Motility, Acrosome Reaction, and Mitochondrial Function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90, 984–991. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1287>
- Rossi, G., Gasperi, V., Paro, R., Barsacchi, D., Cecconi, S., Maccarrone, M., 2007. Follicle-Stimulating Hormone Activates Fatty Acid Amide Hydrolase by Protein Kinase A and Aromatase-Dependent Pathways in Mouse Primary Sertoli Cells. *Endocrinology* 148, 1431–1439. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0969>
- Rossitto, M., Philibert, P., Poulat, F., Boizet-Bonhoure, B., 2015. Molecular events and signalling pathways of male germ cell differentiation in mouse. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 45, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.014>
- Rouiller-Fabre, V., Carmona, S., Merhi, R.A., Cate, R., Habert, R., Vigier, B., 1998. Effect of Anti-Mullerian Hormone on Sertoli and Leydig Cell Functions in Fetal and Immature Rats¹. *Endocrinology* 139, 1213–1220. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5785>
- Rouiller-Fabre, V., Habert, R., Livera, G., 2014. Effects of endocrine disruptors on the human fetal testis. *Annales d'Endocrinologie* 75, 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.010>
- Rouiller-Fabre, V., Levacher, C., Pairault, C., Racine, C., Moreau, E., Olaso, R., Livera, G., Migrenne, S., Delbes, G., Habert, R., 2003. Development of the foetal and neonatal testis. *Andrologia* 35, 79–83. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2003.00540.x>
- Rouiller-Fabre, V., Muczynski, V., Lambrot, R., L'Šcureuil, C., Coffigny, H., Pairault, C., Moison, D., Angenard, G., Bakalska, M., Courtot, A.M., Frydman, R., Habert, R., 2009. Ontogenesis of testicular function in humans. *Folia Histochem Cytobiol.* 47, 19–24. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0065-4>
- Roulet, Denis, H., Staub, C., Le Tortorec, A., Delaleu, B., Satie, A.P., Patard, J.J., Jégou, B., Dejuq-Rainsford, N., 2006. Human testis in organotypic culture: application for basic or clinical research. *Hum Reprod* 21, 1564–1575. <https://doi.org/10.1093/humrep/del018>

- Roulet, V, Denis, H., Staub, C., Tortorec, A.L., Delaleu, B., Satie, A.P., Patard, J.J., Jégou, B., Dejuq-Rainsford, N., 2006. Human testis in organotypic culture: application for basic or clinical research. *Hum Reprod* 21, 1564–1575.
- Roulet, Vanessa, Satie, A.-P., Ruffault, A., Le Tortorec, A., Denis, H., Guist'hau, O., Patard, J.-J., Rioux-Leclercq, N., Gicquel, J., Jégou, B., Dejuq-Rainsford, N., 2006. Susceptibility of human testis to human immunodeficiency virus-1 infection in situ and in vitro. *Am J Pathol* 169, 2094–2103. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060191>
- Rouzer, C.A., Marnett, L.J., 2011. Endocannabinoid Oxygenation by Cyclooxygenases, Lipoxygenases, and Cytochromes P450: Cross-Talk between the Eicosanoid and Endocannabinoid Signaling Pathways. *Chem. Rev.* 111, 5899–5921. <https://doi.org/10.1021/cr2002799>
- Rubin, B.S., 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.002>
- Ruehle, S., Wager-Miller, J., Straiker, A., Farnsworth, J., Murphy, M.N., Loch, S., Monory, K., Mackie, K., Lutz, B., 2017. Discovery and characterization of two novel CB1 receptor splice variants with modified N-termini in mouse. *J. Neurochem.* 142, 521–533. <https://doi.org/10.1111/jnc.14099>
- Russell, C., Rueda, S., Room, R., Tyndall, M., Fischer, B., 2018. Routes of administration for cannabis use – basic prevalence and related health outcomes: A scoping review and synthesis. *International Journal of Drug Policy* 52, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2017.11.008>
- Russo, E., Guy, G.W., 2006. A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses* 66, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.08.026>
- Russo, E.B., 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects: Phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* 163, 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>
- Ryan, K.S., Bash, J.C., Hanna, C.B., Hedges, J.C., Lo, J.O., 2021. Effects of marijuana on reproductive health: preconception and gestational effects. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 28, 558–565. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000686>
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J., 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor: GPR55, a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology* 152, 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
- Ryberg, E., Vu, H.K., Larsson, N., Groblewski, T., Hjorth, S., Elebring, T., Sjögren, S., Greasley, P.J., 2005. Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Letters* 579, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.085>
- Saba, R., Kato, Y., Saga, Y., 2014a. NANOS2 promotes male germ cell development independent of meiosis suppression. *Developmental Biology* 385, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.018>
- Saba, R., Wu, Q., Saga, Y., 2014b. CYP26B1 promotes male germ cell differentiation by suppressing STRA8-dependent meiotic and STRA8-independent mitotic pathways. *Developmental Biology* 389, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.02.013>

- Sachs, J., McGlade, E., Yurgelun-Todd, D., 2015. Safety and Toxicology of Cannabinoids. *Neurotherapeutics* 12, 735–746. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0380-8>
- Sadler, N.C., Nandhikonda, P., Webb-Robertson, B.-J., Ansong, C., Anderson, L.N., Smith, J.N., Corley, R.A., Wright, A.T., 2016. Hepatic Cytochrome P450 Activity, Abundance, and Expression Throughout Human Development. *Drug Metabolism and Disposition* 44, 984–991. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.068593>
- Safe, S., 2020. Recent advances in understanding endocrine disruptors: DDT and related compounds. *Fac Rev* 9. <https://doi.org/10.12703/b/9-7>
- Saga, Y., 2010. Function of Nanos2 in the male germ cell lineage in mice. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3815–3822. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0456-x>
- Saga, Y., 2008. Sexual development of mouse germ cells: Nanos2 promotes the male germ cell fate by suppressing the female pathway: Sexual development of mouse germ cells. *Development, Growth & Differentiation* 50, S141–S147. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01009.x>
- Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S., 2014. *La reproduction animale et humaine*, Collection Synthèses. Éditions Quae, Versailles.
- Sakib, S., Uchida, A., Valenzuela-Leon, P., Yu, Y., Valli-Pulaski, H., Orwig, K., Ungrin, M., Dobrinski, I., 2019. Formation of organotypic testicular organoids in microwell culture†. *Biol Reprod* 100, 1648–1660. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz053>
- Saleh Gargari, S., Fallahian, M., Haghighi, L., Hosseinezhad-Yazdi, M., Dashti, E., Dolan, K., 2012. Maternal and neonatal complications of substance abuse in Iranian pregnant women. *Acta Med Iran* 50, 411–416.
- Salehi, A., Puchalski, K., Shokoohinia, Y., Zolfaghari, B., Asgary, S., 2022. Differentiating Cannabis Products: Drugs, Food, and Supplements. *Front. Pharmacol.* 13, 906038. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.906038>
- Sar, M., Lubahn, D.B., French, F.S., Wilson, E.M., 1990. Immunohistochemical Localization of the Androgen Receptor in Rat and Human Tissues*. *Endocrinology* 127, 3180–3186. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-3180>
- Satoh, M., 1991. Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat* 177, 85–107.
- Satti, M.A., Reed, E.G., Wenker, E.S., Mitchell, S.L., Schulkin, J., Power, M.L., Mackeen, A.D., 2022. Factors that shape pregnant women’s perceptions regarding the safety of cannabis use during pregnancy. *J Cannabis Res* 4, 16. <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00128-x>
- Saurel-Cubizolles, M.-J., Prunet, C., Blondel, B., 2014. Cannabis use during pregnancy in France in 2010. *BJOG: Int J Obstet Gy* 121, 971–977. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12626>
- Sayed, T.S., Balasinor, N.H., Nishi, K., 2021. Diverse role of endocannabinoid system in mammalian male reproduction. *Life Sciences* 286, 120035. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120035>
- Schaeffer, C.F., Gunn, C.G., Dubowski, K.M., 1975. Normal Plasma Testosterone Concentrations after Marihuana Smoking. *N Engl J Med* 292, 867–868. <https://doi.org/10.1056/NEJM197504172921615>
- Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T.W., Nair, R.M.G., Debeljuk, L., White, W.F., 1971. Gonadotropin-Releasing Hormone: One Polypeptide Regulates Secretion of Luteinizing and Follicle-Stimulating Hormones. *Science* 173, 1036–1038. <https://doi.org/10.1126/science.173.4001.1036>

- Scheuplein, R.J., 1967. Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J Invest Dermatol* 48, 79–88.
- Scheyer, A.F., Melis, M., Trezza, V., Manzoni, O.J.J., 2019. Consequences of Perinatal Cannabis Exposure. *Trends in Neurosciences* 42, 871–884. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.08.010>
- Schmid, C.L., Bohn, L.M., 2009. Physiological and pharmacological implications of beta-arrestin regulation. *Pharmacology & Therapeutics* 121, 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.11.005>
- Schmid, P.C., Paria, B.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H.O., Dey, S.K., 1997. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4188–4192. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.4188>
- Schmidt, H., Schwarz, H., 2000. Serum concentrations of LH and FSH in the healthy newborn. *Eur J Endocrinol* 143, 213–215. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1430213>
- Schnack, T.H., Poulsen, G., Myrup, C., Wohlfahrt, J., Melbye, M., 2010. Familial Coaggregation of Cryptorchidism, Hypospadias, and Testicular Germ Cell Cancer: A Nationwide Cohort Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 102, 187–192. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp457>
- Schrott, R., Murphy, S.K., 2020. Cannabis use and the sperm epigenome: a budding concern? *Environmental Epigenetics* 6, dvaa002. <https://doi.org/10.1093/eep/dvaa002>
- Schubart, C.D., Sommer, I.E.C., van Gastel, W.A., Goetgebuer, R.L., Kahn, R.S., Boks, M.P.M., 2011. Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. *Schizophrenia Research* 130, 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2011.04.017>
- Schuel, H., Burkman, L.J., Lippes, J., Crickard, K., Forester, E., Piomelli, D., Giuffrida, A., 2002a. N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chemistry and Physics of Lipids* 121, 211–227. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00158-5](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00158-5)
- Schuel, H., Burkman, L.J., Lippes, J., Crickard, K., Mahony, M.C., Giuffrida, A., Picone, R.P., Makriyannis, A., 2002b. Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 376–387. <https://doi.org/10.1002/mrd.90021>
- Schuetz, J.D., Kauma, S., Guzelian, P.S., 1993. Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J. Clin. Invest.* 92, 1018–1024. <https://doi.org/10.1172/JCI116607>
- Schultz, O.-E., Haffner, G., 1960. Zur Frage der Biosynthese der Cannabinole. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 293, 1–8. <https://doi.org/10.1002/ardp.19602930102>
- Schulze, C., 1979. Morphological characteristics of the spermatogonial stem cells in man. *Cell Tissue Res.* 198. <https://doi.org/10.1007/BF00232003>
- Schurman, L.D., Lu, D., Kendall, D.A., Howlett, A.C., Lichtman, A.H., 2019. Molecular Mechanism and Cannabinoid Pharmacology, in: Nader, M.A., Hurd, Y.L. (Eds.), *Substance Use Disorders, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 323–353. https://doi.org/10.1007/164_2019_298
- Schwilke, E.W., Schwoppe, D.M., Karschner, E.L., Lowe, R.H., Darwin, W.D., Kelly, D.L., Goodwin, R.S., Gorelick, D.A., Huestis, M.A., 2009. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), 11-Hydroxy-THC, and 11-Nor-9-carboxy-THC Plasma Pharmacokinetics during and

- after Continuous High-Dose Oral THC. *Clinical Chemistry* 55, 2180–2189. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.122119>
- Schwoppe, D.M., Karschner, E.L., Gorelick, D.A., Huestis, M.A., 2011. Identification of Recent Cannabis Use: Whole-Blood and Plasma Free and Glucuronidated Cannabinoid Pharmacokinetics following Controlled Smoked Cannabis Administration. *Clinical Chemistry* 57, 1406–1414. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.171777>
- Scorticati, C., Fernández-Solari, J., De Laurentiis, A., Mohn, C., Prestifilippo, J.P., Lasaga, M., Seilicovich, A., Billi, S., Franchi, A., McCann, S.M., Rettori, V., 2004. The inhibitory effect of anandamide on luteinizing hormone-releasing hormone secretion is reversed by estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11891–11896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404366101>
- Scotchie, J.G., Savaris, R.F., Martin, C.E., Young, S.L., 2015. Endocannabinoid Regulation in Human Endometrium Across the Menstrual Cycle. *Reprod. Sci.* 22, 113–123. <https://doi.org/10.1177/1933719114533730>
- Scott, H.M., Mason, J.I., Sharpe, R.M., 2009. Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. *Endocrine Reviews* 30, 883–925. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0016>
- Sèdes, L., Thirouard, L., Maqdasy, S., Garcia, M., Caira, F., Lobaccaro, J.-M.A., Beaudoin, C., Volle, D.H., 2018. Cholesterol: A Gatekeeper of Male Fertility? *Front. Endocrinol.* 9, 369. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00369>
- Sekar, K., Pack, A., 2019. Epidiolex as adjunct therapy for treatment of refractory epilepsy: a comprehensive review with a focus on adverse effects. *F1000Res* 8, 234. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16515.1>
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., Lovell-Badge, R., 2004. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental Biology* 274, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.011>
- Sekido, R., Lovell-Badge, R., 2013. Genetic Control of Testis Development. *Sex Dev* 7, 21–32. <https://doi.org/10.1159/000342221>
- Serrano, T., Chevrier, C., Multigner, L., Cordier, S., Jegou, B., 2013. International geographic correlation study of the prevalence of disorders of male reproductive health. *Human Reproduction* 28, 1974–1986. <https://doi.org/10.1093/humrep/det111>
- Sgambato, A., Cittadini, A., Faraglia, B., Weinstein, I.B., 2000. Multiple functions of p27Kip1 and its alterations in tumor cells: a review. *J. Cell. Physiol.* 183, 18–27. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200004\)183:1<18::AID-JCP3>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<18::AID-JCP3>3.0.CO;2-S)
- Shacham, S., Harris, D., Ben-Shlomo, H., Cohen, I., Bonfil, D., Przeddecki, F., Lewy, H., Ashkenazi, I.E., Seger, R., Naor, Z., 2001. Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs, in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 63–90. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(01\)63003-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(01)63003-6)
- Shalet, S.M., 2009. Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatr Blood Cancer* 53, 285–288. <https://doi.org/10.1002/pbc.22000>
- Shamloul, R., Bella, A.J., 2011. Impact of Cannabis Use on Male Sexual Health. *The Journal of Sexual Medicine* 8, 971–975. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.02198.x>
- Shapiro, E., Huang, H., Masch, R.J., McFADDEN, D.E., Wu, X.-R., Ostrer, H., 2005. IMMUNOLocalization of ANDROGEN RECEPTOR AND ESTROGEN RECEPTORS α AND β IN HUMAN FETAL TESTIS AND EPIDIDYMIS. *Journal of Urology* 174, 1695–1698. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000179540.28209.de>

- Sharma, R., Agarwal, A., 2013. Spermatogenesis: An Overview. pp. 127–160. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8459-2_8
- Sharma, S., Venzac, B., Burgers, T., Schlatt, S., Le Gac, S., 2022. Testis-on-chip platform to study ex vivo primate spermatogenesis and endocrine dynamics. *Organs-on-a-Chip* 4, 100023. <https://doi.org/10.1016/j.ooc.2022.100023>
- Sharpe, R., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J., 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 769–784. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769>
- Sharpe, R.M., 2006. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 20, 91–110. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.005>
- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 2003. Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: Advances in understanding and identification of areas for future research. *Pure and Applied Chemistry* 75, 2023–2038. <https://doi.org/10.1351/pac200375112023>
- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 1993a. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet* 341, 1392–1396. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90953-E](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90953-E)
- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 1993b. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet* 341, 1392–1396. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90953-E](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90953-E)
- Shaw, G., Renfree, M.B., 2014. Wolffian Duct Development. *Sex Dev* 8, 273–280. <https://doi.org/10.1159/000363432>
- Sheikine, Y., Genega, E., Melamed, J., Lee, P., Reuter, V.E., Ye, H., 2012. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *Am J Cancer Res* 2, 153–167.
- Shi, Y., Zhu, B., Liang, D., 2021. The associations between prenatal cannabis use disorder and neonatal outcomes. *Addiction* 116, 3069–3079. <https://doi.org/10.1111/add.15467>
- Shima, Y., 2019. Development of fetal and adult Leydig cells. *Reprod Med Biol* 18, 323–330. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12287>
- Shima, Y., Matsuzaki, S., Miyabayashi, K., Otake, H., Baba, T., Kato, S., Huhtaniemi, I., Morohashi, K., 2015. Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis. *Molecular Endocrinology* 29, 1581–1593. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1200>
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Haraguchi, S., Arakawa, T., Otake, H., Baba, T., Matsuzaki, S., Shishido, Y., Akiyama, H., Tachibana, T., Tsutsui, K., Morohashi, K., 2013. Contribution of Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes. *Molecular Endocrinology* 27, 63–73. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1256>
- Shire, D., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Oustric, D., Pessègue, B., Bonnin-Cabanne, O., Le Fur, G., Caput, D., Ferrara, P., 1996. Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1307, 132–136. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(96\)00047-4](https://doi.org/10.1016/0167-4781(96)00047-4)
- Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Fur, G.L., Caput, D., Ferrara, P., 1995. An Amino-terminal Variant of the Central Cannabinoid Receptor Resulting from Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry* 270, 3726–3731. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.3726>

- Sholler, D.J., Schoene, L., Spindle, T.R., 2020. Therapeutic Efficacy of Cannabidiol (CBD): a Review of the Evidence From Clinical Trials and Human Laboratory Studies. *Curr Addict Rep* 7, 405–412. <https://doi.org/10.1007/s40429-020-00326-8>
- Shover, C.M., Yan, P., Jackson, N.J., Buhr, R.G., Fulcher, J.A., Tashkin, D.P., Barjaktarevic, I., 2022. Cannabis consumption is associated with lower COVID-19 severity among hospitalized patients: a retrospective cohort analysis. *J Cannabis Res* 4, 46. <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00152-x>
- Shuster, D.L., Bammler, T.K., Beyer, R.P., MacDonald, J.W., Tsai, J.M., Farin, F.M., Hebert, M.F., Thummel, K.E., Mao, Q., 2013. Gestational Age-Dependent Changes in Gene Expression of Metabolic Enzymes and Transporters in Pregnant Mice. *Drug Metab Dispos* 41, 332–342. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.049718>
- Sifakis, S., Androutsopoulos, V.P., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A., 2017. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 51, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>
- Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2010. Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol. BioSyst.* 6, 1411. <https://doi.org/10.1039/c000237b>
- Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2006. Endocannabinoid Biosynthesis Proceeding through Glycerophospho-N-acyl Ethanolamine and a Role for α/β -Hydrolase 4 in This Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 281, 26465–26472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604660200>
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.-M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240–244. <https://doi.org/10.1038/346240a0>
- Singh, B., Sharma, R.A., 2015. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech* 5, 129–151. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2>
- Singh, N., Gupta, M., Bhargava, K., 1981. Teratogenic Potential of Cannabis sativa in Albino Rats. *Planta Med* 43, 56–58. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971473>
- Singh, S.R., Burnicka-Turek, O., Chauhan, C., Hou, S.X., 2011. Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15, 468–483. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01242.x>
- Skakkebaek, N.E., Berthelsen, J.G., Giwercman, A., Müller, J., 1987. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 10, 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00161.x>
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Swan, S.H., Sapra, K.J., Ziebe, S., Priskorn, L., Juul, A., 2016a. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiological Reviews* 96, 55–97. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2015>
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Swan, S.H., Sapra, K.J., Ziebe, S., Priskorn, L., Juul, A., 2016b. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of

- Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev* 96, 55–97. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2015>
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Human Reproduction* 16, 972–978. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.972>
- Skakkebaek, Niels E., 1972. POSSIBLE CARCINOMA-IN-SITU OF THE TESTIS. *The Lancet* 300, 516–517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(72\)91909-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(72)91909-5)
- Skelton, K.R., Donahue, E., Benjamin-Neelon, S.E., 2022. Validity of self-report measures of cannabis use compared to biological samples among women of reproductive age: a scoping review. *BMC Pregnancy Childbirth* 22, 344. <https://doi.org/10.1186/s12884-022-04677-0>
- Skelton, K.R., Hecht, A.A., Benjamin-Neelon, S.E., 2021. Association of Recreational Cannabis Legalization With Maternal Cannabis Use in the Preconception, Prenatal, and Postpartum Periods. *JAMA Netw Open* 4, e210138. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.0138>
- Skelton, K.R., Hecht, A.A., Benjamin-Neelon, S.E., 2020. Recreational Cannabis Legalization in the US and Maternal Use during the Preconception, Prenatal, and Postpartum Periods. *IJERPH* 17, 909. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030909>
- Skinner, M.K., Fritz, I.B., 1985. Structural characterization of proteoglycans produced by testicular peritubular cells and Sertoli cells. *Journal of Biological Chemistry* 260, 11874–11883. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39112-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39112-3)
- Skinner, M.K., Tung, P.S., Fritz, I.B., 1985. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *The Journal of Cell Biology* 100, 1941–1947. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.6.1941>
- Skopp, G., Potsch, L., 2008. Cannabinoid Concentrations in Spot Serum Samples 24–48 Hours After Discontinuation of Cannabis Smoking. *Journal of Analytical Toxicology* 32, 160–164. <https://doi.org/10.1093/jat/32.2.160>
- Small, E., 2015. Evolution and Classification of Cannabis sativa (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *Bot. Rev.* 81, 189–294. <https://doi.org/10.1007/s12229-015-9157-3>
- Small, E., Beckstead, H.D., 1973. Cannabinoid Phenotypes in Cannabis sativa. *Nature* 245, 147–148. <https://doi.org/10.1038/245147a0>
- Small, E., Cronquist, A., 1976. A PRACTICAL AND NATURAL TAXONOMY FOR CANNABIS. *TAXON* 25, 405–435. <https://doi.org/10.2307/1220524>
- Small, E., Jui, P.Y., Lefkovich, L.P., 1976. A Numerical Taxonomic Analysis of Cannabis with Special Reference to Species Delimitation. *Systematic Botany* 1, 67. <https://doi.org/10.2307/2418840>
- Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D., Davis, J.B., 2000. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1): Special report. *British Journal of Pharmacology* 129, 227–230. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703050>
- Smart, R., Pacula, R.L., 2019. Early evidence of the impact of cannabis legalization on cannabis use, cannabis use disorder, and the use of other substances: Findings from state policy evaluations. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse* 45, 644–663. <https://doi.org/10.1080/00952990.2019.1669626>

- Smith, A.M.A., Ferris, J.A., Simpson, J.M., Shelley, J., Pitts, M.K., Richters, J., 2010. Cannabis Use and Sexual Health. *The Journal of Sexual Medicine* 7, 787–793. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01453.x>
- Smith, B.E., Braun, R.E., 2012. Germ Cell Migration Across Sertoli Cell Tight Junctions. *Science* 338, 798–802. <https://doi.org/10.1126/science.1219969>
- Smith, L.B., Walker, W.H., 2014. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 30, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>
- Smith, T.H., Blume, L.C., Straiker, A., Cox, J.O., David, B.G., McVoy, J.R.S., Sayers, K.W., Poklis, J.L., Abdullah, R.A., Egertová, M., Chen, C.-K., Mackie, K., Elphick, M.R., Howlett, A.C., Selley, D.E., 2015. Cannabinoid Receptor–Interacting Protein 1a Modulates CB₁ Receptor Signaling and Regulation. *Mol Pharmacol* 87, 747–765. <https://doi.org/10.1124/mol.114.096495>
- Smith, Z.L., Werntz, R.P., Eggener, S.E., 2018. Testicular Cancer. *Medical Clinics of North America* 102, 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.10.003>
- Snider, N.T., Walker, V.J., Hollenberg, P.F., 2010. Oxidation of the Endogenous Cannabinoid Arachidonoyl Ethanolamide by the Cytochrome P450 Monooxygenases: Physiological and Pharmacological Implications. *Pharmacol Rev* 62, 136–154. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001081>
- Soethoudt, M., Grether, U., Fingerle, J., Grim, T.W., Fezza, F., de Petrocellis, L., Ullmer, C., Rothenhäusler, B., Perret, C., van Gils, N., Finlay, D., MacDonald, C., Chicca, A., Gens, M.D., Stuart, J., de Vries, H., Mastrangelo, N., Xia, L., Alachouzos, G., Baggelaar, M.P., Martella, A., Mock, E.D., Deng, H., Heitman, L.H., Connor, M., Di Marzo, V., Gertsch, J., Lichtman, A.H., Maccarrone, M., Pacher, P., Glass, M., van der Stelt, M., 2017. Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nat Commun* 8, 13958. <https://doi.org/10.1038/ncomms13958>
- Solowij, N., Broyd, S., Greenwood, L., van Hell, H., Martelozzo, D., Rueb, K., Todd, J., Liu, Z., Galettis, P., Martin, J., Murray, R., Jones, A., Michie, P.T., Croft, R., 2019. A randomised controlled trial of vaporised Δ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol alone and in combination in frequent and infrequent cannabis users: acute intoxication effects. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 269, 17–35. <https://doi.org/10.1007/s00406-019-00978-2>
- Solowij, N., Broyd, S.J., Beale, C., Prick, J.-A., Greenwood, L., van Hell, H., Suo, C., Galettis, P., Pai, N., Fu, S., Croft, R.J., Martin, J.H., Yücel, M., 2018. Therapeutic Effects of Prolonged Cannabidiol Treatment on Psychological Symptoms and Cognitive Function in Regular Cannabis Users: A Pragmatic Open-Label Clinical Trial. *Cannabis and Cannabinoid Research* 3, 21–34. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0043>
- Solowij, N., Broyd, S.J., van Hell, H.H., Hazekamp, A., 2014. A protocol for the delivery of cannabidiol (CBD) and combined CBD and Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) by vaporisation. *BMC Pharmacol Toxicol* 15, 58. <https://doi.org/10.1186/2050-6511-15-58>
- Sommano, S.R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., Jantrawut, P., 2020. The Cannabis Terpenes. *Molecules* 25, 5792. <https://doi.org/10.3390/molecules25245792>
- Song, A., Myung, N.K., Bogumil, D., Ihenacho, U., Burg, M.L., Cortessis, V.K., 2020a. Incident testicular cancer in relation to using marijuana and smoking tobacco: A systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Urologic Oncology: Seminars and*

- Original Investigations 38, 642.e1-642.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.03.013>
- Song, A., Myung, N.K., Bogumil, D., Ihenacho, U., Burg, M.L., Cortessis, V.K., 2020b. Incident testicular cancer in relation to using marijuana and smoking tobacco: A systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Urol Oncol* 38, 642.e1-642.e9. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.03.013>
- Sonne, S.B., Almstrup, K., Dalgaard, M., Juncker, A.S., Edsgard, D., Ruban, L., Harrison, N.J., Schwager, C., Abdollahi, A., Huber, P.E., Brunak, S., Gjerdrum, L.M., Moore, H.D., Andrews, P.W., Skakkebaek, N.E., Meyts, E.R.-D., Leffers, H., 2009. Analysis of Gene Expression Profiles of Microdissected Cell Populations Indicates that Testicular Carcinoma *In situ* Is an Arrested Gonocyte. *Cancer Research* 69, 5241–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4554>
- Souquet, B., Tourpin, S., Messiaen, S., Moison, D., Habert, R., Livera, G., 2012. Nodal Signaling Regulates the Entry into Meiosis in Fetal Germ Cells. *Endocrinology* 153, 2466–2473. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2056>
- Spilka, S., Le Nézet, O., Janssen, E., Brissot, A., Philippon, A., 2021. 20 ans d'évolutions des usages de drogues en Europe à l'adolescence.
- Spiller, C., Bowles, J., 2019. Sexually dimorphic germ cell identity in mammals, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 253–288. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.011>
- Spiller, C., Koopman, P., Bowles, J., 2017. Sex Determination in the Mammalian Germline. *Annu. Rev. Genet.* 51, 265–285. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035449>
- Spiller, C., Wilhelm, D., Koopman, P., 2009. Cell cycle analysis of fetal germ cells during sex differentiation in mice. *Biology of the Cell* 101, 587–598. <https://doi.org/10.1042/BC20090021>
- Spiller, C.M., Feng, C.-W., Jackson, A., Gillis, A.J.M., Rolland, A.D., Looijenga, L.H.J., Koopman, P., Bowles, J., 2012. Endogenous Nodal signaling regulates germ cell potency during mammalian testis development. *Development* 139, 4123–4132. <https://doi.org/10.1242/dev.083006>
- Spindle, T.R., Cone, E.J., Herrmann, E.S., Mitchell, J.M., Flegel, R., LoDico, C., Bigelow, G.E., Vandrey, R., 2020. Pharmacokinetics of Cannabis Brownies: A Controlled Examination of $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol and Metabolites in Blood and Oral Fluid of Healthy Adult Males and Females. *Journal of Analytical Toxicology* 44, 661–671. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa067>
- Spindle, T.R., Cone, E.J., Schlienz, N.J., Mitchell, J.M., Bigelow, G.E., Flegel, R., Hayes, E., Vandrey, R., 2019. Acute Pharmacokinetic Profile of Smoked and Vaporized Cannabis in Human Blood and Oral Fluid. *Journal of Analytical Toxicology* 43, 233–258. <https://doi.org/10.1093/jat/bky104>
- Spinnler, K., Kohn, F.M., Schwarzer, U., Mayerhofer, A., 2010. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Human Reproduction* 25, 2181–2187. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq170>
- Srinivasan, M., Hamouda, R.K., Ambedkar, B., Arzoun, H.I., Sahib, I., Fondeur, J., Escudero Mendez, L., Mohammed, L., 2021. The Effect of Marijuana on the Incidence and Evolution of Male Infertility: A Systematic Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.20119>

- Stanton, P.G., 2016. Regulation of the blood-testis barrier. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 59, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.018>
- Starowicz, K., Nigam, S., Di Marzo, V., 2007. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacology & Therapeutics* 114, 13–33. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.005>
- Stasiłowicz, A., Tomala, A., Podolak, I., Cielecka-Piontek, J., 2021. Cannabis sativa L. as a Natural Drug Meeting the Criteria of a Multitarget Approach to Treatment. *IJMS* 22, 778. <https://doi.org/10.3390/ijms22020778>
- Steger, R.W., Murphy, L.L., Bartke, A., Smith, M.S., 1990. Effects of psychoactive and nonpsychoactive cannabinoids on the hypothalamic-pituitary axis of the adult male rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 37, 299–302. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90338-I](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90338-I)
- Stévant, I., Kühne, F., Greenfield, A., Chaboissier, M.-C., Dermitzakis, E.T., Nef, S., 2019. Dissecting Cell Lineage Specification and Sex Fate Determination in Gonadal Somatic Cells Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Reports* 26, 3272–3283.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.069>
- Stévant, I., Nef, S., 2019. Genetic Control of Gonadal Sex Determination and Development. *Trends in Genetics* 35, 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.02.004>
- Stevens, L.C., 1973. A New Inbred Subline of Mice (129/terSv) with a High Incidence of Spontaneous Congenital Testicular Teratomas2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 50, 235–242. <https://doi.org/10.1093/jnci/50.1.235>
- Stevens, L.C., Hummel, K.P., 1957. A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice. *J Natl Cancer Inst* 18, 719–747.
- Stevens, L.C., Little, C.C., 1954. Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 40, 1080–1087. <https://doi.org/10.1073/pnas.40.11.1080>
- Stinchcomb, A.L., Valiveti, S., Hammell, D.C., Ramsey, D.R., 2010. Human skin permeation of Δ 8-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56, 291–297. <https://doi.org/10.1211/0022357022791>
- Stott, C.G., White, L., Wright, S., Wilbraham, D., Guy, G.W., 2013. A phase I study to assess the effect of food on the single dose bioavailability of the THC/CBD oromucosal spray. *Eur J Clin Pharmacol* 69, 825–834. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1393-4>
- Sturrock, S., Williams, E., Ambulkar, H., Dassios, T., Greenough, A., 2020. Maternal smoking and cannabis use during pregnancy and infant outcomes. *Journal of Perinatal Medicine* 48, 168–172. <https://doi.org/10.1515/jpm-2019-0422>
- Succu, S., Mascia, M.S., Sanna, F., Melis, T., Argiolas, A., Melis, M.R., 2006. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716A induces penile erection by increasing extracellular glutamic acid in the paraventricular nucleus of male rats. *Behavioural Brain Research* 169, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.017>
- Sugiura, T., Kobayashi, Y., Oka, S., Waku, K., 2002. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 66, 173–192. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0356>
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215, 89–97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>

- Sullivan, R., Légaré, C., Lamontagne-Proulx, J., Breton, S., Soulet, D., 2019. Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology* andr.12633. <https://doi.org/10.1111/andr.12633>
- Sun, A.J., Eisenberg, M.L., 2017. Association Between Marijuana Use and Sexual Frequency in the United States: A Population-Based Study. *The Journal of Sexual Medicine* 14, 1342–1347. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2017.09.005>
- Sun, X., Dey, S.K., 2012. Endocannabinoid Signaling in Female Reproduction. *ACS Chem. Neurosci.* 3, 349–355. <https://doi.org/10.1021/cn300014e>
- Sun, X., Xie, H., Yang, J., Wang, H., Bradshaw, H.B., Dey, S.K., 2010. Endocannabinoid signaling directs differentiation of trophoblast cell lineages and placentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16887–16892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010892107>
- Sun, Y., Bennett, A., 2007. Cannabinoids: A New Group of Agonists of PPARs. *PPAR Research* 2007, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2007/23513>
- Sun, Y.-X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., Ueda, N., 2004. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J* 380, 749–756. <https://doi.org/10.1042/BJ20040031>
- Suzuki, A., Saga, Y., 2008. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev.* 22, 430–435. <https://doi.org/10.1101/gad.1612708>
- Suzuki, H., Sada, A., Yoshida, S., Saga, Y., 2009. The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. *Developmental Biology* 336, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.002>
- Suzuki, H., Tsuda, M., Kiso, M., Saga, Y., 2008. Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. *Developmental Biology* 318, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.020>
- Svechnikov, K., Landreh, L., Weisser, J., Izzo, G., Colón, E., Svechnikova, I., Söder, O., 2010. Origin, Development and Regulation of Human Leydig Cells. *Horm Res Paediatr* 73, 93–101. <https://doi.org/10.1159/000277141>
- Svingen, T., Koopman, P., 2013. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 27, 2409–2426. <https://doi.org/10.1101/gad.228080.113>
- Swamy, G.K., Reddick, K.L.B., Brouwer, R.J.N., Pollak, K.I., Myers, E.R., 2011. Smoking prevalence in early pregnancy: comparison of self-report and anonymous urine cotinine testing. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 24, 86–90. <https://doi.org/10.3109/14767051003758887>
- Sweeney, M.F., Hasan, N., Soto, A.M., Sonnenschein, C., 2015. Environmental endocrine disruptors: Effects on the human male reproductive system. *Rev Endocr Metab Disord* 16, 341–357. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9337-4>
- Swortwood, M.J., Newmeyer, M.N., Andersson, M., Abulseoud, O.A., Scheidweiler, K.B., Huestis, M.A., 2017. Cannabinoid disposition in oral fluid after controlled smoked, vaporized, and oral cannabis administration: Oral fluid cannabinoids after three routes of cannabis administration. *Drug Test. Analysis* 9, 905–915. <https://doi.org/10.1002/dta.2092>
- Takagi, S., Takao, Y., Katsuo, T., Haruhiko, O., Fujii, T.K., Yoji, N., Masao, S., 1977. Sex differences in fetal gonadotropins and androgens. *Journal of Steroid Biochemistry* 8, 609–620. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(77\)90270-9](https://doi.org/10.1016/0022-4731(77)90270-9)

- Tanney, C.A.S., Backer, R., Geitmann, A., Smith, D.L., 2021. Cannabis Glandular Trichomes: A Cellular Metabolite Factory. *Front. Plant Sci.* 12, 721986. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721986>
- Tapanainen, J., Kellokumpu-Lehtinen, P., Pelliniemi, L., Huhtaniemi, I., 1981. Age-Related Changes in Endogenous Steroids of Human Fetal Testis during Early and Midpregnancy*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 52, 98–102. <https://doi.org/10.1210/jcem-52-1-98>
- Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I., Rubino, T., Martini, L., Swiercz, J., Mackie, K., Monyer, H., Parolaro, D., Whistler, J., Kuner, T., Kuner, R., 2007. A Molecular Basis of Analgesic Tolerance to Cannabinoids. *Journal of Neuroscience* 27, 4165–4177. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5648-06.2007>
- Tart, C.T., 1970. Marijuana Intoxication: Common Experiences. *Nature* 226, 701–704. <https://doi.org/10.1038/226701a0>
- Tartarin, P., Moison, D., Guibert, E., Dupont, J., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., Frydman, N., Pozzi, S., Frydman, R., Lecureuil, C., Froment, P., 2012. Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum Reprod* 27, 3304–3314. <https://doi.org/10.1093/humrep/des264>
- Tarulli, G.A., Stanton, P.G., Meachem, S.J., 2012. Is the Adult Sertoli Cell Terminally Differentiated?1. *Biology of Reproduction* 87. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095091>
- Tashkin, D.P., Reiss, S., Shapiro, B.J., Calvarese, B., Olsen, J.L., Lodge, J.W., 1977. Bronchial effects of aerosolized delta 9-tetrahydrocannabinol in healthy and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 115, 57–65. <https://doi.org/10.1164/arrd.1977.115.1.57>
- Taylor, A.H., Amoako, A.A., Bambang, K., Karasu, T., Gebeh, A., Lam, P.M.W., Marzcylo, T.H., Konje, J.C., 2010. Endocannabinoids and pregnancy. *Clinica Chimica Acta* 411, 921–930. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.03.012>
- Taylor, A.H., Finney, M., Lam, P.M., Konje, J.C., 2011. Modulation of the endocannabinoid system in viable and non-viable first trimester pregnancies by pregnancy-related hormones. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 152. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-152>
- Taylor, L., Gidal, B., Blakey, G., Tayo, B., Morrison, G., 2018. A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects. *CNS Drugs* 32, 1053–1067. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0578-5>
- Teletin, M., Vernet, N., Yu, J., Klopfenstein, M., Jones, J.W., Féret, B., Kane, M.A., Ghyselinck, N.B., Mark, M., 2018. Two functionally redundant sources of retinoic acid secure spermatogonia differentiation in the seminiferous epithelium. *Development* dev.170225. <https://doi.org/10.1242/dev.170225>
- Teshima, S., Shimosato, Y., Hirohashi, S., Tome, Y., Hayashi, I., Kanazawa, H., Kakizoe, T., 1988. Four new human germ cell tumor cell lines. *Lab Invest* 59, 328–336.
- Thackare, H., Nicholson, H.D., Whittington, K., 2006. Oxytocin—its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Human Reproduction Update* 12, 437–448. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmk002>
- Tharmalingam, M.D., Jorgensen, A., Mitchell, R.T., 2018. Experimental models of testicular development and function using human tissue and cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 468, 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.12.011>

- Thistle, J. E., Graubard, B.I., Braunlin, M., Vesper, H., Trabert, B., Cook, M.B., McGlynn, K.A., 2017. Marijuana use and serum testosterone concentrations among U.S. males. *Andrology* 5, 732–738. <https://doi.org/10.1111/andr.12358>
- Thistle, Jack E., Graubard, B.I., Braunlin, M., Vesper, H., Trabert, B., Cook, M.B., McGlynn, K.A., 2017. Marijuana use and serum testosterone concentrations among U.S. males. *Andrology* 5, 732–738.
- Thompson, G.R., Mason, M.M., Rosenkrantz, H., Braude, M.C., 1973. Chronic oral toxicity of cannabinoids in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 25, 373–390. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(73\)90311-6](https://doi.org/10.1016/0041-008X(73)90311-6)
- Thompson, R., DeJong, K., Lo, J., 2019. Marijuana Use in Pregnancy: A Review. *Obstetrical & Gynecological Survey* 74, 415–428. <https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000000685>
- Thorup, J., McLachlan, R., Cortes, D., Nation, T.R., Balic, A., Southwell, B.R., Hutson, J.M., 2010. What is new in cryptorchidism and hypospadias—a critical review on the testicular dysgenesis hypothesis. *Journal of Pediatric Surgery* 45, 2074–2086. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2010.07.030>
- Tilak, S.K., Zimmerman, A.M., 1984. Effects of Cannabinoids on Spermatogenesis in Mice : In Vivo and In Vitro Studies, in: *The Cannabinoids: Chemical, Pharmacologic, and Therapeutic Aspects*. pp. 427–439.
- Tilmann, C., Capel, B., 1999. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development* 126, 2883–2890. <https://doi.org/10.1242/dev.126.13.2883>
- Titi-Lartey, O.A., Khan, Y.S., 2022. Embryology, Testicle, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Tiwana, M.S., Leslie, S.W., 2022. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Testicle, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Toennes, S.W., Ramaekers, J.G., Theunissen, E.L., Moeller, M.R., Kauert, G.F., 2008. Comparison of Cannabinoid Pharmacokinetic Properties in Occasional and Heavy Users Smoking a Marijuana or Placebo Joint. *Journal of Analytical Toxicology* 32, 470–477. <https://doi.org/10.1093/jat/32.7.470>
- Tong, S., Ngian, G.-L., Onwude, J.L., Permezel, M., Saglam, B., Hay, S., Konje, J.C., Marczylo, T.H., Fleming, G., Walker, S.P., Lappas, M., 2012. Diagnostic Accuracy of Maternal Serum Macrophage Inhibitory Cytokine-1 and Pregnancy-Associated Plasma Protein-A at 6–10 Weeks of Gestation to Predict Miscarriage: *Obstetrics & Gynecology* 119, 1000–1008. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3182518fd3>
- Tontonoz, P., Spiegelman, B.M., 2008. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289–312. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829>
- Toppari, J., 2001. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Human Reproduction Update* 7, 282–286. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.3.282>
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jégou, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkebaek, N.E., 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4, 741–803. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s4741>
- Toppari, J., Virtanen, H.E., Main, K.M., Skakkebaek, N.E., 2010. Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): *Environmental*

- connection: Cryptorchidism and Hypospadias. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 88, 910–919. <https://doi.org/10.1002/bdra.20707>
- Topping, T., Griswold, M.D., 2022. Global Deletion of ALDH1A1 and ALDH1A2 Genes Does Not Affect Viability but Blocks Spermatogenesis. *Front. Endocrinol.* 13, 871225. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.871225>
- Torella, M., Bellini, G., Punzo, F., Argenziano, M., Schiattarella, A., Labriola, D., Schettino, M.T., Ambrosio, D., Ammataro, F.P., De Franciscis, P., 2019. TNF- α effect on human delivery onset by CB1/TRPV1 crosstalk: new insights into endocannabinoid molecular signaling in preterm vs. term labor. Analysis of the EC/EV pathway and predictive biomarkers for early diagnosis of preterm delivery. *Minerva Ginecol* 71. <https://doi.org/10.23736/S0026-4784.19.04405-8>
- Tóth, A., Blumberg, P.M., Boczán, J., 2009. Chapter 15 Anandamide and the Vanilloid Receptor (TRPV1), in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 389–419. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(09\)81015-7](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(09)81015-7)
- Tourne, M., Radulescu, C., Allory, Y., 2019. Tumeurs germinales du testicule : caractéristiques histopathologiques et moléculaires. *Bulletin du Cancer* 106, 328–341. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2019.02.004>
- Trabert, B., Chen, J., Devesa, S.S., Bray, F., McGlynn, K.A., 2015. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology* 3, 4–12. <https://doi.org/10.1111/andr.293>
- Trabert, B., Sigurdson, A.J., Sweeney, A.M., Strom, S.S., McGlynn, K.A., 2011. Marijuana use and testicular germ cell tumors. *Cancer* 117, 848–853. <https://doi.org/10.1002/cncr.25499>
- Trabucco, E., Acone, G., Marenga, A., Pierantoni, R., Cacciola, G., Chioccarelli, T., Mackie, K., Fasano, S., Colacurci, N., Meccariello, R., Cobellis, G., Cobellis, L., 2009. Endocannabinoid System in First Trimester Placenta: Low FAAH and High CB1 Expression Characterize Spontaneous Miscarriage. *Placenta* 30, 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.03.015>
- Trautmann, E., Guerquin, M.-J., Duquenne, C., Lahaye, J.-B., Habert, R., Livera, G., 2008. Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. *Cell Cycle* 7, 656–664. <https://doi.org/10.4161/cc.7.5.5482>
- Tremblay, J.J., 2015. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* 103, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.08.001>
- Troisi, R., Potischman, N., Roberts, J.M., Harger, G., Markovic, N., Cole, B., Lykins, D., Siiteri, P., Hoover, R.N., 2003. Correlation of serum hormone concentrations in maternal and umbilical cord samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 452–456.
- Tsuboi, K., Ikematsu, N., Uyama, T., Deutsch, D.G., Tokumura, A., Ueda, N., 2013. Biosynthetic pathways of bioactive N-acylethanolamines in brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12, 7–16. <https://doi.org/10.2174/1871527311312010005>
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., Saga, Y., 2003. Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. *Science* 301, 1239–1241. <https://doi.org/10.1126/science.1085222>
- Turner, C.E., Elsohly, M.A., Boeren, E.G., 1980. Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A Review of the Natural Constituents. *J. Nat. Prod.* 43, 169–234. <https://doi.org/10.1021/np50008a001>

- Tyagi, V., Scordo, M., Yoon, R.S., Liporace, F.A., Greene, L.W., 2017. Revisiting the role of testosterone: Are we missing something? *Rev Urol* 19, 16–24. <https://doi.org/10.3909/riu0716>
- Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., 2013. Metabolism of endocannabinoids and related *N*-acylethanolamines: Canonical and alternative pathways. *FEBS J* 280, 1874–1894. <https://doi.org/10.1111/febs.12152>
- Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., Ohnishi, T., 2011. Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *BioFactors* 37, 1–7. <https://doi.org/10.1002/biof.131>
- UK Testicular Cancer Collaboration, The PRACTICAL Consortium, Litchfield, K., Levy, M., Orlando, G., Loveday, C., Law, P.J., Migliorini, G., Holroyd, A., Broderick, P., Karlsson, R., Haugen, T.B., Kristiansen, W., Nsengimana, J., Fenwick, K., Assiotis, I., Kote-Jarai, Zs., Dunning, A.M., Muir, K., Peto, J., Eeles, R., Easton, D.F., Dudakia, D., Orr, N., Pashayan, N., Bishop, D.T., Reid, A., Huddart, R.A., Shipley, J., Grotmol, T., Wiklund, F., Houlston, R.S., Turnbull, C., 2017. Identification of 19 new risk loci and potential regulatory mechanisms influencing susceptibility to testicular germ cell tumor. *Nat Genet* 49, 1133–1140. <https://doi.org/10.1038/ng.3896>
- United Nations Office on Drugs and Crime, 2022. WORLD DRUG REPORT 2022. UNITED NATIONS, S.I.
- UNODC, U.N. publication, 2022. World Drug Report 2022. Austria.
- Urquhart, P., Nicolaou, A., Woodward, D.F., 2015. Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.015>
- US FDA Report, 2018. Center for Drug Evaluation and Research (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210365Orig1s000PharmR.pdf).
- Valiveti, S., Hammell, D.C., Earles, D.C., Stinchcomb, A.L., 2004. In vitro/in vivo correlation studies for transdermal Δ^8 -THC development. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93, 1154–1164. <https://doi.org/10.1002/jps.20036>
- van Breemen, R.B., Muchiri, R.N., Bates, T.A., Weinstein, J.B., Leier, H.C., Farley, S., Tafesse, F.G., 2022. Cannabinoids Block Cellular Entry of SARS-CoV-2 and the Emerging Variants. *J. Nat. Prod.* 85, 176–184. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00946>
- van de Donk, T., Niesters, M., Kowal, M.A., Olofsen, E., Dahan, A., van Velzen, M., 2019a. An experimental randomized study on the analgesic effects of pharmaceutical-grade cannabis in chronic pain patients with fibromyalgia. *Pain* 160, 860–869. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001464>
- van de Donk, T., Niesters, M., Kowal, M.A., Olofsen, E., Dahan, A., van Velzen, M., 2019b. An experimental randomized study on the analgesic effects of pharmaceutical-grade cannabis in chronic pain patients with fibromyalgia. *Pain* 160, 860–869. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001464>
- van den Driesche, S., Kilcoyne, K.R., Wagner, I., Rebourcet, D., Boyle, A., Mitchell, R., McKinnell, C., Macpherson, S., Donat, R., Shukla, C.J., Jorgensen, A., Meyts, E.R.-D., Skakkebaek, N.E., Sharpe, R.M., 2017. Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. *JCI Insight* 2. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91204>

- van den Driesche, S., Macdonald, J., Anderson, R.A., Johnston, Z.C., Chetty, T., Smith, L.B., Mckinnell, C., Dean, A., Homer, N.Z., Jorgensen, A., Camacho-Moll, M.-E., Sharpe, R.M., Mitchell, R.T., 2015. Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model. *Sci Transl Med* 7, 288ra80. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4097>
- van der Schoot, P., Elger, W., 1992. Androgen-induced prevention of the outgrowth of cranial gonadal suspensory ligaments in fetal rats. *J Androl* 13, 534–542.
- van der Stelt, M., Noordermeer, M.A., Kiss, T., van Zadelhoff, G., Merghart, B., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., 2000. Formation of a new class of oxylipins from N-acyl(ethanol)amines by the lipoxygenase pathway: New oxylipins from NAEs by lipoxygenase pathway. *European Journal of Biochemistry* 267, 2000–2007. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01203.x>
- van der Stelt, M., Trevisani, M., Vellani, V., De Petrocellis, L., Schiano Moriello, A., Campi, B., McNaughton, P., Geppetti, P., Di Marzo, V., 2005. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca²⁺ influx via TRPV1 channels. *EMBO J* 24, 3517–3518. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600839>
- van Gelder, M.M.H.J., Donders, A.R.T., Devine, O., Roeleveld, N., Reefhuis, J., National Birth Defects Prevention Study, 2014. Using Bayesian Models to Assess the Effects of Under-reporting of Cannabis Use on the Association with Birth Defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2005: Assessing effects of exposure misclassification. *Paediatr Perinat Epidemiol* 28, 424–433. <https://doi.org/10.1111/ppe.12140>
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D., Sharkey, K.A., 2005. Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB₂ Receptors. *Science* 310, 329–332. <https://doi.org/10.1126/science.1115740>
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Myers, J.P., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., 2013. Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. *Reproductive Toxicology* 38, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.02.002>
- Vandrey, R., Herrmann, E.S., Mitchell, J.M., Bigelow, G.E., Flegel, R., LoDico, C., Cone, E.J., 2017. Pharmacokinetic Profile of Oral Cannabis in Humans: Blood and Oral Fluid Disposition and Relation to Pharmacodynamic Outcomes. *Journal of Analytical Toxicology* 41, 83–99. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx012>
- Vanstone, M., Panday, J., Popoola, A., Taneja, S., Greyson, D., McDonald, S.D., Pack, R., Black, M., Murray-Davis, B., Darling, E., 2022. Pregnant People’s Perspectives On Cannabis Use During Pregnancy: A Systematic Review and Integrative Mixed-Methods Research Synthesis. *J Midwife Womens Health* jmwh.13363. <https://doi.org/10.1111/jmwh.13363>
- Vanstone, M., Taneja, S., Popoola, A., Panday, J., Greyson, D., Lennox, R., McDonald, S.D., 2021. Reasons for cannabis use during pregnancy and lactation: a qualitative study. *CMAJ* 193, E1906–E1914. <https://doi.org/10.1503/cmaj.211236>
- Vardaris, R.M., Weisz, D.J., Fazel, A., Rawitch, A.B., 1976. Chronic administration of delta-9-tetrahydrocannabinol to pregnant rats: Studies of pup behavior and placental transfer. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 4, 249–254. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(76\)90236-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(76)90236-7)

- Varner, M.W., Silver, R.M., Rowland Hogue, C.J., Willinger, M., Parker, C.B., Thorsten, V.R., Goldenberg, R.L., Saade, G.R., Dudley, D.J., Coustan, D., Stoll, B., Bukowski, R., Koch, M.A., Conway, D., Pinar, H., Reddy, U.M., 2014. Association Between Stillbirth and Illicit Drug Use and Smoking During Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology* 123, 113–125. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000052>
- Varvel, S.A., Wiley, J.L., Yang, R., Bridgen, D.T., Long, K., Lichtman, A.H., Martin, B.R., 2006. Interactions between THC and cannabidiol in mouse models of cannabinoid activity. *Psychopharmacology* 186, 226–234. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0356-9>
- Venkatachalam, K., Montell, C., 2007. TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Vergouwen, R.P.F.A., Jacobs, S.G.P.M., Huiskamp, R., Davids, J.A.G., de Rooij, D.G., 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Reproduction* 93, 233–243. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0930233>
- Verhaeghe, F., Di Pizio, P., Bichara, C., Berby, B., Rives, A., Jumeau, F., Sétif, V., Sibert, L., Rondanino, C., Rives, N., 2020. Cannabis consumption might exert deleterious effects on sperm nuclear quality in infertile men. *Reproductive BioMedicine Online* 40, 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.11.002>
- Vermersch, P., 2011. Sativex[®] (tetrahydrocannabinol + cannabidiol), an endocannabinoid system modulator: basic features and main clinical data. *Expert Review of Neurotherapeutics* 11, 15–19. <https://doi.org/10.1586/ern.11.27>
- Vermeulen, R., Schymanski, E.L., Barabási, A.-L., Miller, G.W., 2020. The exposome and health: Where chemistry meets biology. *Science* 367, 392–396. <https://doi.org/10.1126/science.aay3164>
- Vernet, N., Condrea, D., Mayere, C., Féret, B., Klopfenstein, M., Magnant, W., Alunni, V., Teletin, M., Souali-Crespo, S., Nef, S., Mark, M., Ghyselinck, N.B., 2020. Meiosis occurs normally in the fetal ovary of mice lacking all retinoic acid receptors. *Sci. Adv.* 6, eaaz1139. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1139>
- Vernet, N., Dennefeld, C., Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Chambon, P., Ghyselinck, N.B., Mark, M., 2006. Retinoic Acid Metabolism and Signaling Pathways in the Adult and Developing Mouse Testis. *Endocrinology* 147, 96–110. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0953>
- Vescovi, P.P., Pedrazzoni, M., Michelini, M., Maninetti, L., Bernardelli, F., Passeri, M., 1992a. Chronic effects of marijuana smoking on luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin levels in human males. *Drug and Alcohol Dependence* 30, 59–63. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(92\)90036-C](https://doi.org/10.1016/0376-8716(92)90036-C)
- Vescovi, P.P., Pedrazzoni, M., Michelini, M., Maninetti, L., Bernardelli, F., Passeri, M., 1992b. Chronic effects of marijuana smoking on luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin levels in human males. *Drug Alcohol Depend* 30, 59–63. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(92\)90036-C](https://doi.org/10.1016/0376-8716(92)90036-C)
- Virtanen, H.E., Bjerknes, R., Cortes, D., Jørgensen, N., Rajpert-De Meyts, E., Thorsson, A.V., Thorup, J., Main, K.M., 2007. Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatrica* 96, 611–616. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00241.x>
- Virtanen, H.E., Toppari, J., 2015. Cryptorchidism and Fertility. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 44, 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2015.07.013>

- Virtanen, H.E., Toppari, J., 2008. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Human Reproduction Update* 14, 49–58. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm027>
- Vogl, A.W., Vaid, K.S., Guttman, J.A., 2008. The Sertoli Cell Cytoskeleton, in: Cheng, C.Y. (Ed.), *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, NY, pp. 186–211. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_11
- Volkow, N.D., Han, B., Compton, W.M., McCance-Katz, E.F., 2019. Self-reported Medical and Nonmedical Cannabis Use Among Pregnant Women in the United States. *JAMA* 322, 167. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.7982>
- von Eyben, F.E., Parraga-Alava, J., 2020a. Meta-Analysis of Gene Expressions in Testicular Germ Cell Tumor Histologies. *IJMS* 21, 4487. <https://doi.org/10.3390/ijms21124487>
- von Eyben, F.E., Parraga-Alava, J., 2020b. Meta-Analysis of Gene Expressions in Testicular Germ Cell Tumor Histologies. *Int J Mol Sci* 21, 4487. <https://doi.org/10.3390/ijms21124487>
- Voutilainen, R., 1992. Differentiation of the Fetal Gonad. *Horm Res* 38, 66–71. <https://doi.org/10.1159/000182601>
- Vyhlidal, C.A., Pearce, R.E., Gaedigk, R., Calamia, J.C., Shuster, D.L., Thummel, K.E., Leeder, J.S., 2015. Variability in Expression of CYP3A5 in Human Fetal Liver. *Drug Metab Dispos* 43, 1286–1293. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.064998>
- Wade, D.T., Robson, P., House, H., Makela, P., Aram, J., 2003. A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clin Rehabil* 17, 21–29. <https://doi.org/10.1191/0269215503cr5810a>
- Wager-Miller, J., Westenbroek, R., Mackie, K., 2002. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chemistry and Physics of Lipids* 121, 83–89. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00151-2](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00151-2)
- Wagner, H., 2004. Natural products chemistry and phytomedicine research in the new millennium: new developments and challenges. *Arkivoc* 2004, 277–284. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0005.722>
- Walker, W.H., 2011. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis* 1, 116–120. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16956>
- Walker, W.H., Cheng, J., 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130, 15–28. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00358>
- Wall, M.E., Sadler, B.M., Brine, D., Taylor, H., Perez-Reyes, M., 1983. Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther* 34, 352–363. <https://doi.org/10.1038/clpt.1983.179>
- Wallace, E.M., Riley, S.C., Crossley, J.A., Ritoe, S.C., Horne, A., Shade, M., Ellis, P.M., Aitken, D.A., Groome, N.P., 1997. Dimeric Inhibins in Amniotic Fluid, Maternal Serum, and Fetal Serum in Human Pregnancy ¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82, 218–222. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.1.3685>
- Walt, H., Oosterhuis, J.W., Stevens, L.C., 1993. Experimental testicular germ cell tumorigenesis in mouse strains with and without spontaneous tumours differs from development of germ cell tumours of the adult human testis. *Int J Androl* 16, 267–271. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01190.x>
- Wang, Haibin, Dey, S.K., Maccarrone, M., 2006. Jekyll and Hyde: Two Faces of Cannabinoid Signaling in Male and Female Fertility. *Endocrine Reviews* 27, 427–448. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0006>

- Wang, H., Guo, Y., Wang, D., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., Das, S.K., DuBois, R.N., Dey, S.K., 2004. Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nat Med* 10, 1074–1080. <https://doi.org/10.1038/nm1104>
- Wang, H., Huirong, X., Guo, Y., Zhang, H., Takahashi, T., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., Das, S.K., Cravatt, B.F., Dey, S.K., 2006. Fatty acid amide hydrolase deficiency limits early pregnancy events. *Journal of Clinical Investigation* 116, 2122–2131. <https://doi.org/10.1172/JCI28621>
- Wang, H., Xie, H., Dey, S.K., 2008. Loss of Cannabinoid Receptor CB1 Induces Preterm Birth. *PLoS ONE* 3, e3320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003320>
- Wang, H., Xie, H., Sun, X., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., Cravatt, B.F., Dey, S.K., 2007. Differential regulation of endocannabinoid synthesis and degradation in the uterus during embryo implantation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 83, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2006.09.009>
- Wang, R., Liu, X., Li, L., Yang, M., Yong, J., Zhai, F., Wen, L., Yan, L., Qiao, J., Tang, F., 2022. Dissecting human gonadal cell lineage specification and sex determination using a single-cell RNA-seq approach. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* S1672022922000389. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.04.002>
- Wang, R.-S., Yeh, S., Tzeng, C.-R., Chang, C., 2009. Androgen Receptor Roles in Spermatogenesis and Fertility: Lessons from Testicular Cell-Specific Androgen Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews* 30, 119–132. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0025>
- Ward, A., Holmes, B., 1985. Nabilone: A Preliminary Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use. *Drugs* 30, 127–144. <https://doi.org/10.2165/00003495-198530020-00002>
- Ward, R.M., Varner, M.W., 2019. Principles of Pharmacokinetics in the Pregnant Woman and Fetus. *Clinics in Perinatology* 46, 383–398. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2019.02.014>
- Warshak, C.R., Regan, J., Moore, B., Magner, K., Kritzer, S., Van Hook, J., 2015. Association between marijuana use and adverse obstetrical and neonatal outcomes. *J Perinatol* 35, 991–995. <https://doi.org/10.1038/jp.2015.120>
- Wartenberg, H., 1978. Human Testicular Development and the Role of the Mesonephros in the Origin of a Dual Sertoli Cell System*. *Andrologia* 10, 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1978.tb01306.x>
- Watanabe, K., Motoya, E., Matsuzawa, N., Funahashi, T., Kimura, T., Matsunaga, T., Arizono, K., Yamamoto, I., 2005. Marijuana extracts possess the effects like the endocrine disrupting chemicals. *Toxicology* 206, 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.08.005>
- Watanabe, K., Tanaka, T., Yamamoto, I., Yoshimura, H., 1988. Brain microsomal oxidation of Δ^8 - and Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157, 75–80. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80013-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80013-5)
- Watchel, S., M., E., S., R., J., A., Wit, H. de, 2002. Comparison of the subjective effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and marijuana in humans. *Psychopharmacology* 161, 331–339. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1033-2>
- Waters, B.L., Trainer, T.D., 1996. Development of the human fetal testis. *Pediatr Pathol Lab Med* 16, 9–23.
- Wei, B.Q., Mikkelsen, T.S., McKinney, M.K., Lander, E.S., Cravatt, B.F., 2006. A Second Fatty Acid Amide Hydrolase with Variable Distribution among Placental Mammals. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36569–36578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606646200>

- Weidner, I.S., Møller, H., Jensen, T.K., Skakkebaek, N.E., 1999. Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. *J Urol* 161, 1606–1609.
- Weinsheimer, R.L., Yanchar, N.L., 2008. Impact of maternal substance abuse and smoking on children with gastroschisis. *Journal of Pediatric Surgery* 43, 879–883. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2007.12.032>
- Welsh, M., Saunders, P.T.K., Atanassova, N., Sharpe, R.M., Smith, L.B., 2009. Androgen action *via* testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB j.* 23, 4218–4230. <https://doi.org/10.1096/fj.09-138347>
- Welsh, M., Saunders, P.T.K., Fisker, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Smith, L.B., Sharpe, R.M., 2008. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J. Clin. Invest.* 118, 1479–1490. <https://doi.org/10.1172/JCI34241>
- Wen, Q., Cheng, C.Y., Liu, Y.-X., 2016. Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 59, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.03.003>
- Wenger, Fernández-Ruiz, Ramos, 1999. Immunocytochemical Demonstration of CB1 Cannabinoid Receptors in the Anterior Lobe of the Pituitary Gland: Cannabinoid receptor in the pituitary. *Journal of Neuroendocrinology* 11, 873–878. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1999.00402.x>
- Wenger, T., Jamali, K.A., Juaneda, C., Bacsy, E., Tramu, G., 2000. The endogenous cannabinoid, anandamide regulates anterior pituitary secretion in vitro. *Addiction Biol.* 5, 59–64. <https://doi.org/10.1080/13556210071270>
- Wenger, T., Ledent, C., Csernus, V., Gerendai, I., 2001. The Central Cannabinoid Receptor Inactivation Suppresses Endocrine Reproductive Functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284, 363–368. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4977>
- Wenger, T., Moldrich, G., 2002. The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 66, 301–307. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0353>
- Wenger, T., Rettori, V., Snyder, G.D., Dalterio, S., McCann, S.M., 1987a. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol on the Hypothalamic-Pituitary Control of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Secretion in Adult Male Rats. *Neuroendocrinology* 46, 488–493. <https://doi.org/10.1159/000124870>
- Wenger, T., Rettori, V., Snyder, G.D., Dalterio, S., McCann, S.M., 1987b. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol on the Hypothalamic-Pituitary Control of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Secretion in Adult Male Rats. *Neuroendocrinology* 46, 488–493. <https://doi.org/10.1159/000124870>
- Wenger, T., Tóth, B.E., Juanéda, C., Leonardelli, J., Tramu, G., 1999. The effects of cannabinoids on the regulation of reproduction. *Life Sciences* 65, 695–701. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00292-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00292-1)
- Wensing, C.J., 1973. Testicular descent in some domestic mammals. 3. Search for the factors that regulate the gubernacular reaction. *Proc K Ned Akad Wet C* 76, 196–202.
- Western, P.S., Bergen, J.A., Miles, D.C., Sinclair, A.H., 2010. Male fetal germ cell differentiation involves complex repression of the regulatory network controlling pluripotency. *FASEB j.* 24, 3026–3035. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151555>

- Western, P.S., Miles, D.C., van den Bergen, J.A., Burton, M., Sinclair, A.H., 2008. Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells. *Stem Cells* 26, 339–347. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0622>
- Westfall, R.E., Janssen, P.A., Lucas, P., Capler, R., 2006. Survey of medicinal cannabis use among childbearing women: Patterns of its use in pregnancy and retroactive self-assessment of its efficacy against ‘morning sickness.’ *Complementary Therapies in Clinical Practice* 12, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2005.09.006>
- Whan, L.B., West, M.C.L., McClure, N., Lewis, S.E.M., 2006. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. *Fertility and Sterility* 85, 653–660. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.027>
- White, C.M., 2019. A Review of Human Studies Assessing Cannabidiol’s (CBD) Therapeutic Actions and Potential. *The Journal of Clinical Pharmacology* 59, 923–934. <https://doi.org/10.1002/jcph.1387>
- Whiting, P.F., Wolff, R.F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A.V., Keurentjes, J.C., Lang, S., Misso, K., Ryder, S., Schmidtkofer, S., Westwood, M., Kleijnen, J., 2015. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 313, 2456. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.6358>
- Whyte, L.S., Ryberg, E., Sims, N.A., Ridge, S.A., Mackie, K., Greasley, P.J., Ross, R.A., Rogers, M.J., 2009. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16511–16516. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902743106>
- Widman, M., Nordqvist, M., Dollery, C.T., Briant, R.H., 1974. Metabolism of Δ^1 -tetrahydrocannabinol by the isolated perfused dog lung. Comparison with *in vitro* liver metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 27, 842–848. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1975.tb10227.x>
- Wiebe, E., Just, A., 2019. How Cannabis Alters Sexual Experience: A Survey of Men and Women. *The Journal of Sexual Medicine* 16, 1758–1762. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2019.07.023>
- Wild, C.P., 2005. Complementing the Genome with an “Exposome”: The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14, 1847–1850. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456>
- Wiley, J.L., Owens, R.A., Lichtman, A.H., 2016. Discriminative Stimulus Properties of Phytocannabinoids, Endocannabinoids, and Synthetic Cannabinoids, in: Porter, J.H., Prus, A.J. (Eds.), *The Behavioral Neuroscience of Drug Discrimination, Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer International Publishing, Cham, pp. 153–173. https://doi.org/10.1007/7854_2016_24
- Wilhelm, D., Hiramatsu, R., Mizusaki, H., Widjaja, L., Combes, A.N., Kanai, Y., Koopman, P., 2007. SOX9 Regulates Prostaglandin D Synthase Gene Transcription in Vivo to Ensure Testis Development. *Journal of Biological Chemistry* 282, 10553–10560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609578200>
- Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M.J., Combes, A.N., Beverdam, A., Bowles, J., Mizusaki, H., Koopman, P., 2005. Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Developmental Biology* 287, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.039>

- Wilhelm, D., Yang, J.X., Thomas, P., 2013. Mammalian Sex Determination and Gonad Development, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 89–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416021-7.00003-1>
- Williams, L.J., Correa, A., Rasmussen, S., 2004. Maternal lifestyle factors and risk for ventricular septal defects. *Birth Defect Res A* 70, 59–64. <https://doi.org/10.1002/bdra.10145>
- Wilson, J.D., 1983. The endocrine control of sexual differentiation. *Harvey Lect* 79, 145–172.
- Wilson, J.D., 1978. Sexual Differentiation. *Annu. Rev. Physiol.* 40, 279–306. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.40.030178.001431>
- Winter, J.S.D., Faiman, C., Hobson, W.C., Prasad, A.V., Reyes, F.I., 1975. Pituitary-Gonadal Relations in Infancy. I. Patterns of Serum Gonadotropin Concentrations from Birth to Four Years of Age in Man and Chimpanzee. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 40, 545–551. <https://doi.org/10.1210/jcem-40-4-545>
- Winter, J.S.D., Hughes, I.A., Reyes, F.I., Faiman, C., 1976. Pituitary-Gonadal Relations in Infancy: 2. Patterns of Serum Gonadal Steroid Concentrations in Man from Birth to Two Years of Age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 42, 679–686. <https://doi.org/10.1210/jcem-42-4-679>
- Witter, F., Niebyl, J., 1990. Marijuana Use in Pregnancy and Pregnancy Outcome. *Amer J Perinatol* 7, 36–38. <https://doi.org/10.1055/s-2007-999442>
- Wittmann, G., Deli, L., Kalló, I., Hrabovszky, E., Watanabe, M., Liposits, Z., Fekete, C., 2007. Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 503, 270–279. <https://doi.org/10.1002/cne.21383>
- Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M.M., Sexton, P.M., 2018. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 638–653. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0049-3>
- Word, R.A., George, F.W., Wilson, J.D., Carr, B.R., 1989. Testosterone Synthesis and Adenylate Cyclase Activity in the Early Human Fetal Testis Appear to Be Independent of Human Chorionic Gonadotropin Control*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 69, 204–208. <https://doi.org/10.1210/jcem-69-1-204>
- Wu, Q., Kanata, K., Saba, R., Deng, C.-X., Hamada, H., Saga, Y., 2013. Nodal/activin signaling promotes male germ cell fate and suppresses female programming in somatic cells. *Development* 140, 291–300. <https://doi.org/10.1242/dev.087882>
- Wu, Q., Liu, J., Wang, X., Feng, L., Wu, J., Zhu, X., Wen, W., Gong, X., 2020. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *BioMed Eng OnLine* 19, 9. <https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>
- Wylie, C., 1999. Germ Cells. *Cell* 96, 165–174. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80557-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80557-7)
- Wyndham, N.R., 1943. A morphological study of testicular descent. *J Anat* 77, 179–188.3.
- Xiao, X., Mruk, D.D., Wong, C.K.C., Yan Cheng, C., 2014. Germ Cell Transport Across the Seminiferous Epithelium During Spermatogenesis. *Physiology* 29, 286–298. <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2014>
- Xie, H., Sun, X., Piao, Y., Jegga, A.G., Handwerger, S., Ko, M.S.H., Dey, S.K., 2012. Silencing or Amplification of Endocannabinoid Signaling in Blastocysts via CB1 Compromises Trophoblast Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry* 287, 32288–32297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381145>

- Yamanaka, H., Komeya, M., Nakamura, H., Sanjo, H., Sato, T., Yao, M., Kimura, H., Fujii, T., Ogawa, T., 2018. A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 500, 885–891. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.180>
- Yao, H.H.-C., Whoriskey, W., Capel, B., 2002. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 16, 1433–1440. <https://doi.org/10.1101/gad.981202>
- Ye, L., Cao, Z., Wang, W., Zhou, N., 2019. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *CMP* 12, 239–248. <https://doi.org/10.2174/1874467212666190215112036>
- Yin, H., Chu, A., Li, W., Wang, B., Shelton, F., Otero, F., Nguyen, D.G., Caldwell, J.S., Chen, Y.A., 2009. Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-arrestin PathHunter assay. *J Biol Chem* 284, 12328–12338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806516200>
- Yoshida, S., 2010. Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Development, Growth & Differentiation* 52, 311–317. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01174.x>
- Yoshida, S., 2008. Spermatogenic Stem Cell System in the Mouse Testis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 73, 25–32. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.046>
- Yoshida, S., Sukeno, M., Nabeshima, Y., 2007. A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis. *Science* 317, 1722–1726. <https://doi.org/10.1126/science.1144885>
- Young-Wolff, K.C., Adams, S.R., Wi, S., Weisner, C., Conway, A., 2020a. Routes of cannabis administration among females in the year before and during pregnancy: Results from a pilot project. *Addictive Behaviors* 100, 106125. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2019.106125>
- Young-Wolff, K.C., Ray, G.T., Alexeeff, S.E., Adams, S.R., Does, M.B., Ansley, D., Avalos, L.A., 2021. Rates of Prenatal Cannabis Use Among Pregnant Women Before and During the COVID-19 Pandemic. *JAMA* 326, 1745. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.16328>
- Young-Wolff, K.C., Sarovar, V., Tucker, L.-Y., Conway, A., Alexeeff, S., Weisner, C., Armstrong, M.A., Goler, N., 2019. Self-reported Daily, Weekly, and Monthly Cannabis Use Among Women Before and During Pregnancy. *JAMA Netw Open* 2, e196471. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.6471>
- Young-Wolff, K.C., Sarovar, V., Tucker, L.-Y., Goler, N., Conway, A., Weisner, C., Armstrong, M.A., Alexeeff, S., 2020b. Validity of Self-reported Cannabis Use Among Pregnant Females in Northern California. *J Addict Med* 14, 287–292. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000581>
- Young-Wolff, K.C., Tucker, L.-Y., Alexeeff, S., Armstrong, M.A., Conway, A., Weisner, C., Goler, N., 2017. Trends in Self-reported and Biochemically Tested Marijuana Use Among Pregnant Females in California From 2009-2016. *JAMA* 318, 2490. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.17225>
- Yu, X., Nassar, N., Mastroiacovo, P., Canfield, M., Groisman, B., Bermejo-Sánchez, E., Ritvanen, A., Kiuru-Kuhlefelt, S., Benavides, A., Sipek, A., Pierini, A., Bianchi, F., Källén, K., Gatt, M., Morgan, M., Tucker, D., Canessa, M.A., Gajardo, R., Mutchinick, O.M., Szabova, E., Csáky-Szunyogh, M., Tagliabue, G., Cragan, J.D., Nembhard, W.N., Rissmann, A., Goetz, D., Bower, C., Baynam, G., Lowry, R.B., Leon, J.A., Luo, W., Rouleau, J., Zarante, I., Fernandez, N., Amar, E., Dastgiri, S., Contiero, P., Martínez-de-

- Villarreal, L.E., Borman, B., Bergman, J.E.H., de Walle, H.E.K., Hobbs, C.A., Nance, A.E., Agopian, A.J., 2019. Hypospadias Prevalence and Trends in International Birth Defect Surveillance Systems, 1980–2010. *European Urology* 76, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.06.027>
- Yücel, M., Lorenzetti, V., Suo, C., Zalesky, A., Fornito, A., Takagi, M.J., Lubman, D.I., Solowij, N., 2016. Hippocampal harms, protection and recovery following regular cannabis use. *Transl Psychiatry* 6, e710–e710. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.201>
- Yue, S.S.K., Hutson, J.M., Li, R., 2015. Gene expression during gonocyte transformation into spermatogonial stem cells is not androgen dependent. *Journal of Pediatric Surgery* 50, 2090–2093. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.08.034>
- Zendulka, O., Dovrtělová, G., Nosková, K., Turjap, M., Šulcová, A., Hanuš, L., Juřica, J., 2016. Cannabinoids and Cytochrome P450 Interactions. *CDM* 17, 206–226. <https://doi.org/10.2174/1389200217666151210142051>
- Zhang, C., Yeh, S., Chen, Y.-T., Wu, C.-C., Chuang, K.-H., Lin, H.-Y., Wang, R.-S., Chang, Y.-J., Mendis-Handagama, C., Hu, L., Lardy, H., Chang, C., 2006. Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17718–17723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608556103>
- Zhang, Q., Chen, X., Guo, H., Trindade, L.M., Salentijn, E.M.J., Guo, R., Guo, M., Xu, Y., Yang, M., 2018. Latitudinal Adaptation and Genetic Insights Into the Origins of Cannabis sativa L. *Front. Plant Sci.* 9, 1876. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01876>
- Zheng, B., Zhou, Q., Guo, Y., Shao, B., Zhou, T., Wang, L., Zhou, Z., Sha, J., Guo, X., Huang, X., 2014. Establishment of a proteomic profile associated with gonocyte and spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Proteomics* 14, 274–285. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300395>
- Zheng, C., Chen, L., Chen, X., He, X., Yang, J., Shi, Y., Zhou, N., 2013. The Second Intracellular Loop of the Human Cannabinoid CB2 Receptor Governs G Protein Coupling in Coordination with the Carboxyl Terminal Domain. *PLoS ONE* 8, e63262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063262>
- Zheng, Y., Phillips, L.J., Hartman, R., An, J., Dann, C.T., 2016. Ectopic POU5F1 in the male germ lineage disrupts differentiation and spermatogenesis in mice. *Reproduction* 152, 363–377. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0140>
- Zhou, B., Hutson, J.M., 1995. Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Fails to Stimulate Gonocyte Differentiation in Newborn Mouse Testes in Organ Culture. *Journal of Urology* 153, 501–505. <https://doi.org/10.1097/00005392-199502000-00071>
- Zhou, B., Watts, L.M., Hutson, J.M., 1993. Germ Cell Development in Neonatal Mouse Testes in Vitro Requires Müllerian Inhibiting Substance. *Journal of Urology* 150, 613–616. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)35562-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)35562-3)
- Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q., He, Z., 2019. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 2681–2695. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9>
- Zimmerman, A.M., Zimmerman, S., Raj, A.Y., 1978. EFFECTS OF CANNABINOIDS ON SPERMATOGENESIS IN MICE, in: *Marihuana Biological Effects*. Elsevier, pp. 407–418. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-023759-6.50036-6>
- Zimmermann, S., Schöttler, P., Engel, W., Adham, I.M., 1997. Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: Structure and expression during testis and ovary development. *Mol. Reprod.*

- Dev. 47, 30–38. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199705\)47:1<30::AID-MRD5>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<30::AID-MRD5>3.0.CO;2-R)
- Zirkin, B.R., Papadopoulos, V., 2018. Leydig cells: formation, function, and regulation†. *Biology of Reproduction* 99, 101–111. <https://doi.org/10.1093/biolre/iroy059>
- Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., Bray, F., 2014. International Variations and Trends in Testicular Cancer Incidence and Mortality. *European Urology* 65, 1095–1106. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.11.004>
- Zuardi, A.W., Crippa, J.A.S., Hallak, J.E.C., Moreira, F.A., Guimarães, F.S., 2006. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res* 39, 421–429. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006000400001>
- Zuardi, A.W., Guimarães, F.S., Moreira, A.C., 1993. Effect of cannabidiol on plasma prolactin, growth hormone and cortisol in human volunteers. *Braz J Med Biol Res* 26, 213–217.
- Zuardi, A.W., Shirakawa, I., Finkelfarb, E., Karniol, I.G., 1982a. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ^9 -THC in normal subjects. *Psychopharmacology* 76, 245–250. <https://doi.org/10.1007/BF00432554>
- Zuardi, A.W., Shirakawa, I., Finkelfarb, E., Karniol, I.G., 1982b. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ^9 -THC in normal subjects. *Psychopharmacology* 76, 245–250. <https://doi.org/10.1007/BF00432554>
- Zuckerman, B., Frank, D.A., Hingson, R., Amaro, H., Levenson, S.M., Kayne, H., Parker, S., Vinci, R., Aboagye, K., Fried, L.E., Cabral, H., Timperi, R., Bauchner, H., 1989. Effects of Maternal Marijuana and Cocaine Use on Fetal Growth. *N Engl J Med* 320, 762–768. <https://doi.org/10.1056/NEJM198903233201203>
- Zufferey, F., Donzé, N., Rahban, R., Senn, A., Stettler, E., Rudaz, S., Nef, S., Rossier, M.F., 2020. Semen endocannabinoids are correlated to sperm quality in a cohort of 200 young Swiss men. *Andrologia* 8, 1126–1135. <https://doi.org/10.1111/andr.12785>
- Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., Högestätt, E.D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457. <https://doi.org/10.1038/22761>

Titre : Impact de deux phytocannabinoïdes, le $\Delta 9$ -THC et le CBD, utilisés à des fins récréatives et thérapeutiques, sur la physiologie du testicule

Mots clés : Testicule – Tumeurs testiculaires des cellules germinales – Système endocrinien – Cannabinoïdes – THC – CBD.

Aujourd'hui, les débats s'intensifient dans le monde pour la légalisation du cannabis à usage récréationnel ou thérapeutique. Un risque accru de développer des tumeurs testiculaires des cellules germinales a été établi chez les consommateurs de cannabis. Cependant, il existe encore des preuves contradictoires de l'association entre la consommation de cannabis et de faibles niveaux de testostérone ainsi que l'altération de paramètres spermatiques. Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps investigué l'impact d'une exposition aux deux principaux composants du cannabis, le (-)- $\Delta 9$ -trans-tetrahydrocannabinol ($\Delta 9$ -THC) et le cannabidiol (CBD) sur la physiologie du testicule humain adulte. Des explants testiculaires adultes provenant de donneurs *post-mortem* ont été cultivés en culture organotypique et exposés au $\Delta 9$ -THC, au CBD ou un à un mélange équimolaire de CBD et de $\Delta 9$ -THC de 10^{-9} M à 10^{-5} M pendant 48h ou 9 jours. La morphologie, la sécrétion de testostérone, le nombre de cellules apoptotiques et prolifératives, ainsi que l'expression de gènes impliqués dans les fonctions des cellules de Sertoli et de Leydig, et dans la différenciation des cellules germinales et la méiose ne sont affectés par aucun traitement. Ces résultats suggèrent l'absence d'effets directs d'une exposition au CBD et/ou au $\Delta 9$ -THC sur les fonctions testiculaires après 48h ou 9 jours d'exposition.

Le cannabis étant la drogue la plus consommée chez la femme enceinte, nous avons ensuite investigué la capacité du $\Delta 9$ -THC et du CBD à perturber la physiologie du testicule fœtal.

De manière inédite, nous avons caractérisé l'expression des composants du système des endocannabinoïdes (ECB), qui inclut les enzymes de synthèse et de dégradation des ligands endogènes, et des récepteurs, avec lesquels le $\Delta 9$ -THC et le CBD interagissent. Les récepteurs et les enzymes de synthèse et de dégradation du système des ECB sont exprimés dans le testicule fœtal humain. Des explants testiculaires fœtaux provenant de prélèvements d'interruptions volontaires de grossesse de premier trimestre ont été cultivés en culture organotypique et exposés au $\Delta 9$ -THC, au CBD ou un à un mélange équimolaire de CBD et de $\Delta 9$ -THC de 10^{-9} M à 10^{-5} M pendant 72h ou 14 jours. L'exposition au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD a entraîné une altération de la prolifération et de la viabilité cellulaire dans le tissu, ainsi que la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig et la sécrétion d'Anti-Müllerian Hormone (AMH) par les cellules de Sertoli. Des analyses transcriptomiques par Bulk RNA barcoding and sequencing ont montré l'altération de l'expression de 187 gènes dans les explants testiculaires exposés au $\Delta 9$ -THC et/ou au CBD, impliqués dans le métabolisme du cholestérol, la réponse aux substances toxiques et la régulation du cycle cellulaire. Enfin, l'exposition de souris Swiss gestantes à 5 mg/kg par jour d'un mélange de $\Delta 9$ -THC et de CBD pendant la période de développement testiculaire entraîne l'altération de la prolifération et de la différenciation des gonocytes. Dans l'ensemble, nos résultats illustrent les potentiels effets négatifs d'une consommation maternelle de cannabis au cours de la grossesse sur le développement de la fonction reproductive.

Title: Impact of two phytocannabinoids, the $\Delta 9$ -THC and the CBD, used for recreational and therapeutic purposes on testicular physiology

Key words: Testis – Testicular germ cell tumors – Endocrine system – Cannabinoids – THC – CBD

Cannabis legalization for recreational and therapeutic purposes has been actively debated worldwide. An increased risk of developing testicular germ cell tumors has been established in cannabis users. However, there is still conflicting evidence of the association between cannabis use and low testosterone levels as well as altered sperm parameters in man. In this context, we investigated the impact of an exposure to the two main cannabis components, the (-)- $\Delta 9$ -trans-tetrahydrocannabinol ($\Delta 9$ -THC) and the cannabidiol (CBD) on adult human testicular physiology. Adult testicular explants obtained from multi-organ donors were cultivated in organotypic culture and exposed to $\Delta 9$ -THC, CBD or an equimolar mixture of $\Delta 9$ -THC and CBD ($\Delta 9$ -THC/CBD) from 10^{-9} M to 10^{-5} M for up to either 48h or 9 days. The tissue morphology, the testosterone secretion, the number of apoptotic and proliferative cells, as well as the expression of genes involved in germ cell differentiation, meiosis, and Sertoli and Leydig functions were not affected in any conditions. Our results show an absence of acute direct effects of a $\Delta 9$ -THC and/or CBD exposure on adult testicular functions after 48h or 9 days.

As cannabis is the most commonly used drug in pregnant women, we next investigated ability of $\Delta 9$ -THC and CBD to disrupt human fetal testicular physiology. We characterized for

the first time the expression of the endocannabinoid system components, composed of endogenous ligands synthesis and degradation enzymes and receptors with which $\Delta 9$ -THC and CBD interact. Fetal testicular explants from first-trimester termination of pregnancy samples were cultivated in organotypic culture and exposed to $\Delta 9$ -THC, CBD, or $\Delta 9$ -THC/CBD from 10^{-7} M to 10^{-5} M for up to either 72h or 14 days. Exposure to $\Delta 9$ -THC and/or CBD resulted in altered cell proliferation and viability, as well as testosterone secretion by Leydig cells and Anti-Müllerian Hormone (AMH) secretion by Sertoli cells. Transcriptomic analyses by Bulk RNA barcoding and sequencing on exposed versus unexposed fetal testis explants showed 187 differentially expression genes, some of which involved in cholesterol metabolism, response to toxic substances and cell cycle regulation.

Finally, exposure of pregnant Swiss mice 5 mg/kg per day of a mixture of $\Delta 9$ -THC and CBD during testicular development resulted in histological and transcriptomic alterations in the proliferation and differentiation of gonocytes.

Overall, our results support a potential adverse effect of cannabis consumption in pregnant women on the male reproductive function development.

