



HAL
open science

Etude des rôles du récepteur nucléaire CAR dans la physiologie et les physiopathologies testiculaires

Mélusine Monroe

► **To cite this version:**

Mélusine Monroe. Etude des rôles du récepteur nucléaire CAR dans la physiologie et les physiopathologies testiculaires. Biologie du développement. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC114 . tel-04480312

HAL Id: tel-04480312

<https://theses.hal.science/tel-04480312>

Submitted on 27 Feb 2024

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.

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
Pour l'obtention du grade de

DOCTEURE D'UNIVERSITE

Spécialité : Biologie Santé

Présentée et soutenue publiquement
Par

Mélusine Monrose

le 14 décembre 2022

**Etude des rôles du récepteur nucléaire CAR
dans la physiologie et les physiopathologies testiculaires**

Rapportrices : **Dr. Julie COCQUET**, Institut Cochin / Paris
Dr. Nathalie DEJUCQ RAINSFORD, IRSET / Université de Rennes
Dr. Michela PLATEROTI, Inserm U1113 / IRFAC / Strasbourg

Examineur : **Pr. Nicolas BARNICH**, M2ISH / Université Clermont Auvergne

Directeurs de thèse : **Dr. David VOLLE**, iGReD / INSERM U1103 / CNRS UMR 6293 / UCA
Pr. Claude BEAUDOIN, iGRED / INSERM U1103 / CNRS UMR 6293 /
UCA

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres ayant accepté de participer à mon jury de thèse. Merci aux Docteurs Julie COCQUET, Nathalie DEJUCQ RAINSFORD et Michela PLATEROTI d'avoir accepté d'être rapportrices de ce travail. Merci également au Professeur Nicolas BARNICH, examinateur pour l'évaluation de ce travail. Merci à chacun d'entre vous d'accorder de votre temps à la lecture de ce manuscrit et à l'évaluation de mes travaux lors de la soutenance.

David, encore merci de m'avoir accordé ta confiance pendant toutes ces années de travail ! Je suis heureuse et reconnaissante d'avoir contribué à l'avancée de ce projet ambitieux. Grâce à ta passion pour la science et à ta bienveillance avec les membres de l'équipe, j'ai pu apprendre et grandir dans une atmosphère enrichissante. Merci aussi pour ta patience et ton calme, des qualités qui m'ont beaucoup aidées dans la gestion du stress. Je garderai de bons souvenirs de mes années de chercheuse en herbe, à la fois bien guidée mais également autonome et valorisée.

Claude, je te remercie pour tes nombreux conseils, pour le partage de ton savoir-faire et de tes protocoles annotés comme aucun autre ! Merci également pour nos nombreux échanges au cours de mes recherches et pour ton aide à la préparation des oraux par lesquels j'ai dû passer. Et comment ne pas te remercier pour ton sens de l'humour, tes blagues même les plus douteuses m'ont toujours fait au minimum sourire.

Hélène, notre maman de laboratoire, merci d'avoir toujours été là pour moi, je ne l'oublierai pas ! En plus de m'avoir apporté une formation technique de qualité, tu as toujours été dévouée que ce soit pour prendre le relais sur mes manips, pour me remotiver dans les moments difficiles, pour me faire rire quand le moral n'était pas au top et pour me parler franchement quand c'était nécessaire !

Laura, merci de m'avoir aidé à prendre le rythme de la vie de laboratoire, grâce à toi j'ai découvert les secrets de l'organisation et de la rigueur, indispensables pour mener à bien un projet de recherche. J'ai à tes côtés pu développer des compétences informatiques, puisque tu n'as pas peur de t'auto-former et d'aller vers l'inconnu ! Avec toi je me suis aussi intégrée à la vie sociale du laboratoire ; quand parfois je me serais contentée de la compagnie de mon

ordinateur capricieux, tu m'as poussé à faire des pauses déjeuners avec les autres, à participer à l'organisation d'évènements festifs pour l'institut, à découvrir les autres étudiants et faire la fête avec les GReDuates !

Manon, ou comme on aime le dire « la tornade ». Mais une tornade inoffensive rassure toi ; je pense que tout le monde aimerait te remercier pour le vent de légèreté que tu apportes avec toi ! Tu m'as permis de m'ouvrir un peu plus à mes collègues, en t'observant j'ai compris qu'il était positif d'être naturelle même dans un environnement professionnel. Ton petit caractère est un cadeau pour chaque humain qui aurait la chance de faire ta connaissance ! Alors merci d'être toi, merci pour le soutien que tu m'as apporté.

Angélique et Jean-Paul, le duo que même la retraite ne séparera pas ! Ange, une petite boule d'énergie comme toi, on ne peut l'ignorer, toujours souriante et bienveillante, tu es vraiment un membre inestimable de cette équipe, merci pour ta bonne humeur au quotidien. J-P le malicieux, merci aussi pour toutes ces blagues, le comique de répétition a plutôt bien fonctionné ! Merci à vous deux pour votre aide tout au long de mon parcours !

Merci aux animaliers, Sandrine, Philippe, Kherridine et Eva, vos conseils et votre aide précieuse nous sont réellement indispensables !

Merci à tous les membres du laboratoire, chercheurs et étudiants avec qui j'ai pu échanger scientifiquement et pas que, la vie au GReD a été une belle expérience.

Merci au Crew Toto et Marionus, c'est avec vous que j'ai vécu le début de cette folle aventure ; merci aux Originals Damien, James, Ruben, Aizat, Roxane, Pierre et Alexandra, toujours disponibles pour boire une bière et danser jusqu'au bout de la nuit !

Manon ma petite colocataire, merci pour ton soutien sans faille, tu m'as écouté me plaindre, tu as même pris soin de moi pendant ma période de convalescence et pendant la longue écriture de ce manuscrit, je ne te remercierai jamais assez !

Camille et Laura alias Isa et Nath, comment vous exprimer le bien-être que vous m'avez apporté pendant ces années Clermontoise ! Des amies en or, des personnes extraordinaires ! Je

suis très heureuse d'avoir chamboulé votre duo pour le transformer en trio, merci de m'avoir laissé entrer dans vos vies. Croyez-moi je ne compte plus en sortir !

Laura, mon bibi love, quelle rencontre inattendue ! Un coup de foudre, un coup de cœur, peu importe on le sait, l'amour entre nous ne tarira jamais ! Je lève mon verre à tous ses souvenirs hilarants qui resteront gravés dans mon cœur et à tous ceux à venir !

A ma famille, merci de m'avoir soutenu pendant ces longues années d'étude.

Liste des publications

2022

L. Thirouard, H. Holota, M. Monrose, M. Garcia, A. de Haze, C. Damon-Soubeyrand, Y. Renaud, J. Saru, A. Perino, K. Schoonjans, C. Beaudoin and D. Volle, **“Identification of a Crosstalk among TGR5, GLIS2, and TP53 Signaling Pathways in the Control of Undifferentiated Germ Cell Homeostasis and Chemoresistance.”**, Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), pp. e2200626, 2022.

L. Sauzeat, J. Eychenne, L. Gurioli, M. Boyet, D. Jessop, R. Moretti, M. Monrose, H. Holota, C. Beaudoin and D. Volle, **“Metallome deregulation and health-related impacts due to long-term exposure to recent volcanic ash deposits: New chemical and isotopic insights.”**, The Science of the total environment, pp. 154383, 2022.

2021

L. Thirouard, H. Holota, M. Monrose, M. Garcia, A. De Haze, J. Saru, F. Caira, C. Beaudoin and D. Volle, **“Analysis of the Reversible Impact of the Chemodrug Busulfan on Mouse Testes.”**, Cells, vol. 10 (9) , 2021.

E. Martinot, L. Thirouard, H. Holota, M. Monrose, M. Garcia, C. Beaudoin and D. Volle, **“Intestinal microbiota defines the GUT-TESTIS axis.”**, Gut, 2021.

2020

H. Holota, L. Thirouard, M. Monrose, M. Garcia, A. De Haze, J. Saru, F. Caira, C. Beaudoin and D. Volle, **“FXRalpha modulates leydig cell endocrine function in mouse.”**, Molecular and cellular endocrinology, vol. 518 , pp. 110995, 2020.

M. Monrose, L. Thirouard, M. Garcia, H. Holota, A. De Haze, F. Caira, C. Beaudoin and D. Volle, **“New perspectives on PPAR, VDR and FXRalpha as new actors in testicular pathophysiology.”**, Molecular aspects of medicine, pp. 100886, 2020.

2019

M. Garcia, L. Thirouard, M. Monrose, H. Holota, A. De Haze, F. Caira, C. Beaudoin and D. Volle, **“Farnesoid X receptor alpha (FXRalpha) is a critical actor of the development and pathologies of the male reproductive system.”**, Cell. Mol. Life Sci., 2019.

H. Holota, L. Thirouard, M. Garcia, M. Monrose, A. de Haze, J. Saru, F. Caira, C. Beaudoin and D. Volle, **“Fxr α gene is a target gene of hCG signaling pathway and represses hCG induced steroidogenesis.”**, The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, pp. 105460, 2019.

2018

M. Garcia, L. Thirouard, L. Sedes, M. Monrose, H. Holota, F. Caira, D. Volle and C. Beaudoin, **“Nuclear Receptor Metabolism of Bile Acids and Xenobiotics: A Coordinated Detoxification System with Impact on Health and Diseases.”**, International journal of molecular sciences, vol. 19 (11), 2018.

Résumé

Les troubles de la fertilité représentent un enjeu majeur de santé publique puisqu'ils concernent des millions de personnes en âge de procréer à travers le monde. Le facteur masculin intervient dans 50% des cas identifiés d'infertilité du couple, impliquant des anomalies qualitatives et/ou quantitatives de la production spermatique. Cependant à l'heure actuelle, l'origine d'une grande partie des troubles de la reproduction masculine demeure inexpliquée. Depuis plusieurs décennies le monde constate une augmentation de ces troubles, plus particulièrement dans les pays développés, attirant ainsi l'attention de la communauté scientifique sur l'implication des polluants environnementaux dans l'étiologie de l'infertilité. Le nombre et la diversité des polluants xénobiotiques relargués dans la nature sont colossaux et menacent de nombreuses fonctions physiologiques dont la reproduction, en raison de leurs capacités d'interaction avec de multiples voies de signalisations. Selon les chercheurs, l'exposition périnatale aux xénobiotiques peut altérer la physiologie testiculaire et prédisposer au développement de troubles de la fertilité. Néanmoins, une meilleure compréhension des signalisations associées aux molécules environnementales et de leurs liens avec les physiopathologies testiculaires est essentielle afin d'identifier de nouvelles causes d'infertilité.

Les récepteurs CAR et PXR sont des récepteurs de xénobiotiques exprimés dans le testicule chez l'Homme ainsi que chez le rongeur. Cependant leurs rôles au sein du testicule n'ont pas encore été entièrement établis. Dans cette étude, nous avons étudié les impacts sur la physiologie testiculaire et sur la fonction de reproduction des modulations néonatales de leur signalisation dans un modèle murin. Nos résultats montrent que l'inhibition de la signalisation CAR entraîne des troubles de la fertilité chez la souris, associés à des altérations qualitatives des spermatozoïdes. En effet, nous avons identifié des défauts au niveau des processus de différenciation précoce et tardif des cellules germinales impliquant notamment des dérégulations de la signalisation FOXO1 ainsi que des niveaux d'acétylation de l'histone H4 pouvant être associées à une rétention des histones au sein du génome spermatique. De plus, nous avons également mis en évidence des impacts délétères additifs des activations néonatales des voies de signalisation CAR et PXR sur la fertilité des souris.

Notre étude souligne les rôles majeurs des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans la physiologie testiculaire ainsi que leur implication potentielle dans la survenue des troubles de la fertilité dans un contexte d'expositions environnementales.

Mots clés : CAR, PXR, Repro-toxicité, Xénobiotiques, Spermatogonies, Endocrinologie

Abstract

Fertility disorders are a major public health concern since they concern millions of people of reproductive age all over the world. The male factor is involved in 50% of identified cases of infertility within couples, involving qualitative and quantitative alterations of the sperm production. However, there are still too many unknowns regarding the cause of many male reproductive disorders. For several decades, an increase in these disorders has been detected especially in developed countries, attracting the scientific community attention to the involvement of environmental pollutants in the etiology of infertility. The number and variety of xenobiotics released into the environment are huge and threaten many physiological functions because of the multiple intracellular signalling pathways that they can affect. According to the researchers, perinatal exposure to xenobiotics may induce altered testicular physiology and predispose to the development of fertility disorders. However, It is essential to better understand the signalling pathways involved in the negative environmental impacts of xenobiotics on testicular physiology to identify other causes of infertility.

CAR and PXR are xenobiotic receptors expressed in the testis in men as well as rodents. However, their roles within the testis have not been fully established. In this study, we have identified impacts of neonatal modulations of their signalling on the testicular physiology and the reproduction function in mice. Our data showed that the inhibition of CAR signalling leads to fertility disorders in mice, correlated with qualitative sperm production. Indeed, we have detected alterations in the early and late differentiations of germ cells, notably involving FOXO1 signalling and H4 acetylation levels deregulations that can be associated with histones retention within the sperm genome. Moreover, we have highlighted deleterious additive impacts of the neonatal co-activation of CAR and PXR signalling of mice fertility.

Our study has identified major roles of CAR and PXR nuclear receptors in testicular physiology and their potential implication in the emergence of fertility disorders associated with environmental exposures.

Key words: CAR, PXR, Repro-toxicity, Xenobiotics, Spermatogonia, Endocrinology

Abréviations

Abréviations

Aal	Spermatogonie A aligned
<i>Abp</i>	<i>Androgen binding protein</i>
<i>Actb</i>	<i>Actin beta</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF1	<i>Activation function 1</i>
AF2	<i>Activation function 2</i>
AhR	<i>Aryl hydro-carbon receptor</i>
AI	Agoniste inverse
AIP1	<i>Actin-interacting protein 1</i>
Apr	Spermatogonie A paired
AR	<i>Androgen receptor</i>
As	Spermatogonie A single
ATG7	<i>Autophagy related 7</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosine triphosphate
Bax	<i>Bcl-2 associated X-protein</i>
<i>Bcl-x</i>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
<i>Bcl6b</i>	<i>B-Cell CLL/lymphoma 6, member B</i>
BHT	Barrière hémato-testiculaire
BLIMP1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>
BPA	Bisphénol A

BRDT	<i>Bromodomain testis-specific</i>
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CCL9	C-C motif chemokine ligand 9
CCL12	C-C motif chemokine ligand 12
CCRP	<i>Cytoplasmic CAR retention protein</i>
<i>Cdh1/Chd1</i>	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 1</i>
<i>Chd5</i>	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 5</i>
ChIPs	Immunoprécipitations de la chromatine
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
<i>Cldn3</i>	<i>Claudin3</i>
<i>Cldn11</i>	<i>Claudin11</i>
CP-2	<i>Cyclin protein-2</i>
CPB	CREB-binding protein
CSF1	<i>Colony stimulating factor 1</i>
<i>Csf3r</i>	<i>Colony stimulating factor 3 receptor</i>
<i>Cx43</i>	<i>Connexin 43</i>
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2
CXCL5	C-X-C motif chemokine ligand 5
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
<i>Cxcr4</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>
CYP	Cytochromes P450
<i>Cyp17a1</i>	<i>Cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1</i>
<i>Cyp26b1</i>	<i>Cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1</i>

<i>Cyp2b10</i>	<i>Cytochrome P450 family 2 subfamily B member 10</i>
<i>Dazl</i>	<i>Deleted in azoospermia like</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>
<i>Ddx4</i>	<i>Dead-box helicase 4</i>
DEHP	<i>Di(2-ethylhexyl) phthalate</i>
<i>Dnd1</i>	<i>DND microRNA-mediated repression inhibitor 1</i>
<i>Dnmt3a</i>	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>
<i>Dnmt3b</i>	<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>
E(n)	Jour de développement embryonnaire (n)
E2	17 β -estradiol
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
<i>Egr2</i>	<i>Early growth response 2</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERK/MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
ES	<i>Ectoplasmic specialization</i>
<i>Etv5</i>	<i>Ets variant gene 5</i>
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
FGF5	<i>Fibroblast growth factor 5</i>
<i>Fkbp6</i>	<i>FK506 binding protein 6</i>
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>
FOXO	<i>Forkhead box protein O</i>
FXR/ NR1H4	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4</i>
<i>Gadd45β</i>	<i>Growth arrest and DNA damage inducible 45β</i>

<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
G6Pase	<i>Glucose 6-phosphatase</i>
<i>G9a/EHMT2</i>	<i>Euchromatic histone lysine methyltransferase 2</i>
GDNF	<i>Glial-cell-line-derived neurotrophic factor</i>
GFRA1	<i>Gdnf family receptor alpha-1</i>
HATs	<i>Histone acetyltransferases</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HNF4 α	<i>Hepatic nuclear factor 4 alpha HNF4α</i>
HNF4RE	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 α responsive element</i>
<i>Hsd3b2</i>	<i>3 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II</i>
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
ID4	<i>Inhibitor of differentiation 4</i>
IGF1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IGFBP-2	<i>Insulin-like growth factor binding protein 2</i>
<i>Inhba</i>	<i>Inhibin subunit beta A</i>
<i>Insl3</i>	<i>Insulin-like 3</i>
IRE	<i>Iron-responsive element</i>
kDa	Kilodalton
<i>Kit</i>	<i>Proto-oncogene C-Kit</i>
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
LBP	<i>Ligand binding pocket</i>
LC3	<i>MAP1BLC3 / Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha</i>

<i>Ldh</i>	<i>lactate déshydrogénase</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
<i>Lhx1</i>	<i>LIM homeobox 1</i>
LIF	<i>Leukaemia inhibitory factor</i>
LIN28A	<i>RNA-binding protein lin-28 homolog A</i>
<i>Mdm2</i>	<i>Double minute oncogene</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance mutation 1</i>
mFOXO1	FOXO1 murine
MRPS	<i>Multidrug resistance proteins</i>
<i>Nanos3</i>	<i>Nanos C2HC-type zinc finger 3</i>
Ngn3	<i>Neurogenin 3</i>
NOTCH	<i>Neurogenic locus notch homolog protein</i>
NR1I3	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3</i>
<i>Nxf2</i>	<i>Nuclear RNA export factor 2</i>
<i>Mael</i>	<i>Maelstrom spermatogenic transposon silencer</i>
MEHP	<i>Mono(2-éthylhexyl) phthalate</i>
MEK/MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MPTs	Modifications post-traductionnelles
NR1I3	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3</i>
NUT	<i>Nuclear protein in testis</i>
OATP	<i>Organic-anion-transporting polypeptides</i>
Oct4	Octamer-4
OMS	Organisation mondiale de la santé

OPR1	<i>12-Oxophytodienoate reductase 1</i>
<i>p21/Cdkn1a</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
P300	<i>E1A Binding Protein P300</i>
PA	<i>Plasminogen activator</i>
PARG	<i>Poly(ADP-ribose) glycohydrolase</i>
PARP1	<i>Poly(ADP-ribose) polymérase 1</i>
P(n)	Jours post natal (n)
PB	Phénobarbital
PBRE	<i>Phenobarbital response element</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PEs	Perturbateurs endocriniens
<i>Pem</i>	<i>Polymorphic epithelial mucin</i>
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PFAS	Substances per- et polyfluoroalkylées
PGCs	<i>Primordial germ cells</i>
PGC1	<i>PPARG coactivator 1 alpha</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-Kinase</i>
PLZF	<i>Promyelocytic leukemia zinc finger protein</i>
<i>Pnpla3</i>	<i>Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PP2A	<i>Phosphatase protein 2A</i>
PPP1R16A	<i>Membrane-associated subunit of protein phosphatase 1β</i>

PRDM14	<i>PR domain-containing protein-14</i>
PRM1/2	<i>Protamin 1/2</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PXR	<i>Pregnan X receptor</i>
RA	Acide rétinoïque
RACK1	<i>Receptor of activated C kinase 1</i>
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
<i>Rpl7</i>	<i>Ribosomal protein L7</i>
<i>Rps2</i>	<i>Ribosomal protein S2</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
<i>Sall4</i>	<i>SAL-like protein 4</i>
SIRT1	Sirtuine 1
SKP2	<i>S-phase kinase associated protein 2</i>
<i>SOD1/2</i>	<i>Superoxide Dismutase 1/2</i>
SOD3	<i>Superoxide dismutase 3</i>
<i>Sohlh1</i>	<i>Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1</i>
SOHLH2	<i>Spermatogenesis and Oogenesis specific basic helix-loop-helix 2</i>
Sox2	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
<i>Sox3</i>	<i>Sex determining region Y-box 3</i>
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase src</i>
SSCs	<i>Spermatogonial stem cells</i>
<i>Stella/Dppa3</i>	<i>Developmental pluripotency associated 3</i>

<i>Stra8</i>	<i>Stimulated by retinoic acid 8</i>
SF-1	<i>Steroidogenic factor-1</i>
SULT	<i>Sulphotransferases</i>
Tcfap2c	<i>Transcription factor ap2c</i>
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5 dichloropyridyloxy)]benzene
TET	<i>Ten-eleven translocation</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGR5	GPBAR1 / <i>G protein-coupled bile acid receptor 1</i>
<i>Thrsp</i>	<i>Thyroid hormone responsive</i>
TNP1/2	<i>Transition protein 1/2</i>
TOP2B	Topoisomérase II beta
TR	<i>Thyroid hormone receptor</i>
<i>Trim71</i>	<i>Tripartite motif containing 71</i>
<i>Tubb3</i>	<i>Tubulin beta 3 class III</i>
UGT	<i>Uridine diphosphate glucuronosyltransferase</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Table des matières

Table des matières

Introduction bibliographique.....
Avant-propos.....	1
Partie 1 : La physiologie testiculaire.....	3
A. Le développement embryonnaire et néonatal des cellules germinales	5
1. Des cellules germinales primordiales aux gonocytes.....	5
2. Des gonocytes aux spermatogonies.....	8
B. La niche des cellules germinales souches	13
1. Les cellules germinales	13
2. Les autres types cellulaires.....	15
i. Les cellules de Sertoli	15
ii. Les cellules de Leydig	15
iii. Les cellules myoïdes péritubulaires.....	17
C. La spermatogenèse : des spermatogonies aux spermatozoïdes	17
1. Le maintien de la niche des SSCs	17
2. Prolifération des spermatogonies	20
3. Différenciation des spermatogonies	24
4. Méiose	27
5. Spermiogenèse	29
i. Compaction de la chromatine.....	29
ii. Formation du corps résiduel	32
iii. Développement de l'acrosome	32
iv. Développement du flagelle.....	32
6. Spermiation	32
7. Maturation post-testiculaire.....	34
D. Atteintes testiculaires et facteurs environnementaux	35
1. Les polluants environnementaux et leurs modes d'action	36
i. Les perturbateurs endocriniens.....	36
ii. Les autres perturbateurs environnementaux	39

iii.	Les impacts du mode de vie sur la fertilité masculine.....	40
2.	L'impact de la dose, de la durée, de la fenêtre développementale d'exposition et de l'effet cocktail.....	41
Partie 2 :	Le récepteur nucléaire des xénobiotiques : CAR (NR1I3).....	44
A.	Généralités.....	44
B.	Isolement, caractérisation et structure du récepteur CAR.....	44
C.	Ligands et mécanismes d'action	46
1.	Activité constitutive	47
2.	Activation indirecte	47
3.	Activation directe	48
4.	Inactivation.....	49
D.	Rôles physiologiques.....	49
1.	Détoxification : xénobiotiques et endobiotiques	50
2.	Métabolisme des glucides	51
3.	Métabolisme des lipides	52
4.	Régulation d'hormones stéroïdiennes	53
5.	CAR et cancer	53
	Présentation du projet de recherche	54
	Résultats	57
	Article 1	58
A.	Introduction	58
B.	Discussion	60
1.	Les effets délétères de l'inhibition de la signalisation CAR observés sur la fonction de reproduction ont-ils une origine testiculaire et spécifique à la lignée germinale ?.....	61
2.	L'inhibition de la signalisation CAR et l'invalidation du gène <i>Car</i> altèrent la physiologie testiculaire avec des intensités différentes.....	64
3.	Quels sont les rôles de CAR dans l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées ?	66
4.	Comment la modulation néonatale et transitoire de la signalisation CAR peut-elle entrainer une infertilité à l'âge adulte ?.....	71

Article 2	74
A. Introduction	74
B. Discussion	77
1. Les effets délétères des traitements observés sur la physiologie testiculaire ont-ils une origine testiculaire ou systémique ?	77
2. Par quel(s) mécanisme(s) les modulations des voies de signalisation CAR et PXR peuvent-elles agir sur l'homéostasie de la lignée germinale et avoir pour certains paramètres des effets délétères additifs ou synergiques ?	79
3. Comment la signalisation CAR pourrait-elle médier certains effets délétères de la signalisation PXR ?	84
4. Comment expliquer le maintien à long terme d'altérations causées par un co-traitement transitoire et néonatale ?	86
5. Données extrapolables à l'homme ?	86
Discussion générale	88
Discussion générale.....	89
A. Quelle(s) implication(s) de la signalisation systémique dans notre étude ?.....	90
6. L'impact hépatique des acides biliaires sur la physiologie testiculaire	91
7. D'autres impacts systémiques envisagés sur la physiologie testiculaire.....	92
B. Quels sont les rôles des signalisations CAR et PXR au niveau testiculaire ?.....	94
8. L'impact de l'inhibition de la signalisation CAR sur les cellules germinales indifférenciées	94
9. Les impacts de l'activation des signalisations CAR et/ou PXR au niveau testiculaire	99
C. Les effets de la signalisation PXR au niveau testiculaire sont-ils dépendants de l'activité de la signalisation CAR ?	104
D. Les modulations précoces et néonatales des signalisations CAR et/ou PXR entraînent des conséquences qui semblent irréversibles	105
E. Conclusion.....	107
Références bibliographiques	110

Introduction bibliographique

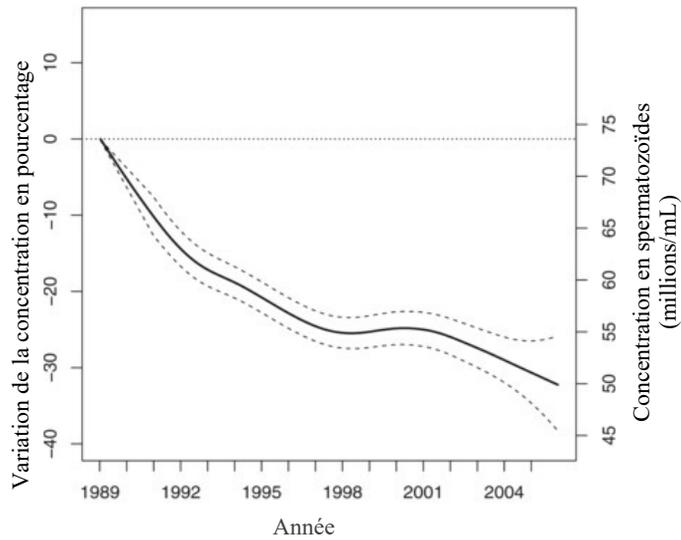


Figure 1 : Variation de la concentration en spermatozoïdes.

D'après Rolland et al., 2013

PMID: 23213178

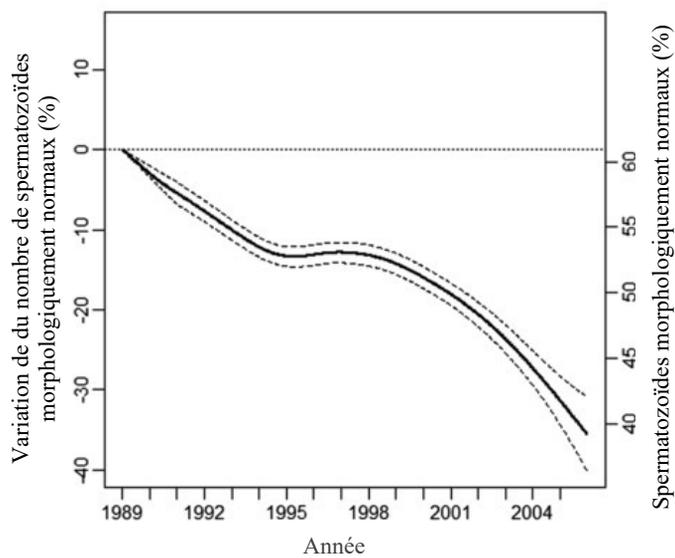


Figure 2 : Variation du nombre de spermatozoïdes morphologiquement normaux.

D'après Rolland et al., 2013

PMID: 23213178

Avant-propos

Depuis plusieurs décennies, de nombreux pays ont constaté une baisse de la fertilité. Aujourd'hui, près de 15% des couples à travers le monde rencontreraient des troubles de la fertilité (Boivin et al. 2007), (Datta et al. 2016). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), un couple est considéré comme infertile s'il présente l'incapacité d'obtenir une grossesse après douze mois de rapports réguliers non protégés en l'absence de contraception (Zegers-Hochschild et al. 2009).

A l'heure actuelle, le facteur masculin intervient dans 50% des cas identifiés d'infertilité du couple, et il en est le seul responsable dans 20% des cas (Lee et Foo 2014). De manière schématique, les origines physiopathologiques des infertilités masculines sont réparties en 2 catégories. Les anomalies d'origine excrétoire, qui peuvent être constitutionnelles (anomalie congénitale, défaut de développement) ou acquises à la suite d'infections (épididymite, prostatite), représentent environ 40% des cas d'infertilité masculine et définissent un défaut d'acheminement des spermatozoïdes dans les voies génitales. Les anomalies d'origine sécrétoire, qui peuvent être liées à un trouble central (défaut de libération des gonadotrophines LH/FSH (*Luteinizing hormone / Follicle-stimulating hormone*)) ou la conséquence d'atteintes fonctionnelles du testicule, représentent environ 60% des cas et décrivent une altération de la production des gamètes par la gonade mâle, le testicule (Slama et al. 2012). L'azoospermie fait partie des cas les plus sévères d'infertilité et elle est définie par l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Elle peut être d'origine sécrétoire ou excrétoire et touche plus de 20% des hommes stériles (Jarvi et al. 2015).

De manière générale, les atteintes testiculaires conduisant à des troubles de la fertilité sont en augmentation constante depuis plusieurs décennies. Elles sont associées à une diminution de la concentration en spermatozoïdes dans l'éjaculat mais également à une altération de la qualité des cellules germinales mâles (Rolland et al. 2013), (Virtanen, Jørgensen, et Toppari 2017), (Levine et al. 2017), (**Figures 1 et 2**). Ces atteintes mettent en cause de multiples facteurs : des facteurs génétiques comme des anomalies chromosomiques (exemple : syndrome de Klinefelter, présence d'un chromosome X surnuméraire) ou des mutations ou polymorphismes au niveau de gènes tels que ceux codant les protéines CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), AR (*Androgen Receptor ; NR3C4*) ou SF-1 (*Steroidogenic Factor-1 ; NR5A1*), (Ferlin et al. 2019) mais aussi des facteurs comportementaux et environnementaux (Bisconti et al. 2021). En effet, les impacts délétères

sur la spermatogenèse de l'alimentation et du tabagisme (Sermondade et al. 2013), (Omolaoye et al. 2021) ainsi que ceux de nombreuses molécules environnementales comme certains pesticides (Neubert 1988), (Tirpák et al. 2021) sont déjà bien décrits. Cependant les mécanismes moléculaires conduisant à ces altérations ne sont pas toujours identifiés et 30% à 50% des causes d'infertilité demeurent inexplicables (Agarwal et al. 2021).

Les individus et les couples ont le droit de décider du nombre d'enfants qu'ils souhaitent, du moment auquel les avoir et de l'écart entre eux. Or, l'infertilité peut empêcher la concrétisation de ces droits humains essentiels. Elle représente donc un enjeu majeur de santé publique puisqu'elle touche des millions de personnes en âge de procréer à travers le monde. Une meilleure compréhension des signalisations associées aux molécules environnementales et de leurs liens avec les physiopathologies testiculaires est essentielle afin d'identifier de nouvelles causes d'infertilité. Aujourd'hui, de plus en plus d'études mettent en évidence de nouveaux acteurs capables d'impacter la physiologie testiculaire, augmentant les risques d'hypofertilité.

Depuis 2014, notre équipe de recherche a identifié de multiples impacts de la signalisation des acides biliaires sur la fertilité des souris mâles (Baptissart et al. 2014), (Vega et al. 2015), (Sèdes et al. 2017), (Baptissart et al. 2018). Ces travaux révèlent que les acides biliaires peuvent être acheminés jusqu'au testicule par la circulation sanguine et impacter notamment la lignée germinale. Nous avons également montré que le testicule lui-même est capable de synthétiser des acides biliaires (Martinot et al. 2017). L'altération de la biosynthèse des acides biliaires testiculaires peut entraîner l'accumulation de métabolites intermédiaires, dont certains ont été identifiés comme agonistes inverses du récepteur nucléaire CAR (*Constitutive Androstane Receptor, NR1i3*), conduisant alors à des troubles de la fertilité chez la souris (Martinot et al. 2017). Ces découvertes ont permis d'identifier la signalisation du récepteur CAR comme fonctionnelle dans le testicule de souris à l'âge adulte.

L'ensemble de ces données révèle un rôle du récepteur CAR dans le contrôle de l'homéostasie testiculaire. De plus, les liens entre les expositions aux xénobiotiques et les troubles de la fertilité, ainsi que l'implication de CAR dans la réponse aux xénobiotiques soulèvent des interrogations quant à son intervention dans le développement de pathologies testiculaires en lien avec l'infertilité, notamment dans un contexte d'expositions environnementales ou d'altérations métaboliques.

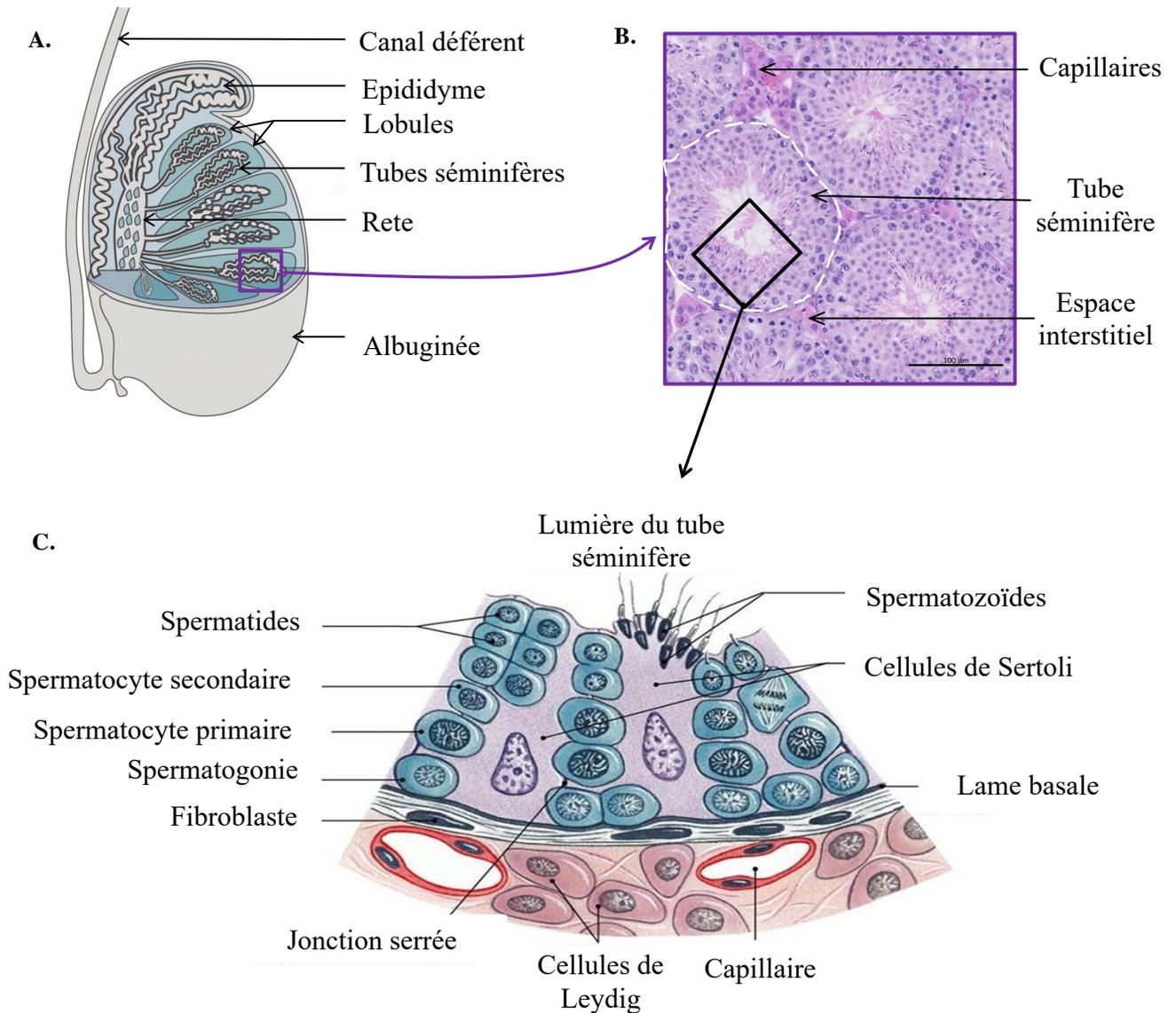


Figure 3 : Le testicule.

A. Représentation schématique du testicule. *Modifié d'après Inserm (<https://edutheque.inserm.fr/ressources/schema-de-testicule-et-tube-seminifere>).*

B. Coloration Hématoxyline/Eosine d'une coupe transversale de testicule de souris adulte.

C. Représentation schématique du tube séminifère. *Modifié d'après Fundamentals of Anatomy & Physiology 9th Edition.*

Partie 1 : La physiologie testiculaire

La gonade mâle ou testicule est une glande paire et symétrique de l'appareil génital mâle, siège de la production des gamètes. Appendus au cordon spermatique, les testicules sont logés dans une structure extra abdominale : le scrotum. Cette localisation anatomique permet leur maintien à une température de 4 à 7°C inférieure à celle du corps, favorable à la production de spermatozoïdes viables (Zorgniotti et Sealfon 1988). Le testicule est une glande endocrine qui forme une masse ovoïde unique entourée d'une capsule conjonctive, l'albuginée. Composée de fibres de collagène et de cellules musculaires lisses, cette capsule s'enfonce dans le testicule pour former environ 300 lobules testiculaires. Chacun d'eux est composé d'un réseau de 15 à 40 tubes séminifères, séparés entre eux par l'espace interstitiel (**Figure 3**).

Les tubes séminifères et l'espace interstitiel permettent chez l'adulte l'établissement et le maintien des deux fonctions majeures du testicule, dont les efficacités reposent sur les actions spécifiques des différents types cellulaires qui les composent et de leurs interactions. Ainsi, la fonction endocrine est assurée en partie au sein de l'espace interstitiel par les cellules de Leydig qui synthétisent des stéroïdes sexuels, essentiellement sous la forme de testostérone, en réponse à la LH sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'espace interstitiel est également constitué de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ils permettent le passage de nutriments (fer, vitamines A et E), d'hormones (LH, FSH, insuline) et de facteurs de croissance (EGF, *Epidermal Growth Factor*) nécessaires à la gamétogenèse (Shiraishi et Matsuyama 2012). Des cellules immunitaires, principalement des macrophages, sont également retrouvées au sein de l'espace interstitiel. La fonction exocrine quant à elle permet la production des gamètes mâles, les spermatozoïdes, au sein des tubes séminifères. Dans ce compartiment tubulaire, les cellules de Sertoli apportent un soutien structural et nutritif aux cellules germinales en différenciation, indispensable au développement des gamètes (Griswold 1998), (**Figure 4**).

La spermatogenèse est le processus de formation des spermatozoïdes (**Figure 4**). Elle débute à la puberté chez les mammifères et est maintenue tout au long de la vie de l'individu, mais le nombre et la qualité des gamètes diminuent naturellement avec le vieillissement (Almeida et al. 2017). Chez la souris, il faut environ 35 jours pour qu'une cellule germinale indifférenciée donne naissance à des spermatozoïdes, et 74 jours chez l'homme. Ce processus de production des gamètes mâles est subdivisé en plusieurs étapes ayant chacune une durée précise. Les cellules germinales souches ou SSCs (*Spermatogonial Stem Cells*) permettent l'initiation de la spermatogenèse. Les SSCs débutent leur processus de prolifération à partir de

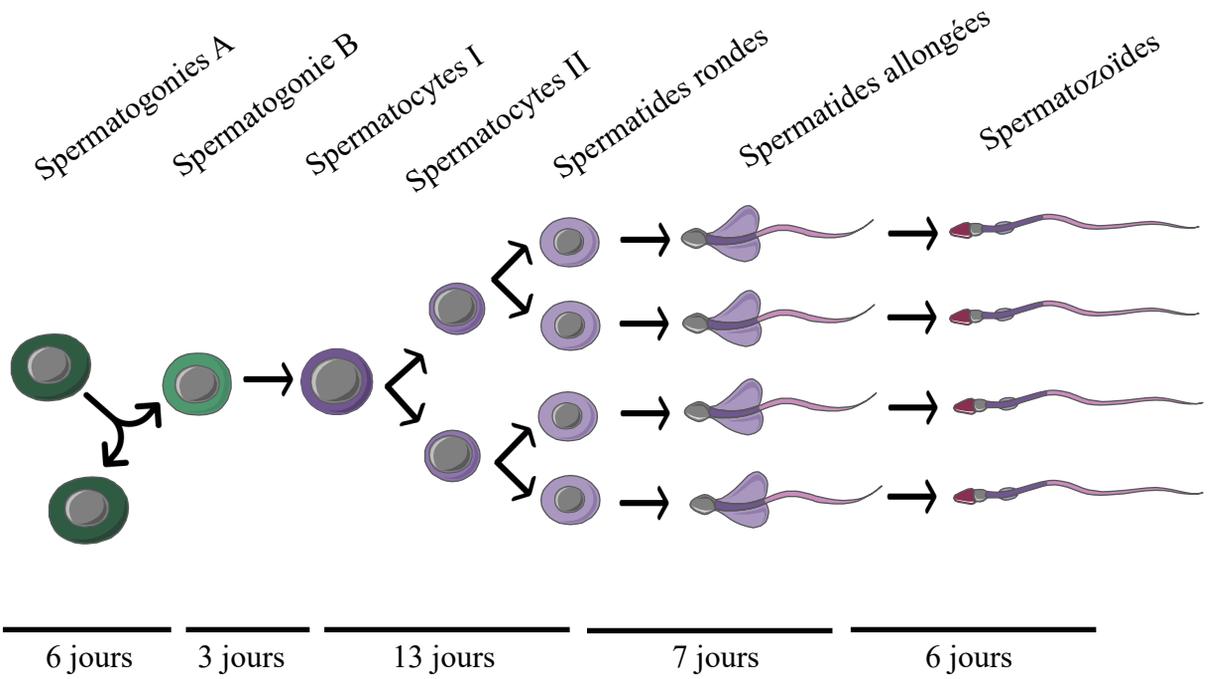


Figure 4 : La spermatogénèse chez la souris.

Les différentes étapes de la spermatogénèse et leur durée chez la souris.

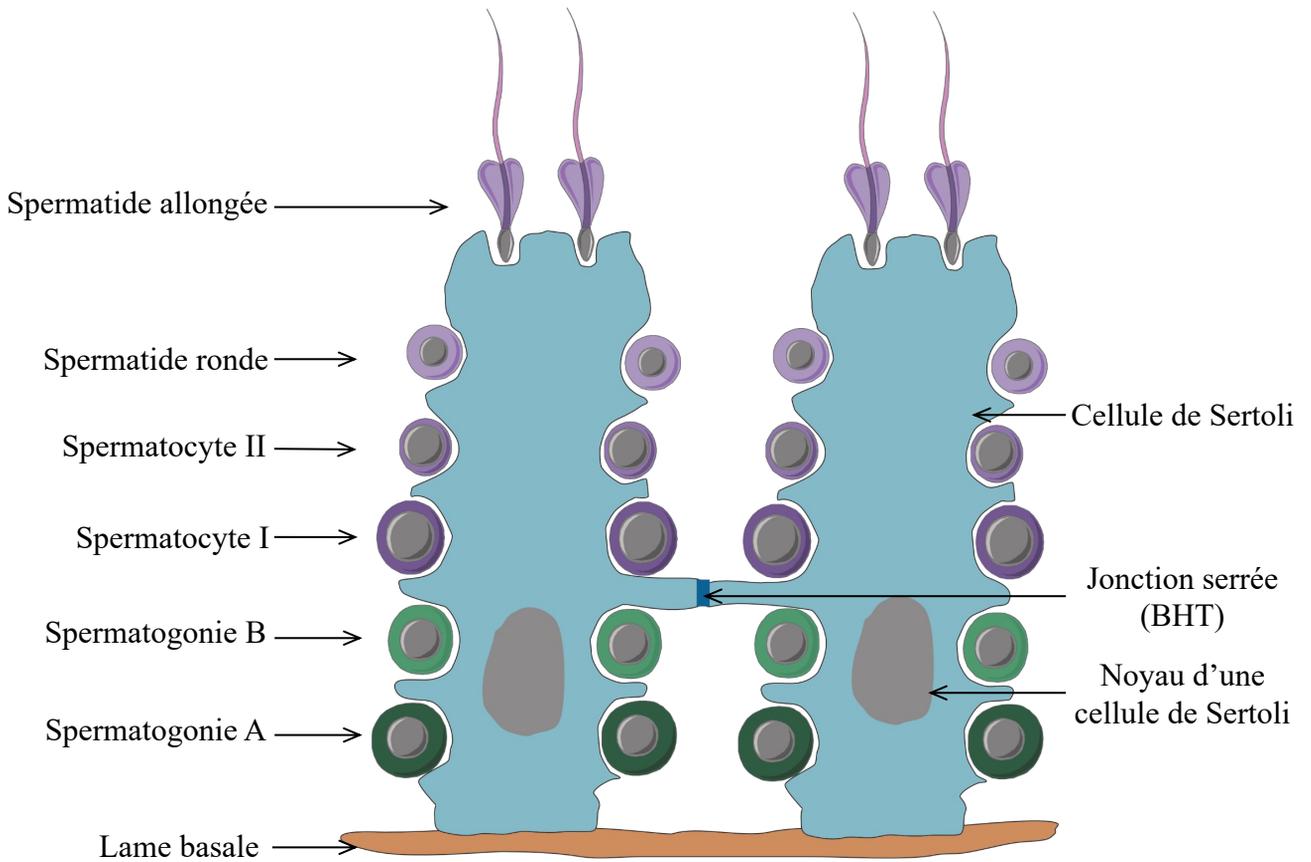


Figure 5 : Morphologie des cellules de Sertoli et formation de la barrière hémato-testiculaire (BHT).

la maturité sexuelle (ou puberté chez l'homme) et s'auto-renouvellent tout au long de la vie de l'individu permettant ainsi le maintien de la spermatogenèse. Cette population de SSCs donnera naissance aux spermatogonies qui se différencieront progressivement en spermatocytes, puis en spermatides et deviendront finalement des spermatozoïdes qui seront relargués dans la lumière des tubes séminifères.

A l'âge adulte, l'épithélium des tubes séminifères est entouré par une lame basale et est dit stratifié, puisqu'il est composé de cellules germinales à différents stades de différenciation et de cellules de Sertoli polarisées. Ces dernières possèdent un cytosquelette très développé qui permet la formation de nombreuses jonctions intercellulaires. Ces jonctions assurent la cohésion de l'épithélium séminifère et permettent d'entretenir un contact étroit avec les cellules germinales, permettant ainsi la progression des cellules germinales au sein de l'épithélium (Mruk et Cheng 2004). Une cellule de Sertoli est capable de soutenir jusqu'à 40 cellules germinales (Weber et al. 1983) ; de plus chaque cellule de Sertoli est en contact avec en moyenne 5 autres cellules de Sertoli, formant ainsi la barrière hémato-testiculaire (BHT), localisée au niveau du tiers inférieur du tube séminifère (**Figure 5**). La BHT divise l'épithélium séminifère en compartiments basal et apical, limitant le contact entre les cellules germinales post-méiotiques et le système immunitaire et créant un microenvironnement favorable aux cellules germinales. Lors de la maturation sexuelle, des signaux androgéniques, rétinoides et thyroïdiens vont permettre l'établissement de la BHT (De Gendt et Verhoeven 2012), (Sharpe et al. 2003), (Tarulli, Stanton, et Meachem 2012). Les spermatogonies en prolifération et les spermatocytes primaires pré-leptotènes (cellules germinales en différenciation plus avancée que les spermatogonies, décrites plus tard dans la partie C « La spermatogenèse ») se situent dans la partie basale de l'épithélium. A l'inverse, les cellules germinales en différenciation encore plus avancée se trouvent dans le compartiment apical (Dym et Cavicchia 1978). La BHT joue un rôle essentiel pour la fertilité. En effet, puisque les tubes séminifères ne sont pas traversés par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, elle permet le passage des molécules essentielles jusqu'aux cellules germinales (sucres, acides aminés, hormones, électrolytes) et de restreindre le passage de composés chimiques étrangers potentiellement toxiques (Miller et Cherrington 2018), (Okumura, Lee, et Dixon 1975). Les cellules de Sertoli produisent et sécrètent des molécules indispensables au développement normal des cellules germinales tels que des métabolites (lactate et pyruvate), des protéines (transferrine, céruloplasmine), des facteurs de croissances (TGF- β , *Transforming Growth Factor Beta* et IGF-1, *Insulin-Like Growth Factor-1*) et des hormones (l'inhibine et l'activine, (Jégou 1995). L'inhibine est impliquée dans le

rétrocontrôle de la sécrétion de FSH lors du développement post-natal et potentialise l'effet de la LH sur la production d'androgènes. L'activine, à l'inverse, augmente la sécrétion basale de FSH par l'hypophyse et réprime la biosynthèse d'androgènes par les cellules de Leydig *via* la modulation de la sensibilité à la LH (Hsueh et al. 1987), (Lin et al. 1989), (Ying 1988). Les cellules de Sertoli produisent également le fluide séminifère. Ce fluide aux propriétés physico-chimiques particulières permet, avec l'aide de cellules musculaires lisses (les cellules myoïdes périvitubulaires), la progression des spermatozoïdes testiculaires dans la lumière des tubes séminifères (Rato et al. 2010), (Russell, Bartke, et Goh 1989). Les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes périvitubulaires sécrètent également du collagène et de la laminine, des composants de la matrice extracellulaire indispensables au développement des cellules germinales (Skinner, Tung, et Fritz 1985).

Il est important de noter que les compartiments testiculaires et les types cellulaires qui les constituent sont étroitement liés au niveau fonctionnel. En effet, des interactions faisant intervenir de multiples acteurs endocriniens, paracrines, autocrines et juxtacrines régissent les dialogues entre les cellules myoïdes périvitubulaires, les macrophages, les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

Mes travaux de thèse se sont orientés particulièrement vers la lignée germinale, qui sera donc au cœur de cette partie introductive.

A. Le développement embryonnaire et néonatal des cellules germinales

1. Des cellules germinales primordiales aux gonocytes

L'établissement de la lignée germinale débute au stade embryonnaire chez la souris. Les cellules germinales primordiales (PGCs, *Primordial germ cells*) sont les précurseurs de la lignée germinale chez de nombreux mammifères (Saitou et Yamaji 2010). Les cellules progénitrices des PGCs sont au nombre de 6 entre 5,25 et 6,25 jours de développement embryonnaire (E5.25–6.25) et proviennent de l'épiblaste, un tissu extra-embryonnaire source de cellules souches pluripotentes. Ces progéniteurs expriment des facteurs de transcription (tels que BLIMP1, *B lymphocyte-induced maturation protein-1* et PRDM14, *PR domain-containing protein-14*) régulant l'expression de marqueurs de pluripotence. Ohinata *et al.* ont démontré que BLIMP1 est un régulateur essentiel de la spécification des PGCs. En effet, l'inactivation du gène *Blimp1* chez la souris entraîne une diminution du nombre de PGCs, la formation d'agrégats aberrants de PGCs et altère leur migration à travers l'endoderme de la paroi

intestinale. Ces observations sont associées à une altération du profil transcriptionnel des cellules, qui sont alors incapables de réprimer l'expression de gènes somatiques. En effet, les cellules BLIMP1+ sont destinées à devenir des cellules germinales alors que les cellules BLIMP1- deviennent des cellules somatiques (Ohinata et al. 2005). De plus, en l'absence de PRDM14, des PGCs-like sont formées dans l'embryon mais présentent des altérations de l'expression de gènes de pluripotence clés tels que *Stella/Dppa3* (*Developmental Pluripotency Associated 3*), *Tcfap2c* (*Transcription factor ap2c*), *Nanos3* (*Nanos C2HC-Type Zinc Finger 3*) et *Dnd1* (*DND MicroRNA-Mediated Repression Inhibitor 1*), (Grabole et al. 2013). Leur capacité de prolifération est diminuée et elles sont incapables de se différencier complètement en PGCs, entraînant alors la stérilité des souris (Yamaji et al. 2008). Ces facteurs de transcription sont également essentiels pour réguler l'expression du gène *Sox2* (*Sex determining region Y-bOX 2*), un autre gène de pluripotence (Avilion et al. 2003), et pour la reprogrammation transcriptionnelle des cellules progénitrices, qui conduira à leur entrée dans le processus de différenciation afin d'acquérir des caractéristiques propres aux PGCs (pluripotence, migration, colonisation, prolifération), (Yamaji et al. 2008).

A partir de 7,2 jours de développement embryonnaire (E7.2), les PGCs sont identifiables dans les tissus extra-embryonnaires. Puis entre les jours E8 et E9, elles sont intégrées de manière passive à l'endoderme de la paroi intestinale. Entre les jours E9 et E12, les PGCs prolifèrent et migrent activement vers les ébauches gonadiques où elles formeront, en collaboration avec les cellules de Sertoli, l'épithélium des tubes séminifères (Tam et Snow 1981), (Saitou et Yamaji 2010). Les cellules somatiques testiculaires se différencient à partir de la crête génitale et forment donc la structure d'accueil des PGCs. Pendant ces phases de migration et de prolifération, certaines PGCs seront éliminées. En effet, le développement des PGCs revêt différents aspects, tels que la spécification, la migration, la prolifération mais également la mort cellulaire par apoptose. Les PGCs vont également subir une reprogrammation épigénétique importante comportant un effacement global de la méthylation ADN (Acide DésoxyriboNucléique), suivi d'une nouvelle vague de méthylation de l'ADN. Ce processus débute donc par une déméthylation quasiment globale de l'ADN des PGCs. Autour du jour E7, les PGCs présentent un taux de méthylation au niveau des îlots CpG d'environ 70%. Après le stade E9.5, ce taux de méthylation est réduit à 30% pour atteindre environ 10% à E11.5. Les PGCs subissent deux phases de déméthylation : une première vague globale au cours de leur migration, puis une seconde lors de leur entrée dans les gonades (Seisenberger et al. 2012). Plusieurs études suggèrent que la déméthylation des PGCs a une composante passive

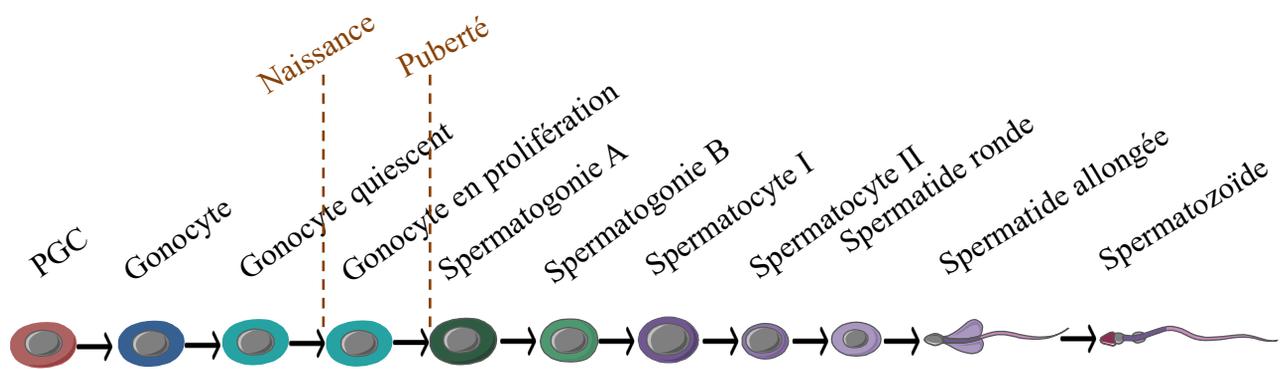


Figure 6 : Développement des cellules germinales mâles chez la souris.

Les PGCs se multiplient et vont se différencier en gonocytes pendant la période embryonnaire. Puis les gonocytes s'amplifient par mitoses avant d'entrer dans une phase de quiescence, ils resteront bloqués en phase G1. Deux à trois jours après la naissance, les gonocytes reprennent leur activité mitotique et vont ensuite se différencier en cellules germinales souches : les spermatogonies A single. Celles-ci donneront ensuite les spermatogonies B, les spermatocytes et les spermatides et *in fine* les spermatozoïdes.

(Seisenberger et al. 2012), (Kagiwada et al. 2013) puisque l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de la méthylation tels que *Dnmt3a* (*DNA methyltransferase 3 alpha*), *Dnmt3b* (*DNA methyltransferase 3 beta*) et *G9a/Ehmt2* (*Euchromatic histone lysine methyltransferase 2*) est réprimée. D'autres études suggèrent que ce processus est actif et implique des enzymes de déméthylation exprimées dans les PGCs telles que TET1 et TET2 (*Tet methylcytosine dioxygenase 1 et 2*), (Hajkova et al. 2010), (Hackett et al. 2013).

Si certains émettent l'hypothèse que cette reprogrammation épigénétique est nécessaire pour établir la pluripotence des cellules germinales (les PGCs sont issues de cellules précurseurs somatiques), (Surani, Hayashi, et Hajkova 2007), d'autres études ont montré que la déméthylation globale ainsi que la méthylation *de novo* ne sont pas corrélées à un changement particulier du profil transcriptionnel des PGCs (Seisenberger et al. 2012).

Au stade E12.5, les 10 000 cellules germinales présentes dans chaque gonade diffèrent morphologiquement des PGCs qui se sont différenciées en gonocytes (Clermont et Perey 1957) (**Figure 6**). C'est à partir de ce stade qu'à lieu la méthylation *de novo* de l'ADN au niveau des îlots CpGs dans les gonocytes. Bien que certains gonocytes entrent en apoptose au jour E13 (Wang, Nakane, et Koji 1998), ces cellules vont proliférer pendant quelques jours et entrer en phase quiescente entre les jours embryonnaires E14 et E16, puis demeurer dans cette phase jusqu'au démarrage de la spermatogenèse, peu de temps après la naissance chez la souris (Vergouwen et al. 1991). La phase de quiescence des gonocytes est dépendante de la signalisation NOTCH (*Neurogenic locus notch homolog protein*) ; une activation constitutive de NOTCH dans les cellules de Sertoli entraîne une sortie de quiescence des gonocytes et une différenciation précoce (Garcia et Hofmann 2013).

L'expression de nombreux gènes est indispensable à l'homéostasie des gonocytes et donc à la fertilité. Le gène *Bcl-x* (*B-cell lymphoma-extra large*), codant une protéine anti-apoptotique, est exprimé dans les PGCs et dans les gonocytes. L'inactivation totale de ce gène chez la souris entraîne la mort des animaux autour de E13. L'inactivation hétérozygote de ce gène a permis de révéler de sévères défauts dans la lignée germinale au cours du développement. En effet, au stade E13.5, une augmentation importante de l'apoptose des gonocytes est observée, entraînant une hypoplasie postnatale testiculaire ainsi qu'une hypofertilité (Kasai et al. 2003). De plus, les souris invalidées pour le gène *Lin28a* codant la protéine LIN28A (*RNA-binding protein lin-28 homolog A*) présentent au jour E13.5 une diminution de la prolifération des gonocytes affectant ainsi fortement leur nombre (Shinoda et

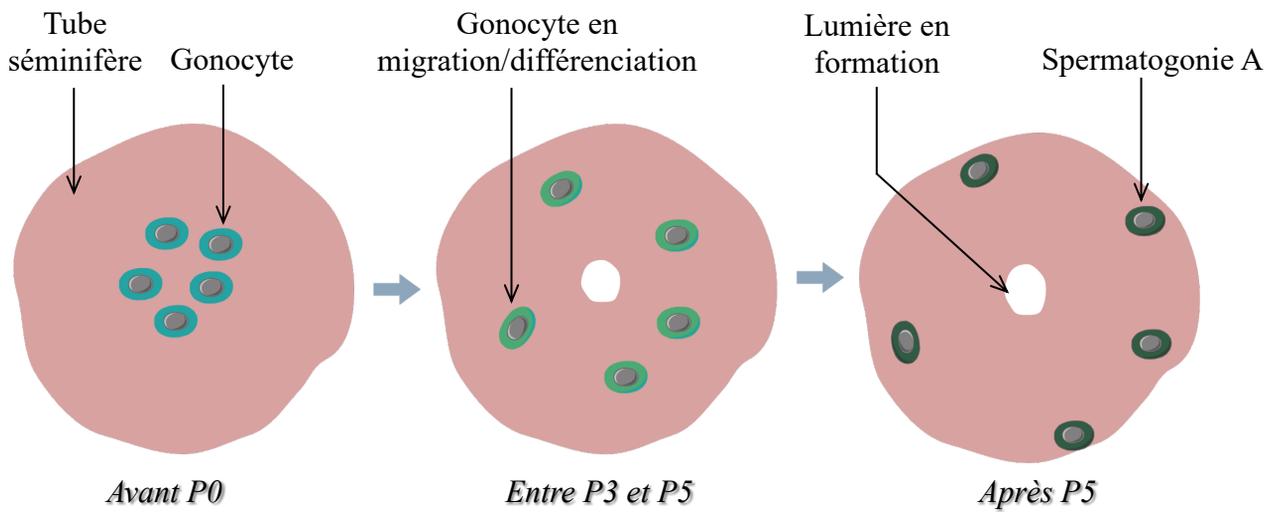


Figure 7 : Transition des gonocytes en spermatogonies.

Avant la naissance (P0), les gonocytes se trouvent au centre des tubes séminifères. Puis autour des jours P3 et P5, ils commencent leur transition (migration et différenciation) en spermatogonies ; on peut alors observer la formation de la lumière du tube séminifère. Après P5, tous les gonocytes se sont différenciés en spermatogonie A, qui se trouvent dès lors à la périphérie du tube séminifère.

al. 2013). La prolifération des gonocytes est également dépendante de la signalisation de l'acide rétinoïque (RA), un métabolite de la vitamine A. En effet, une étude suggère qu'entre les jours E11.5 et E15 les RAs stimulent à la fois la prolifération et l'apoptose des gonocytes, suggérant leurs implications dans un processus physiologique permettant d'éliminer les cellules présentant des altérations (Trautmann et al. 2008).

2. Des gonocytes aux spermatogonies

Chez la souris, de 2 à 3 jours après la naissance, les gonocytes sortent de leur phase de quiescence et reprennent leur prolifération. A ce stade, leur prolifération dépend de plusieurs acteurs tels que le facteur de croissance PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), l'hormone 17 β -estradiol (E2), la cytokine LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) et les RAs (De Miguel et al. 1996), (Li et al. 1997), (Zhou et al. 2008). Les gonocytes, qui se trouvent initialement au centre des tubes séminifères, vont migrer au niveau de la membrane basale, permettant la naissance de la lumière des tubes séminifères (**Figure 7**). En parallèle de leur prolifération et de leur migration, les gonocytes se différencient en cellules germinales souches (SSCs / spermatogonies Asingle). La transition des gonocytes en SSCs nécessite un remodelage morphologique progressif : les gonocytes sont de grandes cellules sphériques avec un gros noyau, alors que les spermatogonies sont des cellules de forme ovale avec un noyau plus petit (Drumond, Meistrich, et Chiarini-Garcia 2011). Lors de cette transition, en parallèle de la relocalisation des cellules du centre vers la périphérie des tubes, les gonocytes commencent également à exprimer différents marqueurs propres aux spermatogonies souches tels que GFRA1 (*Gdnf Family Receptor Alpha-1*), ID4 (*Inhibitor Of Differentiation 4*) ou PLZF (*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger protein*), (Manku et Culty 2015). GFRA1 est un récepteur pour le facteur de croissance GDNF (*Glial Cell Derived Neurotrophic Factor*) ; cette signalisation est nécessaire à la prolifération et au maintien de l'état indifférencié des cellules germinales souches (Sharma et Braun 2018). ID4 et PLZF sont des répresseurs transcriptionnels, leur expression est régulée positivement par la signalisation GDNF/GFRA1 ; ils sont indispensables pour le maintien de l'état indifférencié des cellules germinales et donc nécessaires pour maintenir le pool de SSCs (Sun et al. 2015), (Costoya et al. 2004).

A ce stade, certains gonocytes ne migreront pas et seront éliminés de l'épithélium séminifère par apoptose (Roosen-Runge et Leik 1968). La transition des gonocytes vers les spermatogonies est finement régulée par de nombreux acteurs essentiels à la différenciation et à la migration des cellules germinales, mais aussi à la formation du pool de cellules germinales

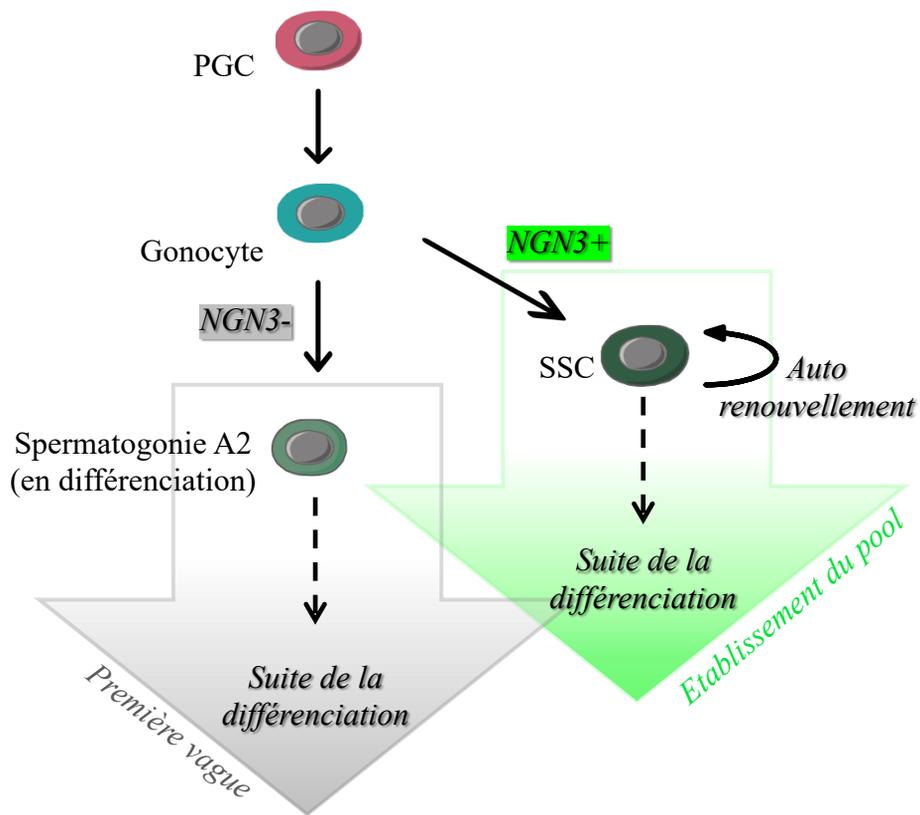


Figure 8 : Différenciation des gonocytes NGN3+ versus NGN3-.

Les gonocytes qui expriment le facteur NGN3 vont se différencier en SSCs et permettent le maintien de la lignée germinale. Les gonocytes qui n'expriment pas NGN3 se différencient directement en spermatogonies de type A2, permettant l'initiation de la première vague de la spermatogenèse.

souches. En effet, les spermatogonies issues de cette transition donneront naissance à la première vague de spermatogenèse et seront également à l'origine du pool de SSCs, permettant le maintien de la spermatogenèse tout au long de la vie post-pubertaire (Kluin et de Rooij 1981). Il faut noter que la population des gonocytes est hétérogène : la portion de gonocytes qui exprime le gène *Neurogenin 3* (*Ngn3*) se différencieront pour former la population fondatrice des SSCs, entre 3 à 6 jours après la naissance chez la souris, permettant de maintenir la spermatogenèse. A l'inverse, les gonocytes n'exprimant pas le facteur de transcription NGN3 se différencient directement en spermatogonies de type A2 autour du jour postnatal 3 (P3), initiant ainsi la première vague de la spermatogenèse supportée notamment par les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli (Yoshida et al. 2006), (**Figure 8**). Ces données impliquent que certains gonocytes se différencient en spermatogonies de type A1 avant leur première division. Il est important de noter que cette hétérogénéité des gonocytes a été observée uniquement chez la souris. La différenciation des gonocytes dépend également de la signalisation des RAs. Ces derniers permettent la réplication de l'ADN des gonocytes ainsi que leur différenciation en spermatogonies (Zhou et al. 2008). Par ailleurs, la protéine NANOS2 (*Nanos C2HC-Type Zinc Finger 2*) qui interagit avec l'ARN est un facteur clé de la transition des gonocytes en spermatogonies. La surexpression du gène codant cette protéine entraîne un retard de transition, via l'inhibition de l'expression des gènes *Gfra1* et *Plzf*. En revanche, l'inactivation de *Nanos2* conduit à la surexpression de ces mêmes gènes, conduisant à une transition précoce des gonocytes en spermatogonies. Les souris invalidées pour le gène *Nanos2* sont stériles à l'âge adulte et ne présentent pas de lignée germinale. Le gène *Nanos2* est donc indispensable pour le maintien de la population des SSCs, et son invalidation chez la souris conduit à la stérilité des mâles (Sada et al. 2009), (Cicarelli et al. 2020).

De manière intéressante, la protéine FOXO1, membre de la famille *Forkhead box protein O* (FOXO), semble impliquée dans cette étape clé de différenciation des gonocytes en spermatogonies. Chez la souris, l'inactivation conditionnelle du gène *Foxo1* par le système *Vasa-cre* (ou *Ddx4-cre*) entre les stades E15 et E18 n'a pas d'impact sur le nombre de gonocytes à 1 jour post natal (P1). Cependant, une diminution du nombre de spermatogonies est observée 7 jours après la naissance, suggérant une altération du processus de prolifération des cellules germinales, qui intervient normalement à cette période. Ce défaut n'a pas été corrélé à une augmentation de la mort cellulaire (Goertz et al. 2011). Pourtant, certains tubes séminifères ne présentent aucune cellule germinale, ce qui implique un défaut dans l'auto-renouvellement des SSCs (Buaas et al. 2004). Dans cette même étude, l'immunomarquage *in vivo* de la protéine

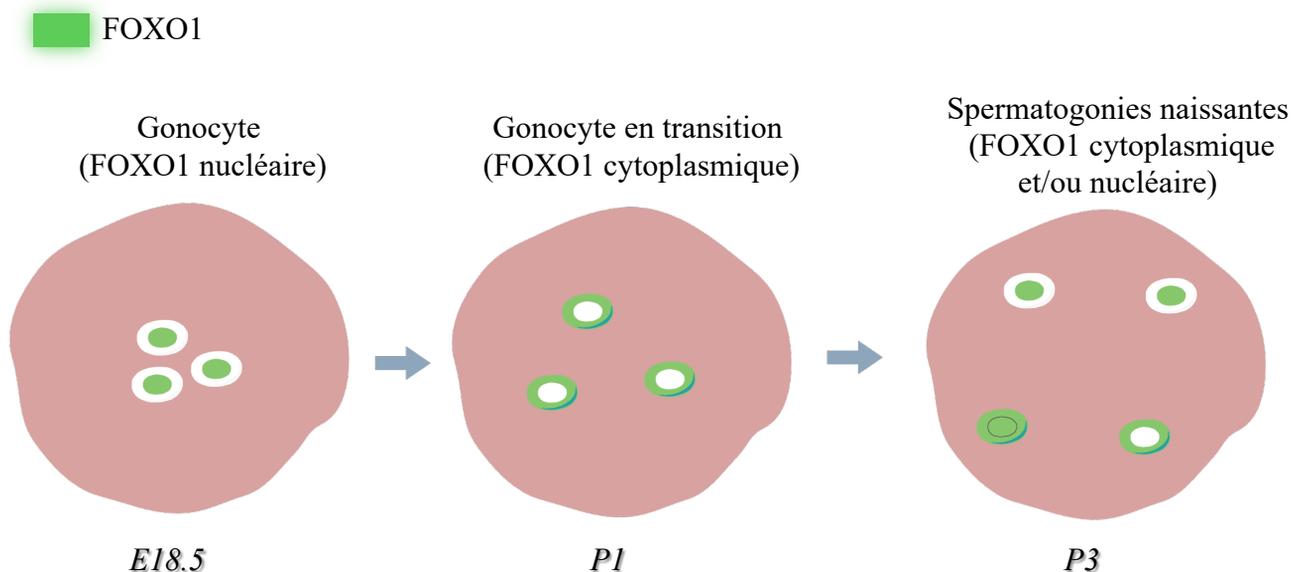


Figure 9 : Localisation de FOXO1 au cours de la transition des gonocytes en spermatogonies.

Autour du jour embryonnaire E18.5, la protéine FOXO1 est localisée dans le compartiment nucléaire des gonocytes. Puis à P1, FOXO1 va transloquer dans le compartiment cytoplasmique. A P3, la protéine FOXO1 va à nouveau transloquer dans le compartiment nucléaire, toutefois de manière hétérogène entre les différentes spermatogonies naissantes. Ces événements de translocation de la protéine FOXO1 coïncide avec la transition des gonocytes en spermatogonies.

FOXO1 a permis de révéler son expression dans les gonocytes entre les jours postnataux P1 et P3 chez la souris. A P21, l'expression de FOXO1 est confinée aux cellules basales intratubulaires, les spermatogonies. La protéine FOXO1 est indétectable dans les cellules somatiques testiculaires, de la période néonatale jusqu'à l'âge adulte.

De plus, au cours du développement normal, FOXO1 transloque entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique des cellules germinales. En effet, aux alentours du jour embryonnaire E17.5 la protéine FOXO1 est nucléaire, puis à P1, la protéine devient exclusivement cytoplasmique (Pui et Saga 2017), (**Figure 9**). Une étude a montré que l'inactivation du gène *Nanos2* chez la souris perturbe cette translocation. En effet à E16.5, la majorité des gonocytes provenant des individus invalidés pour le gène *Nanos2* (*Nanos2*^{-/-}) présentent une localisation cytoplasmique ou bien cytoplasmique et nucléaire de FOXO1, alors que la protéine devrait être exclusivement nucléaire (Pui et Saga 2018). Ces données suggèrent que les altérations de la signalisation FOXO1 pourraient être impliquées dans le phénotype de stérilité observé chez les individus *Nanos2*^{-/-}.

A P3, une nouvelle translocation nucléaire va débiter pour ensuite s'amplifier autour de P7 (**Figure 9**). Cette transition n'est cependant pas parfaitement synchronisée. Entre P3 et P7, certains gonocytes expriment *Foxo1* dans le cytoplasme, et d'autres dans le noyau. Tout au long de cette translocation cytoplasmique-nucléaire, l'augmentation continue de l'expression de *Kit* (*Proto-oncogene C-Kit*) est également observée. Bien que *Kit* et *Foxo1* soient respectivement exprimés dans les spermatogonies différenciées et indifférenciées, il apparaît que FOXO1 régule l'expression de *Kit* dans les cellules germinales progénitrices via un mécanisme d'action encore inconnu (Goertz et al. 2011).

Le facteur de transcription FOXO1 intervient dans la régulation de nombreux processus cellulaires et physiologiques notamment l'apoptose (régulation de l'expression du gène *Gadd45beta*), l'autophagie (interaction avec ATG7, *Autophagy related 7*), la défense contre les agents anti-oxydants (régulation de l'expression des gènes *Sod1/2*, *Superoxide dismutase 1/2*), la régulation du cycle cellulaire (régulation de l'expression du gène *p21/Cdkn1a*, *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*), la régulation du métabolisme (régulation de l'expression du gène *G6pc*, *Glucose-6-phosphatase*) et du développement (*Tex19.1*, *Chd1* (*Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1*)), (Ju et al. 2014), (Zhao et al. 2010), (Goto et Takano 2009), (Yuan et al. 2014), (Gross, van den Heuvel, et Birnbaum 2008), (Cabrera-Ortega et al. 2017).

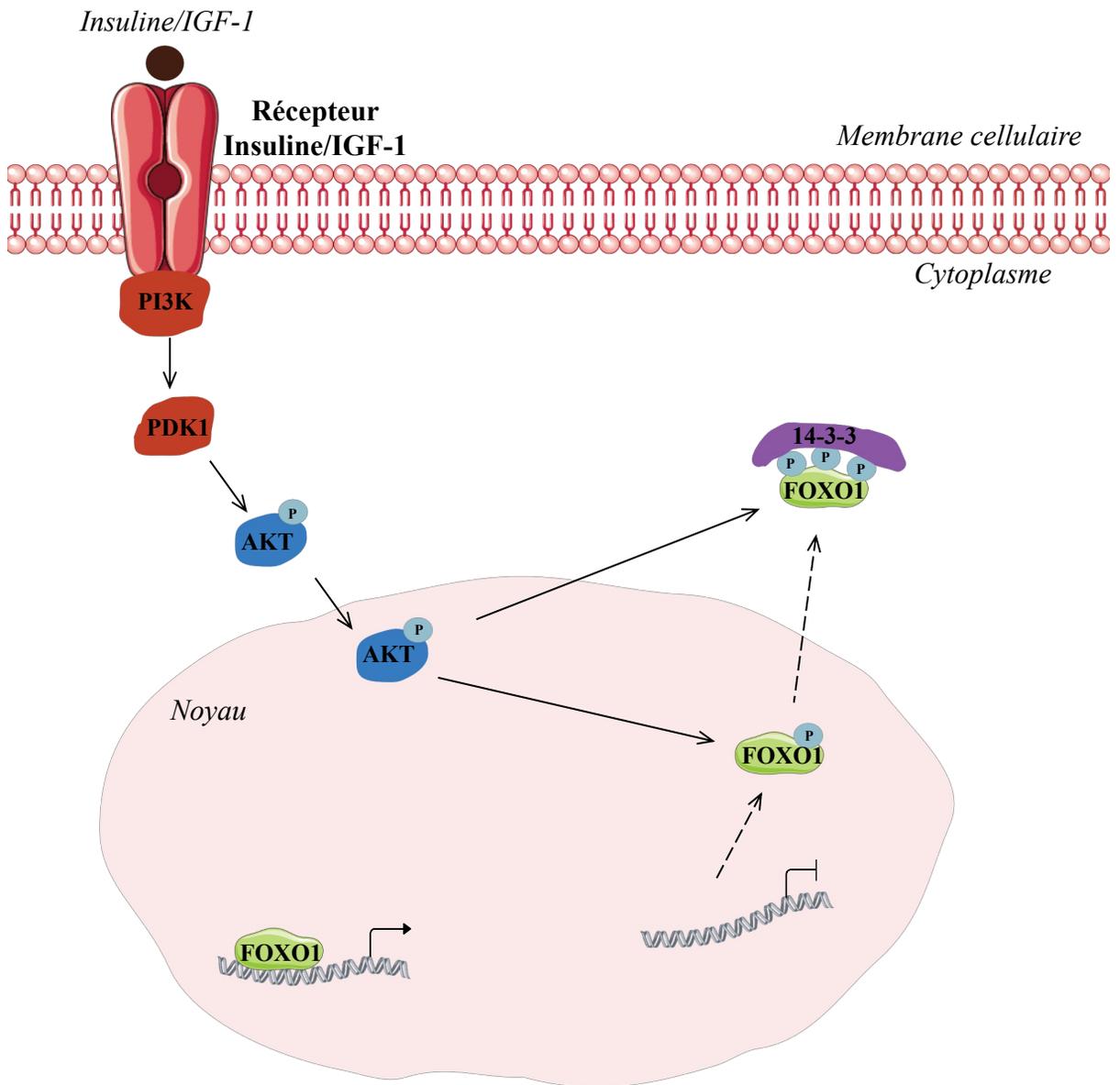


Figure 10 : Régulation de la signalisation FOXO1.

La protéine FOXO1 va être phosphorylée par la protéine AKT à la suite de l'activation de la signalisation IGF1. La phosphorylation de FOXO1 entraîne son exclusion nucléaire et sa rétention cytoplasmique.

PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase ; PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 ; IGF1 : Insulin like growth factor 1 ; P : Phosphorylation

La régulation de l'activité de la protéine FOXO1 est complexe et fait intervenir de nombreux stimuli.

Des études ont démontré que l'activité de FOXO1 est corrélée à son abondance, mais aussi à ses modifications post-traductionnelles (MPTs) et à sa translocation entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire, donc à sa localisation subcellulaire. La protéine FOXO1 peut subir un grand nombre de MPTs telles que la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation et la méthylation (Z. Wang, Yu, et Huang 2016). Certaines MPTs de FOXO1, notamment la phosphorylation, vont impacter sa localisation subcellulaire.

Si la phosphorylation de FOXO1 est principalement médiée par AKT, au niveau de résidus spécifiques, d'autres protéines telles les protéines kinases A, ERK/MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et MEK/MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) peuvent également être impliquées (Mezza et al. 2016), (Diaz et al. 2017). De plus, il a été démontré que la protéine phosphatase 2A (PP2A) est capable de déphosphoryler la protéine FOXO1 dans la lignée cellulaire FL5.12 (cellules fœtales hépatiques immortalisées), (Yan et al. 2008). Chez l'homme, la phosphorylation de FOXO1 a notamment été observée au niveau de 3 résidus conservés incluant la thréonine 24, la sérine 256 et la sérine 319 (Rena et al. 1999) et chez la souris au niveau de la thréonine 24, et des sérines 253 et 316 (Nakae, Barr, et Accili 2000). Ces modifications vont bloquer l'interaction de la protéine FOXO1 avec l'ADN et entraîner la translocation de FOXO1 du noyau vers le cytoplasme, supprimant ainsi son activité transcriptionnelle (Peng et al. 2020), (**Figure 10**). Le plus souvent, lorsque la protéine FOXO1 est phosphorylée, elle se retrouve ancrée au cytoplasme grâce à la protéine 14-3-3 ; s'en suivra alors une ubiquitination de FOXO1 par la protéine E3-ligase et sa dégradation par le protéasome (Huang et Tindall 2011).

La protéine FOXO1 peut également être acétylée, notamment par les protéines CPB (*CREB-binding protein*) et P300 au niveau des lysines 242, 245 et 262. Des études montrent que l'acétylation de FOXO1 est réversible notamment par l'action de protéines possédant une activité désacétylase telle que SIRT1 (*Sirtuine 1*), (Brunet et al. 2004), (Yonghua Yang et al. 2005). L'acétylation ou la désacétylation semble également avoir un impact sur l'activité de FOXO1. Si plusieurs études suggèrent que l'acétylation de FOXO1 amplifie son activité transcriptionnelle (Yang Yang et al. 2009), (Motta et al. 2004), d'autres ont montré à l'inverse que l'acétylation de FOXO1 sensibilise la protéine à la phosphorylation et altère sa capacité de

liaison à l'ADN entraînant ainsi une diminution de son activité transcriptionnelle (Matsuzaki et al. 2005), (Daitoku et al. 2004).

Plus récemment, une étude a mis en évidence l'interaction de FOXO1 avec l'histone méthyltransférase G9A/EHTM2. Cette interaction conduit à la méthylation de FOXO1 au niveau de la lysine 273 et augmente l'interaction de FOXO1 avec SKP2 (*S-Phase Kinase Associated Protein 2*), une E3 ligase spécifique de la protéine, réduisant ainsi la stabilité de la protéine (Chae et al. 2019).

Les micro-ARNs sont également d'importants régulateurs de la traduction de FOXO1 puisqu'ils interfèrent directement avec les niveaux d'ARN messagers de FOXO1, entraînant une diminution de l'abondance de la protéine (Yan et al. 2016), (Ren, Li, et Tu 2015).

La diversité de régulation que subit la protéine FOXO1 et les mécanismes associés restent à mieux identifier. Cependant, l'ensemble de ces données révèlent que FOXO1 est un acteur sensible subissant de nombreuses MPTs, qui intervient dans de nombreux processus cellulaires, suggérant son intervention pour médier des réponses face à des changements de l'environnement cellulaire.

La régulation de l'étape clé de différenciation des gonocytes en SSCs met en jeu de nombreux gènes et reste aujourd'hui partiellement élucidée. Cependant, des analyses de *single-cell RNA seq* permettent peu à peu de faire la lumière sur les différences des profils d'expression entre les gonocytes et les spermatogonies. En effet, une étude montre que l'expression de certains gènes spécifiques des cellules germinales tels que *Bcl6b* (*B-Cell CLL/Lymphoma 6, Member B*), *Egr2* (*Early Growth Response 2*), *Sohlh1* (*Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1*), et *Csf3r* (*Colony Stimulating Factor 3 Receptor*) présente une variabilité considérable entre les cellules au jour postnatal P5, alors que d'autres gènes tels que *Actb* (*Actin Beta*), *Gapdh* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*), *Rpl7* (*Ribosomal Protein L7*) et *Rps2* (*Ribosomal Protein S2*) sont exprimés de manière uniforme entre les cellules. Ces résultats illustrent une hétérogénéité précoce entre les transcriptomes des populations de cellules germinales, reflétant potentiellement la transition des gonocytes vers les spermatogonies (Liao et al. 2017). De plus, une autre étude a notamment montré que les gènes *Id4* et *Gfra1* présentent des différences de profil d'expression au moment de cette transition. En effet, ces deux gènes seraient plus exprimés dans les gonocytes en transition que dans les spermatogonies indifférenciées (Zhao et al. 2021). L'ensemble de ces gènes pourraient donc jouer un rôle dans la différenciation des gonocytes.

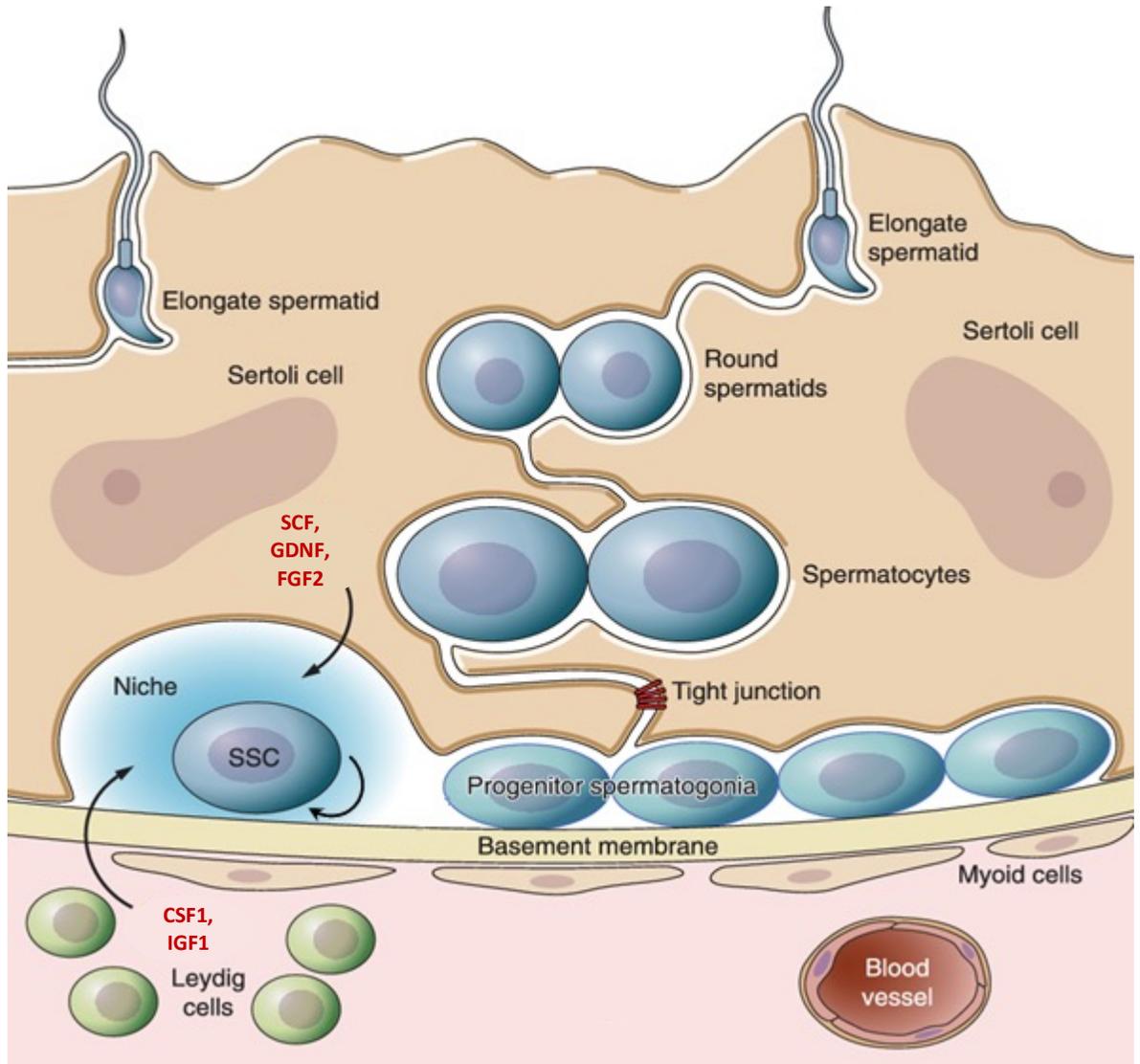


Figure 11 : La niche des SSC

Les SSCs sont localisées dans des niches où elles reçoivent des facteurs nécessaires à leur auto-renouvellement. Les cellules de Leydig synthétisent les facteurs IGF-1 et CSF1 et les cellules de Sertoli les facteurs SCF, GDNF et FGF2.

IGF-1 : *Insulin Growth Factor 1* ; CSF1 : *Colony-Stimulating Factor 1* ; SCF : *Stem Cell Factor* ; GDNF : *Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor* ; FGF2 : *Fibroblast Growth Factor 2*.

D'après Oatley et Brinster, 2012 : PMID: 22535892

Les spermatogonies acquièrent au cours du développement des propriétés d'auto-renouvellement, qui permettent le maintien du pool de cellules germinales souches et donc de la fertilité. Afin de conserver ce potentiel de cellule souche, les SSCs se trouvent dans un micro-environnement spécialisé appelé « niche ».

B. La niche des cellules germinales souches

Comme pour les autres populations de cellules souches, l'homéostasie des SSCs est maintenue grâce à un microenvironnement spécialisé, la niche (Schofield 1978). Les niches présentes au sein du testicule constituent un environnement avec des caractéristiques favorables au maintien de l'état indifférencié des SSCs et donc à leur auto-renouvellement. Les niches forment une microarchitecture dont une partie se trouve au sein du tube séminifère et l'autre dans l'espace interstitiel, proches des vaisseaux (Chiarini-Garcia et al. 2001), (Chiarini-Garcia, Raymer, et Russell 2003), (Yoshida, Sukeno, et Nabeshima 2007). La niche comprend donc des cellules germinales, des cellules de Sertoli, des cellules de Leydig, des cellules myoïdes périvitubulaires, des macrophages ainsi que des cellules endothéliales testiculaires et lymphatiques (Potter et DeFalco 2017), (**Figure 11**). Des vaisseaux sanguins traversent la niche, permettant d'acheminer des facteurs de croissance et des cytokines jusqu'aux cellules germinales (Hofmann 2008).

1. Les cellules germinales

Les facteurs impliqués dans la migration des SSCs vers les niches sont encore peu identifiés. Certaines études suggèrent que l'expression de molécules d'adhésion est nécessaire pour cette migration. Les SSCs expriment les intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$; ces molécules d'adhésion sont connues pour se lier à la laminine (Shinohara, Avarbock, et Brinster 1999), suggérant leur implication dans la migration des SSCs. Cependant, une étude a démontré que la modulation de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ n'affecte pas la translocation des SSCs à la membrane basale même si la protéine est indispensable au redémarrage de la spermatogenèse lors d'une transplantation de SSCs (Kanatsu-Shinohara et al. 2008).

De plus, le rôle des molécules d'adhésion dans la migration des SSCs est une piste intéressante à étudier, puisque leur implication a déjà été démontrée dans différents processus de migration cellulaire (Vicente-Manzanares et Horwitz 2011). En 2007, Tokuda *et al.* montrent que l'E-Cadhérine (codée par le gène *Chd1*, *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1*) est exprimée spécifiquement dans les spermatogonies indifférenciées de type A dans le testicule

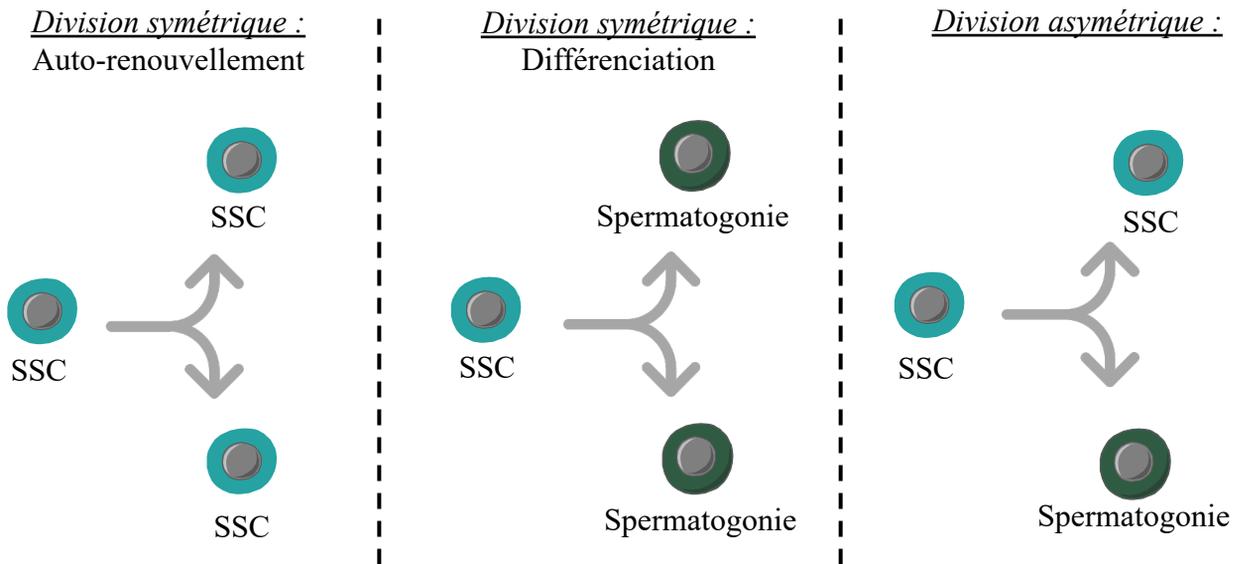


Figure 12 : Destin cellulaire des SSCs : divisions symétriques et asymétrique.

Les SSCs suivent 3 processus distincts de divisions cellulaires. Certaines se divisent de manière symétrique en deux nouvelles SSCs, permettant ainsi l'auto-renouvellement et le maintien du pool. D'autres se divisent de manière symétrique en deux nouvelles spermatogonies, permettant leur différenciation et le démarrage d'une vague de spermatogenèse. D'autres encore subissent une division asymétrique qui permet à la fois le maintien du pool et la différenciation.

SSC : *Spermatogonial Stem Cell*

de souris. Des expériences de transplantation de cellules germinales ont permis de montrer que seules les cellules germinales positives pour CDH1 sont capables de coloniser le testicule receveur (Tokuda et al. 2007).

D'autres études suggèrent que l'expression de certaines chémokines est nécessaire à la migration des SSCs vers les niches. Le gène *Etv5* (*Ets variant gene 5*) code un facteur de transcription exprimé par les cellules de Sertoli et les SSCs, qui semble nécessaire au maintien et à l'auto-renouvellement de la lignée germinale chez la souris, mais également à la colonisation des SSCs post transplantation (Tyagi et al. 2009). L'inactivation de ce gène chez la souris conduit à la diminution de l'expression de plusieurs chémokines telles que CCL9 (C-C Motif Chemokine Ligand 9), CCL12 (C-C Motif Chemokine Ligand 12) et CXCL5 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 5) dans les cellules de Sertoli. Dans cette étude, des expériences de chimiotactisme ont démontré que la migration des SSCs vers les cellules de Sertoli mutantes pour *Etv5* est significativement réduite par rapport à la migration des SSCs vers des cellules de Sertoli sauvages. L'utilisation de chémokines recombinantes (CCL9 et CXCL5) permet le retour à la normale de la migration des SSCs vers les cellules de Sertoli mutées pour le gène *Etv5* (Simon et al. 2010).

En 2015, une étude a montré que la migration postnatale des cellules germinales requiert la présence de la protéine AIP1 (*Actin-Interacting Protein 1*) aussi bien dans les cellules germinales que dans les cellules de Sertoli. Cette protéine est conservée chez les eucaryotes et exerce un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (Ono 2018). L'inactivation spécifique du gène *Aip1* dans les cellules germinales et/ou les cellules de Sertoli chez la souris, entraîne des défauts de migration des SSCs entre les jours P5 et P7, corrélés à une accumulation ectopique d'actine et d'E-cadhérine dans les deux types cellulaires (Xu et al. 2015).

La migration des cellules germinales souches dans les niches implique donc de nombreux facteurs qui ne sont pas tous décrits à ce jour. Après avoir atteint la niche, les SSCs vont d'abord réaliser une division symétrique afin d'établir un pool de cellules souches suffisant. Puis, au cours du développement, elles favoriseront une division asymétrique permettant le maintien du pool de SSCs en parallèle d'une différenciation initiant la spermatogenèse (Oatley et Brinster 2012), (**Figure 12**). Ces données suggèrent une régulation fine de l'homéostasie des cellules germinales souches par les facteurs de la niche, soutenue par différents types cellulaires du testicule (Subash et Kumar 2021).

2. Les autres types cellulaires

i. Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli régulent en partie la différenciation et le développement testiculaire et sont essentielles au maintien de la fonction testiculaire à l'âge adulte. Elles sont elles-mêmes régulées en partie par la signalisation des androgènes. Chez la souris et chez l'homme, le nombre de cellules de Sertoli augmente au cours de la vie fœtale, puis ralenti après la naissance pour atteindre un niveau définitif au début de la puberté (Sharpe et al. 2003). Le fait que le nombre de cellules de Sertoli influence la spermatogenèse *via* le soutien qu'elles apportent aux cellules germinales est bien décrit (Rebourcet et al. 2017). L'activité des cellules de Sertoli est dépendante de la signalisation FSH, sécrétée par la glande hypophysaire. Cette dernière permet la prolifération et la différenciation des cellules de Sertoli immatures établissant ainsi au cours de la période périnatale le nombre de cellules de Sertoli présentes à l'âge adulte (Sharpe et al. 2003). En 2011, Oatley et *al.* se sont intéressés de plus près à l'implication des cellules de Sertoli dans la formation des niches et dans le maintien de la population des cellules souches. En utilisant un modèle d'hypothyroïdisme permettant de manipuler artificiellement le nombre de cellules de Sertoli dans les testicules de souris à l'âge adulte, ils ont montré que l'augmentation du nombre de cellules de Sertoli était corrélée à l'augmentation du nombre de SSCs et de niches colonisables par les SSCs après transplantation (Oatley, Racicot, et Oatley 2011).

Les cellules de Sertoli sont considérées comme les acteurs clés de la formation des niches de SSCs. Ce consensus scientifique provient du fait que les cellules de Sertoli expriment, en réponse à la FSH, un facteur de croissance indispensable pour l'auto-renouvellement des SSCs, le GDNF. La protéine GDNF agit par l'intermédiaire du récepteur GFRA1 exprimé par les SSCs. L'invalidation totale du gène *Gdnf* entraîne la mort des souris à la naissance suite à des défauts des fonctions rénale et neuronale (Moore et al. 1996). Cependant, l'invalidation hétérozygote du gène codant la protéine GDNF chez la souris est viable et entraîne une diminution du nombre de SSCs ; à l'inverse sa surexpression conduit à leur accumulation (X. Meng et al. 2000).

ii. Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont également essentielles à l'établissement de la niche de SSCs. Elles sont localisées dans le compartiment interstitiel et produisent notamment la testostérone,

hormone indispensable à la régulation de la fertilité mâle. Deux populations morphologiquement différentes de cellules de Leydig ont été identifiées : les cellules de Leydig fœtales présentes pendant le développement testiculaire, et les cellules de Leydig adulte. Les cellules de Leydig fœtales sont identifiables à partir du jour embryonnaire 12,5 chez la souris. Leur nombre ainsi que les taux de testostérone augmentent tout au long du développement fœtal, atteignant un pic autour de la naissance. Les cellules de Leydig fœtales expriment des enzymes et des co-facteurs impliqués dans des voies de signalisation métaboliques telles que la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative.

Le nombre de cellules de Leydig fœtales et les niveaux de testostérone déclinent ensuite progressivement au cours de la vie néonatale. Par la suite, au cours de la maturation sexuelle, les cellules de Leydig adultes se différencient et colonisent l'espace interstitiel, remplaçant ainsi la population fœtale et permettant à nouveau la production de testostérone afin d'assurer le maintien des fonctions testiculaires tout au long de la vie de l'individu. Depuis l'identification des deux populations de cellules de Leydig, les chercheurs continuent de discuter leurs origines, certains suggérant la présence de cellules souches ou de progéniteurs communs aux deux populations, et d'autres appuyant l'hypothèse de progéniteurs différents et spécifiques (Zirkin et Papadopoulos 2018), (Bhattacharya et Dey 2022).

L'aspect le plus étudié de leurs fonctions est en lien avec leur activité endocrine. En effet, les cellules de Leydig vont produire, sous l'action de la LH, de la testostérone. La testostérone assure un soutien essentiel à la lignée germinale. Ainsi, des altérations de la production en androgènes conduisent à la mort cellulaire des cellules germinales notamment au stade méiotique. Ce rôle majeur est soutenu par les études sur les souris mutantes pour le récepteur des androgènes ou encore par les nombreuses études menées sur l'impact des perturbateurs endocriniens sur la physiologie testiculaire. La testostérone participe ainsi à la régulation des fonctions des cellules de Sertoli (qui expriment le récepteur des androgènes), et permet le maintien de l'intégrité de la BHT et l'auto-renouvellement des SSCs (Tanaka et al. 2016), (Walker 2011). Les cellules de Leydig sécrètent également le facteur de croissance IGF1 (*Insulin like growth factor 1*) qui permet le maintien de l'état de pluripotence des SSCs *in vitro* (Huang et al. 2009). De manière intéressante, le facteur de croissance IGF1 est également nécessaire à la prolifération des cellules de Sertoli *in vivo* en période périnatale (Pitetti et al. 2013), témoignant de l'importance des dialogues entre les différents types cellulaires du testicule.

De plus, la cytokine CSF1 (*Colony stimulating factor 1*) est elle aussi indispensable au maintien des cellules germinales souches. Elle est sécrétée par les cellules de Leydig, mais également par les cellules myoïdes péritubulaires, et agit (en synergie avec le GDNF et le FGF2) sur les SSCs qui possèdent le récepteur CSF1R pour permettre leur auto-renouvellement au détriment de leur différenciation (Oatley et al. 2009).

iii. Les cellules myoïdes péritubulaires

Les cellules myoïdes péritubulaires influencent elles-aussi le micro-environnement de la niche. En effet, elles expriment le récepteur AR des androgènes et produisent du GDNF en réponse à la testostérone. L'invalidation de *Ar* spécifiquement dans les cellules myoïdes chez la souris entraîne une perte progressive des spermatogonies, suggérant l'importance de la signalisation androgénique au sein des cellules péritubulaire pour le maintien des SSCs (Chen et al. 2014). De plus, les cellules péritubulaires produisent d'autres facteurs paracrines tel que LIF, une cytokine permettant la prolifération des cellules germinales indifférenciées (Piquet-Pellorce et al. 2000).

Ces données indiquent que de nombreux types cellulaires et facteurs paracrines, endocrines, autocrines et juxtacrines interviennent dans la régulation de l'homéostasie des SSCs au sein de la niche. La localisation basale des SSCs au sein des tubes séminifères, en amont de la BHT, suggère en effet leur exposition potentielle à des facteurs soit sécrétés par des cellules de l'espace interstitiel, soit apportés par la circulation sanguine. La niche requiert donc pour son fonctionnement optimal une signalisation complexe et une collaboration entre les différents types cellulaires du testicule. De plus, le maintien de la population des cellules souches germinales au sein des niches est essentielle pour la continuité de la spermatogenèse et la production des spermatozoïdes.

C. La spermatogenèse : des spermatogonies aux spermatozoïdes

1. Le maintien de la niche des SSCs

La production continue de spermatozoïdes par les mâles matures sexuellement tout au long de leur vie requiert un processus efficace et hautement régulé au sein des tubes séminifères du testicule. Par conséquent, un approvisionnement constant en spermatogonies indifférenciées doit être maintenu pour que ces cellules puissent se différencier en spermatozoïdes (de Rooij et Russell 2000). Les SSCs vont donc se multiplier pour renouveler leur population et ainsi donner

naissance à de nouvelles spermatogonies A_{single} . Dans ce contexte, les spermatogonies A_{single} sont définies comme SSCs puisqu'elles conservent leur capacité d'auto-renouvellement. Dans le testicule, les SSCs représenteraient environ 10% des spermatogonies A_{single} (Nagano 2003). Chez la souris, un test fonctionnel permet d'identifier les cellules germinales ayant un potentiel souche. Une suspension cellulaire obtenue à partir du testicule d'une souris donneuse fertile est réintroduite par micro-injection dans la lumière des tubes séminifères d'une souris receveuse stérile. Seule une cellule souche pourra être à l'origine d'un processus de spermatogenèse efficace et de son maintien dans le testicule du receveur ; l'enrichissement de la préparation en SSCs est donc une étape critique de cette expérimentation. La transplantation des spermatogonies A_{single} dans un testicule receveur, préalablement vidé de ses cellules germinales, permet la régénération de l'épithélium séminifère ainsi que le maintien de la spermatogenèse (Brinster et Avarbock 1994), (Brinster et Zimmermann 1994). Le maintien de cette population de SSCs dépend de nombreux facteurs exprimés par différents types cellulaires retrouvés au sein des niches de cellules germinales.

De nombreuses études ont identifiées des facteurs de croissance clés influençant l'auto-renouvellement des SSCs tels que GDNF, FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) et CSF1. Il est important de noter que ces facteurs sont aussi connus pour réguler l'auto-renouvellement des cellules souches dans d'autres tissus tels que le pancréas ou le cerveau (Dettmer et al. 2020) (Jinju Zhang et al. 2018), suggérant que certaines composantes des niches sont communes chez les mammifères.

Dans le testicule, les cellules endothéliales permettent l'apport de molécules indispensables à l'homéostasie des SSCs. Par exemple, ces cellules produisent et sécrètent le facteur de croissance FGF5 (*Fibroblast Growth Factor 5*). De manière intéressante, une concentration importante en FGF5 conduit à l'auto-renouvellement des cellules germinales indifférenciées exprimant le marqueur GFRA1, alors que de faibles concentrations entraînent leur différenciation (Kitadate et al. 2019). En effet, FGF5 régule positivement des gènes associés au maintien de l'état indifférencié tels que *Gfra1* et *Id4* et négativement des gènes permettant la différenciation des cellules germinales tels que *Ngn3* et *Stra8* (*Stimulated By Retinoic Acid 8*). En 2018, une étude montre qu'après déplétion de la lignée germinale dans le testicule de souris par un traitement chimiothérapique, la transplantation de cellules endothéliales testiculaires permet l'accélération du redémarrage de la spermatogenèse. De plus, ces cellules expriment des facteurs de croissance qui sont suffisants pour maintenir une

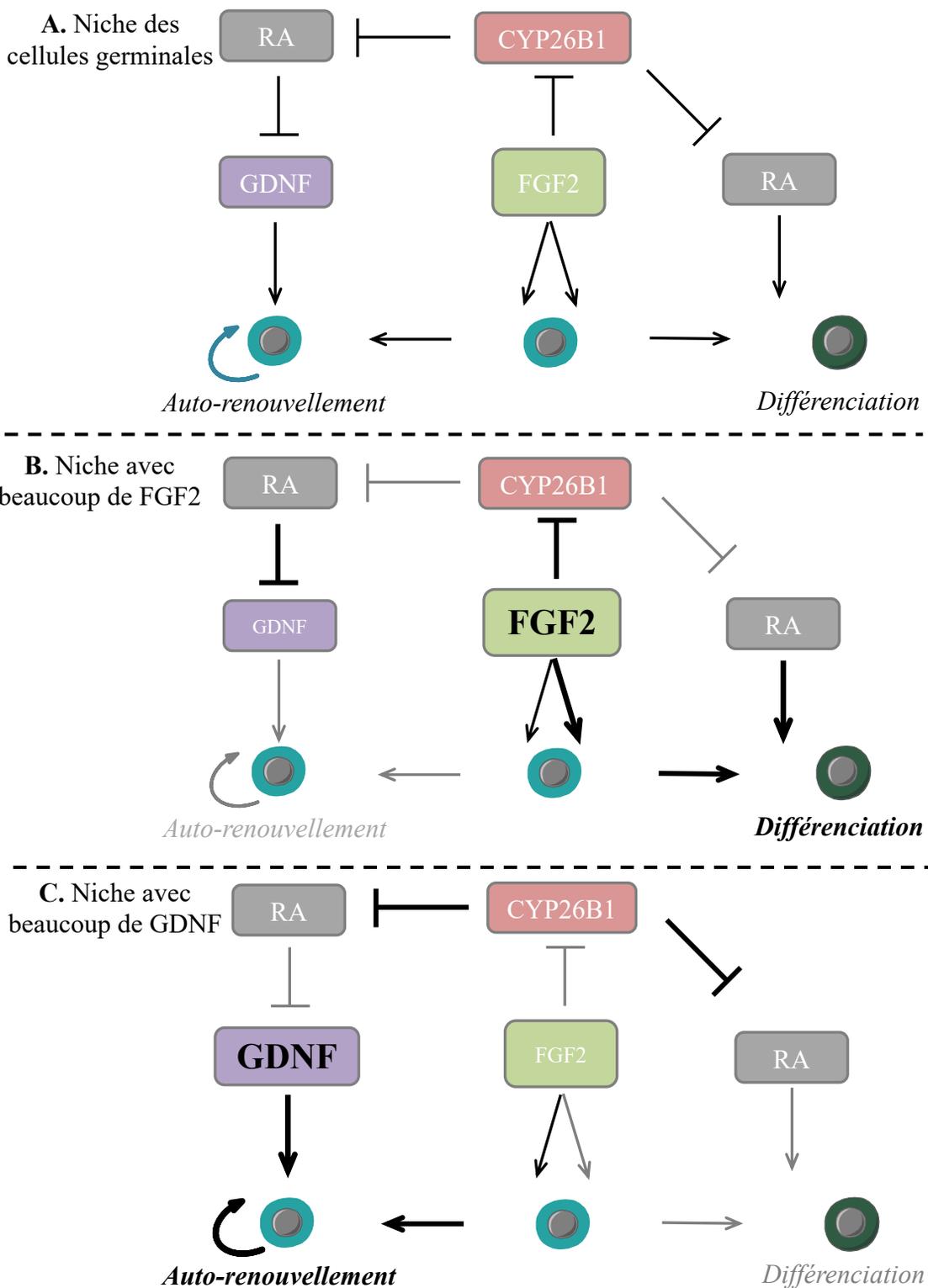


Figure 13 : Rôles de l'équilibre entre les facteurs FGF2 et GDNF dans la niche des cellules germinales. **A.** Un équilibre complexe entre FGF2 et GDNF est présent dans la niche des SSCs permettant d'assurer à la fois l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules germinales souches. **B.** Une forte concentration en FGF2 diminue la production de GDNF, entraînant préférentiellement la différenciation des SSCs plutôt que leur auto-renouvellement. **C.** A l'inverse, une forte concentration en GDNF diminue la production de FGF2 entraînant l'auto-renouvellement des cellules souches au lieu de leur différenciation.

D'après Masaki et al., 2018 : PMID: 29681540

GDNF : *Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor* ; FGF2 : *Fibroblast Growth Factor 2* ; RA : *Retinoic Acid*.

population de SSCs en culture *in vitro*, incluant GDNF, FGF-2, CXCL12, CXCL2 et IGFBP-2 (*Insulin-like growth factor binding protein 2*) (Bhang et al. 2018).

La diversité des facteurs nécessaires à l'auto-renouvellement des SSCs implique une régulation fine créant parfois un équilibre complexe. En effet, les protéines FGF2 et GDNF en sont un très bon exemple. Si FGF2 permet l'auto-renouvellement des SSCs (Ishii et al. 2012), une trop forte concentration en FGF2 entraîne une diminution de la production de GDNF, conduisant alors à l'entrée en différenciation des cellules germinales au détriment de leur auto-renouvellement (Masaki et al. 2018), (**Figure 13**). A l'inverse, l'inhibition du gène codant le récepteur FGFR2 induit une augmentation de l'expression du gène *Gdnf* (Takashima et al. 2015). Ces données ont démontré que le rôle de FGF2 dans la niche des SSCs est d'inhiber l'expression du gène *Gdnf*. De plus, FGF2 permet aussi l'inhibition de l'expression du gène *Cyp26b1* (*Cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1*), ce qui permet la différenciation des spermatogonies via l'activité des acides rétinoïques (Masaki et al. 2018). Comme énoncé plusieurs fois, les cellules de Sertoli sécrètent également du GDNF. Ce dernier régule l'expression de gènes tels que *Nanos2* et *Id4* et exerce un rétrocontrôle négatif sur *Ngn3*, permettant ainsi l'auto-renouvellement des SSCs (Kaucher, Oatley, et Oatley 2012). Une forte concentration en GDNF permet une prolifération importante des SSCs. A l'inverse une concentration basse en GDNF induit la différenciation des cellules germinales (Kanatsu-Shinohara et al. 2005), (Kubota, Avarbock, et Brinster 2004), (Yomogida et al. 2003). L'action du GDNF sur les cellules germinales est permise par l'expression de son récepteur associé GFRA1 dans les spermatogonies indifférenciées.

De plus, en 2000 Meng et ses collaborateurs rapportent que les souris mutantes présentant une haploinsuffisance de GDNF ont des troubles sévères de la fertilité associés à un arrêt de la spermatogenèse. Les analyses testiculaires de ces souris révèlent que la majorité des tubes séminifères contiennent uniquement des cellules de Sertoli, suggérant une incapacité des SSCs à maintenir la ligne germinale. Dans cette même étude, la surexpression ubiquitaire de GDNF chez les souris entraîne une accumulation de spermatogonies indifférenciées dans les testicules, entraînant la formation de tumeurs germinales testiculaires (X. Meng et al. 2000).

L'ensemble de ces données montre l'importance de ces étapes précoces de la spermatogenèse pour assurer la production spermatique. Les SSCs vont ensuite entrer dans des processus de prolifération et de différenciation qui permettront la mise en place de la spermatogenèse.

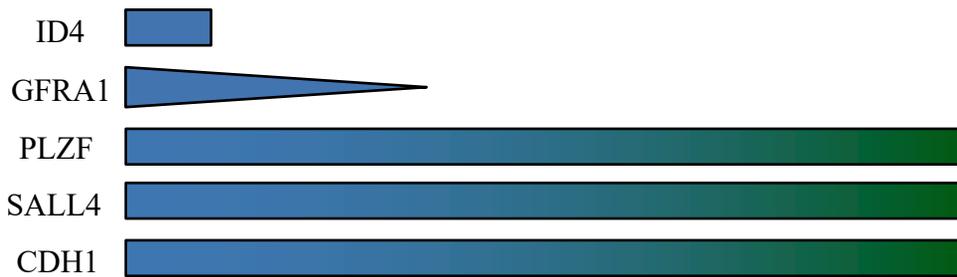
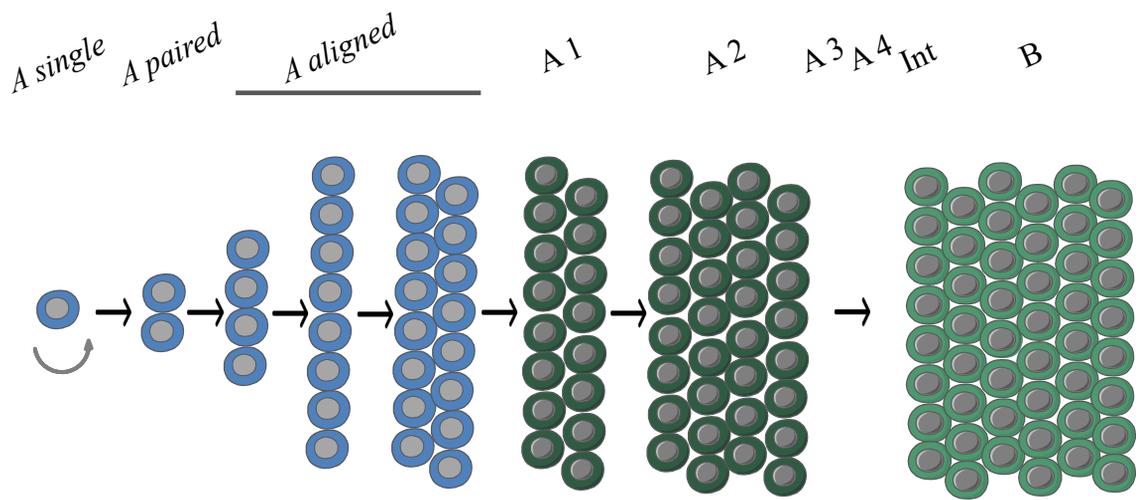


Figure 14 : L'expression de certains marqueurs pendant la prolifération des spermatogonies chez la souris.

Les spermatogonies vont exprimer certains marqueurs tout au long de leur différenciation ; cependant en fonction de leur étape de différenciation, ces marqueurs seront plus (bleu) ou moins (vert) exprimés.

ID4 : *Inhibitor of differentiation 4* ; GFRA1 : *Gdnf family receptor alpha-1* ; PLZF : *Promyelocytic leukemia zinc finger protein* , SALL4 : *SAL-like protein 4* ; CDH1 : *Chromodomain helicase DNA binding protein 1*.

2. Prolifération des spermatogonies

La spermatogenèse débute par la phase proliférative au cours de laquelle les SSCs, localisées au niveau de la membrane basale des tubes séminifères, vont subir une série de divisions mitotiques. Ces divisions permettent l'amplification de la population des spermatogonies indifférenciées avant leur différenciation en spermatogonies différenciées et spermatocytes primaires. Depuis quelques décennies, de nombreuses études chez les mammifères ont permis de démontrer que cette population de spermatogonies indifférenciées est très hétérogène (de Rooij et Russell 2000), (Oatley et Brinster 2012), (Chan et al. 2014a). Les SSCs vont générer les premières populations de cellules progénitrices en se divisant par mitose. Une cellule souche spermatogoniale peut se diviser en deux nouvelles spermatogonies A_{single} (As) qui seront à l'origine du « stock » de cellules germinales donc de l'auto-renouvellement, ou bien se diviser en une paire de spermatogonies A_{paired} (Apr) qui entreront en différenciation pour donner naissance aux autres sous-types de spermatogonies. En effet, les spermatogonies Apr se divisent pour former des structures interconnectées de 4, 8 et 16 spermatogonies alignées (Aaligned, Aal), (**Figure 14**). Pendant cette phase de prolifération, toutes les spermatogonies sont interconnectées par des ponts intercellulaires, nécessaires au partage de substances cellulaires tels que des ARN messagers et des protéines. En effet, Guo et Zheng émettent l'hypothèse que ces connexions permettent de réduire l'hétérogénéité entre les cellules germinales afin de produire une population de gamètes relativement uniforme (Guo et Zheng 2004). Du stade As au stade Aa1, les spermatogonies sont dites indifférenciées (de Rooij et Grootegoed 1998). Après le stade Aal, les spermatogonies entreront en différenciation pour donner les spermatogonies A1 à A4, intermédiaires puis B.

Bien qu'elles aient chacune une localisation particulière le long de la membrane basale, il est difficile d'identifier morphologiquement les spermatogonies indifférenciées. Cependant, l'amélioration des méthodes d'isolement cellulaire et de séquençage permet aujourd'hui de mieux identifier leur transcriptome (Suzuki, Diaz, et Hermann 2019). Des études comparatives d'analyse de séquençages *single cell RNA* permettent aujourd'hui de mettre en évidence de nombreux gènes essentiels pour le devenir et la fonction des SSCs, notamment *Dazl* (*Deleted in AZoospermia Like*), *Ddx4* (*DeaD-boX helicase 4*), *Nxf2* (*Nuclear rna eXport Factor 2*), *Sall4* (*SAL-Like protein 4*), *Fkbp6* (*FK506 Binding Protein 6*), *Trim71* (*TRIPartite Motif containing 71*) et *Mael* (*MAELstrom spermatogenic transposon silencer*), (Sisakhtnezhad et Heshmati 2018).

D'après de nombreuses études, bien que l'ensemble des spermatogonies indifférenciées exprime des marqueurs communs tels que ID4, PLZF, SALL4, GFRA1 et CDH1, ces protéines sont plus ou moins exprimées en fonction des étapes de différenciation cellulaire, créant des gradients d'expression spécifiques de certains stades (**Figure 14**).

La majorité des cellules souches spermatogoniales exprime le marqueur ID4 (Chan et al. 2014b), (Sun et al. 2015). Ce répresseur transcriptionnel influence l'identité des cellules souches puisque sa surexpression dans la lignée germinale est corrélée à un blocage des spermatogonies au stade progéniteur. A l'inverse, la diminution de son expression est nécessaire pour la différenciation des spermatogonies (Helsel et al. 2017).

Le répresseur transcriptionnel PLZF codé par le gène *Zbtb16* permet le maintien de l'état indifférencié des gonocytes et des spermatogonies indifférenciées. Son inactivation chez la souris entraîne une altération de la spermatogenèse corrélée à une diminution importante du nombre de spermatogonies (Costoya et al. 2004).

La protéine SALL4 est un acteur connu de la voie Wnt/B-caténine et est coexprimée avec PLZF dans le noyau de nombreuses spermatogonies (Gassei et Orwig 2013). L'inactivation du gène *Sall4* chez la souris entraîne une diminution du nombre de spermatogonies indifférenciées et altère la régénération des cellules souches à long terme (Chan et al. 2017). Les protéines SALL4 et PLZF interagissent entre-elles et antagonisent mutuellement leurs activités transcriptionnelles (Hobbs et al. 2012). Cette étude suggère que SALL4 favoriserait l'expression de *Kit* dans les spermatogonies en différenciation, et que PLZF réprimerait cette activité dans les spermatogonies indifférenciées. En effet, SALL4 *via* la séquestration de PLZF va entraîner l'expression du marqueur de différenciation *Kit*. Ces données révèlent l'importance des niveaux d'expression des protéines PLZF et SALL4 pour la prolifération et la différenciation des cellules germinales indifférenciées.

Les spermatogonies qui expriment le récepteur GFRA1 présentent une grande capacité de prolifération et une capacité à former des colonies en culture *in vitro*, caractéristiques propres aux cellules souches. De plus, les spermatogonies qui exprimeraient les plus hauts niveaux de GFRA1 seraient les véritables SSCs, alors que celles avec des niveaux plus faibles seraient en réalité des progéniteurs. L'expression de GFRA1 est importante dans les spermatogonies A_{single} et diminue au fur et à mesure de la progression de la spermatogenèse. En effet, l'inactivation de *Gfra1* dans les spermatogonies indifférenciées entraînent leur différenciation précoce, probablement dans les stades A₁ à A₄, exprimant le facteur KIT (He et al. 2007).

Plusieurs groupes de cellules positives pour GFRA1 (GFRA1+) ont été identifiés, des spermatogonies A_{single} aux spermatogonies A_{paired} : les cellules qui expriment seulement *Nanos2*, celles qui expriment uniquement *Nanos3*, et celles qui coexpriment les deux marqueurs (Suzuki et al. 2009). Les gènes *Nanos* codent des protéines impliquées dans le développement des cellules germinales qui sont conservées au cours de l'évolution (Seydoux et Braun 2006). Les protéines NANOS2 et NANOS3 sont présentes dans les spermatogonies souches qui s'autorenouvellent, et permettent le maintien de l'état souche des cellules. En effet, une diminution de la taille du pool de cellules souches est observée lorsque le gène *Nanos2* est invalidé de manière conditionnelle chez la souris. A l'inverse, la surexpression de ce gène entraîne une augmentation du nombre de spermatogonies indifférenciées possédant des caractéristiques de cellules souches (Sada et al. 2009). Par ailleurs, NANOS3 jouerait un rôle dans le maintien de l'état indifférencié des spermatogonies en régulant leur progression dans le cycle cellulaire (Lolicato et al. 2008).

Une étude a montré que la protéine CDH1 est détectée spécifiquement dans les spermatogonies indifférenciées de type A dans le testicule de souris. Ces cellules exprimant l'E-cadhérine survivent après l'administration cytotoxique de busulfan (un agent utilisé en chimiothérapie) et sont capables de régénérer l'épithélium séminifère. De plus, les expériences de transplantation ont montré que seules les cellules positives pour CDH1 sont capables de coloniser le testicule receveur (Tokuda et al. 2007).

Le concept d'un gradient d'expression qui distinguerait les SSCs des populations progénitrices pourrait s'appliquer à un grand nombre de molécules déjà considérées comme marqueurs de SSCs. Hessel *et al.* proposent qu'un sous ensemble de spermatogonies A_{single} représenteraient les SSCs, qui expriment à de forts niveaux certains marqueurs tels que *Id4*, *Bcl6b*, *Etv5*, *Lhx1* (*LIM Homeobox 1*), *Cxcr4* (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*) et *Gfra1*.

Une étude menée par Oatley et al. en 2006 a permis de mettre en évidence l'importance du répresseur transcriptionnel BCL6B pour l'auto-renouvellement des SSCs *in vitro*. L'expression de ce marqueur est régulée par le facteur de croissance GDNF, donc par la signalisation GDNF/GFRA1. L'utilisation d'un ARN interférent dirigé contre l'ARN messager du gène *Bcl6b* entraîne une forte diminution de la taille des colonies de SSCs *in vitro*. De plus, chez la souris l'invalidation de ce gène entraîne une altération de la spermatogenèse, conduisant à une hypofertilité des animaux (Oatley et al. 2006). Le facteur de transcription LHX1, dont l'expression est régulée par la signalisation GDNF, a également été identifié comme un acteur important pour l'auto-renouvellement, et donc pour le maintien des SSCs *in vitro*. En effet, la

transfection d'un ARN interférent dirigé contre l'ARN messager du gène *Lhx1* aboutit à une diminution du nombre de SSCs en culture (Oatley, Avarbock, et Brinster 2007).

Les cellules identifiées comme spermatogonies indifférenciées dans le testicule de souris qui expriment la protéine CXCR4, récepteur de la chémokine CXCL12, possèdent des capacités de cellules souches. L'inhibition du gène codant la protéine dans les cultures primaires de spermatogonies indifférenciées entraînent une diminution de la prolifération des cellules ainsi qu'une augmentation de la transition vers les stades progéniteurs, associées à une perte des SSCs (Yang et al. 2013).

La protéine ETV5 apparaît comme un acteur essentiel de la signalisation GDNF puisqu'elle régule l'expression des marqueurs BCL6B, LHX1 et CXCR4 dans les SSCs *in vitro* (Wu et al. 2011). L'utilisation d'ARN interférent contre les transcrits du gène *Etv5* entraîne une diminution du nombre de cellules germinales en culture.

Les SSCs ont la capacité de régénérer l'épithélium et n'exprimeraient pas ou présenteraient une hétérogénéité dans l'expression de certains gènes tels que *Neurog3*, *Lin28* et *Kit* (Helsel et al. 2017), suggérant qu'ils ne seraient pas impliqués dans le maintien du pool de cellules germinales indifférenciées.

Le facteur de transcription NEUROGENIN3, exprimé dans les spermatogonies progénitrices (Yoshida et al. 2004), permet l'entrée en différenciation des SSCs (Kaucher, Oatley, et Oatley 2012). Les spermatogonies qui n'expriment pas ce marqueur présentent un potentiel de cellule souche important, à l'inverse les cellules NGN3+ ont un potentiel de différenciation élevé (Yoshida et al. 2006). Les spermatogonies indifférenciées exprimant NGN3 ne contribuent donc pas au pool de SSCs ; cependant, après une déplétion des spermatogonies (induite par un traitement au busulfan), ces cellules participent à la restauration du pool de cellules souches, suggérant ainsi une « reprogrammation » des cellules progénitrices NGN3+ en SSCs.

Le marqueur LIN28, également impliqué dans la pluripotence des cellules, est exprimé uniquement par les spermatogonies indifférenciées (Zheng et al. 2009). Il est impliqué dans la régulation du nombre de cellules germinales (West et al. 2009). Cette protéine ne semble pas jouer un rôle dans le maintien du pool de SSCs. Cependant elle permet de réguler les divisions des spermatogonies A indifférenciées, étape essentielle à la régulation de la taille du pool de cellules progénitrices (Chakraborty et al. 2014).

La prolifération des spermatogonies permet donc l'obtention d'un pool de cellules germinales indifférenciées suffisant pour le maintien des capacités reproductrices tout au long de la vie de l'individu. Une partie des spermatogonies entrent ensuite en différenciation, par vague, pour assurer la production des spermatozoïdes testiculaires.

3. Différenciation des spermatogonies

Après l'amplification du nombre de spermatogonies au cours de la phase proliférative, les spermatogonies Aal entrent en différenciation pour devenir des spermatogonies A1 et changent de morphologie. Ces dernières vont se diviser par mitose 6 fois pour former successivement les spermatogonies A2, A3, A4, les spermatogonies intermédiaires (In) puis les spermatogonies B. Les spermatogonies B se divisent ensuite en spermatocytes primaires pré-leptotènes qui entreront ensuite en méiose (de Rooij 2001).

Les spermatogonies vont perdre leur capacité à s'auto-renouveler au cours de leur différenciation. Ces étapes de différenciation nécessitent de nombreux facteurs, intrinsèques mais aussi extrinsèques aux spermatogonies.

La FSH est indispensable au maintien de la spermatogenèse à l'âge adulte. Une altération des niveaux de FSH ou la perte de son activité entraîne une apoptose des spermatogonies et une perte du nombre de cellules germinales différenciées chez le rat (Russell et al. 1993), (Singh et Handelsman 1996). En effet, la FSH contrôle l'expression de nombreux gènes au sein de cellules de Sertoli tels que *Abp* (*Androgen Binding Protein*) (Morris et al. 1988), *Ldh* (*lactate déshydrogénase*) (Short et al. 1994), *Igf-1* (Pitetti et al. 2013), *Kit-ligand*, *Gdnf* (Khanehzad et al. 2021), et *Vegf* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Tian et al. 2016), qui contribuent ensemble au contrôle de la prolifération, de la survie et de la différenciation des spermatogonies (Sadate-Ngatchou, Pouchnik, et Griswold 2004).

De plus, les régulateurs transcriptionnels SOHLH1 et SOHLH2 sont exprimés dans toutes les spermatogonies à l'exception de celles exprimant la protéine GFRA1. L'invalidation de l'un de ces gènes, ou de ces deux gènes, entraîne une altération de la différenciation des spermatogonies. En effet, SOHLH1 et SOHLH2 régulent l'expression de gènes nécessaires à la différenciation des cellules indifférenciées tels que *Sox3* (*Sex determining region Y-bOX 3*) (Suzuki et al. 2012).

La différenciation des spermatogonies est dépendante de nombreux facteurs apportés par les cellules somatiques. Les acides rétinoïques sont des régulateurs de la transition des

spermatogonies Aal vers le stade A1 chez le rat et chez la souris. En l'absence de vitamine A, la majorité des cellules germinales resteront au stade de spermatogonies indifférenciées. Les acides rétinoïques exercent en partie leurs actions *via* leurs récepteurs RARs (*Retinoic Acid Receptor*) et RXRs (*Retinoid X Receptor*). A partir du développement embryonnaire et jusqu'à la puberté, l'expression du cytochrome CYP26B1 permet de maintenir de faibles concentrations en acides rétinoïques (Bowles et al. 2006). L'expression du gène *Cyp26b1* est ensuite réprimée pour permettre l'augmentation des niveaux d'acides rétinoïques. L'effet premier des RAs sur les spermatogonies progénitrices est la traduction des transcrits codant les protéines KIT et STRA8 *via* des effets non génomiques du récepteur RAR, qui activent la signalisation P13K/AKT/mTORC (Busada et al. 2015).

L'acquisition de l'expression du gène *Kit* dans les spermatogonies Aal est une étape cruciale pour promouvoir la différenciation des spermatogonies vers le type A1. KIT est un récepteur membranaire tyrosine kinase indispensable à la différenciation normale des spermatogonies (Besmer et al. 1993), (Zhang et al. 2011). Il est exprimé dans certains progéniteurs des spermatogonies Aal, dans les spermatogonies en différenciation et jusqu'aux spermatoctes pré-leptotène. L'inactivation de *Kit* ou de son ligand *Kit-l* entraîne une infertilité chez les souris mâles (Besmer et al. 1993). La protéine STRA8 a été identifiée en 1996 comme un initiateur de la méiose dans les cellules germinales mâles (Oulad-Abdelghani et al. 1996). Les souris invalidées pour le gène *Stra8* sont infertiles puisqu'elles présentent une altération du processus méiotique, associée à une condensation précoce des chromosomes (Anderson et al. 2008), (Mark et al. 2008). Cependant, le mécanisme par lequel STRA8 est impliqué dans la progression méiotique reste encore à élucider, puisqu'il a été démontré récemment que les animaux infertiles après inactivation du gène *Stra8* présentent des spermatoctes, toutefois incapables de terminer le processus de différenciation méiotique (Gewiss, Shelden, et Griswold 2021). Il a également été suggéré récemment que les acides rétinoïques ne sont pas le seul signal de différenciation. En effet, une étude montre que la différenciation des cellules germinales peut se dérouler normalement en l'absence de signalisation RA (Teletin et al. 2019).

La synthèse testiculaire des acides rétinoïques est complexe et fait intervenir de nombreux types cellulaires. Les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli ainsi que les cellules myoïdes périvitubulaires et les macrophages participent à leur biosynthèse *via* l'action d'enzymes spécialisées (Livera et al. 2002), (DeFalco et al. 2015), (Meistrich et Shetty 2015), (Potter et DeFalco 2017). DeFalco et ses collaborateurs ont montré en 2015 que les macrophages possèdent des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides rétinoïques. L'ablation des

macrophages dans le testicule adulte de souris conduit à une diminution du nombre de cellules germinales. Cette altération est corrélée à une diminution de la prolifération et de la différenciation des cellules germinales, toutefois sans impact sur les SSCs, suggérant un rôle des macrophages dans le spermatogénèse, potentiellement en lien avec la signalisation des acides rétinoïques (DeFalco et al. 2015).

Un autre régulateur potentiel de la différenciation des spermatogonies est l'activine A, codée par le gène *Inhba* (*Inhibin Subunit Beta A*). Une étude a montré que l'activine A diminue *in vitro* le pool de cellules germinales souches et leur capacité à former des colonies dans des expériences de transplantation (Nagano et al. 2003). Nagano et ses collaborateurs suggèrent que cette molécule diminue le pool de SSCs en augmentant leur recrutement dans les processus de différenciation.

Les cellules de Sertoli sécrètent également des protéines de transport essentielles au transfert d'ions métalliques tels que la transferrine ou la céruloplasmine (Sylvester et Griswold 1994), de lipides tels que la clusterine ou la saposine (Law et Griswold 1994), ou encore d'hormones nécessaires à la différenciation des cellules germinales post-méiotiques. De plus, le glucose et le lactate sont indispensables pour le métabolisme des cellules germinales (Nakamura, Okinaga, et Arai 1984), (Voigt et al. 2021). En effet, en fonction de leurs stades de différenciation, le métabolisme des cellules germinales diffère. Les SSCs utiliseraient le lactate alors que les cellules germinales dans des stades plus avancés de différenciation utiliseraient préférentiellement le glucose (Voigt et al. 2021). La production de lactate à partir du glucose et son approvisionnement dans le compartiment apical est pris en charge par les cellules de Sertoli (Robinson et Fritz 1981) qui possèdent des transporteurs spécifiques qui captent le glucose circulant, le transforment et l'acheminent jusqu'aux cellules germinales (Rato et al. 2010).

De plus, les facteurs de croissance IGF-1, IGF-2 et TGF α sont eux aussi produits par les cellules de Sertoli et favorisent la différenciation *in vitro* des spermatogonies en spermatocytes (Nakayama, Yamamoto, et Abé 1999), (Tajima et al. 1995). Le facteur IGF-1 permet entre autre la diminution de la mort cellulaire par apoptose des cellules germinales (Yao et al. 2017).

Les spermatogonies qui seront passées par ces étapes de différenciation donneront naissance à des spermatocytes primaires pré-leptotènes prêts à entrer en méiose.

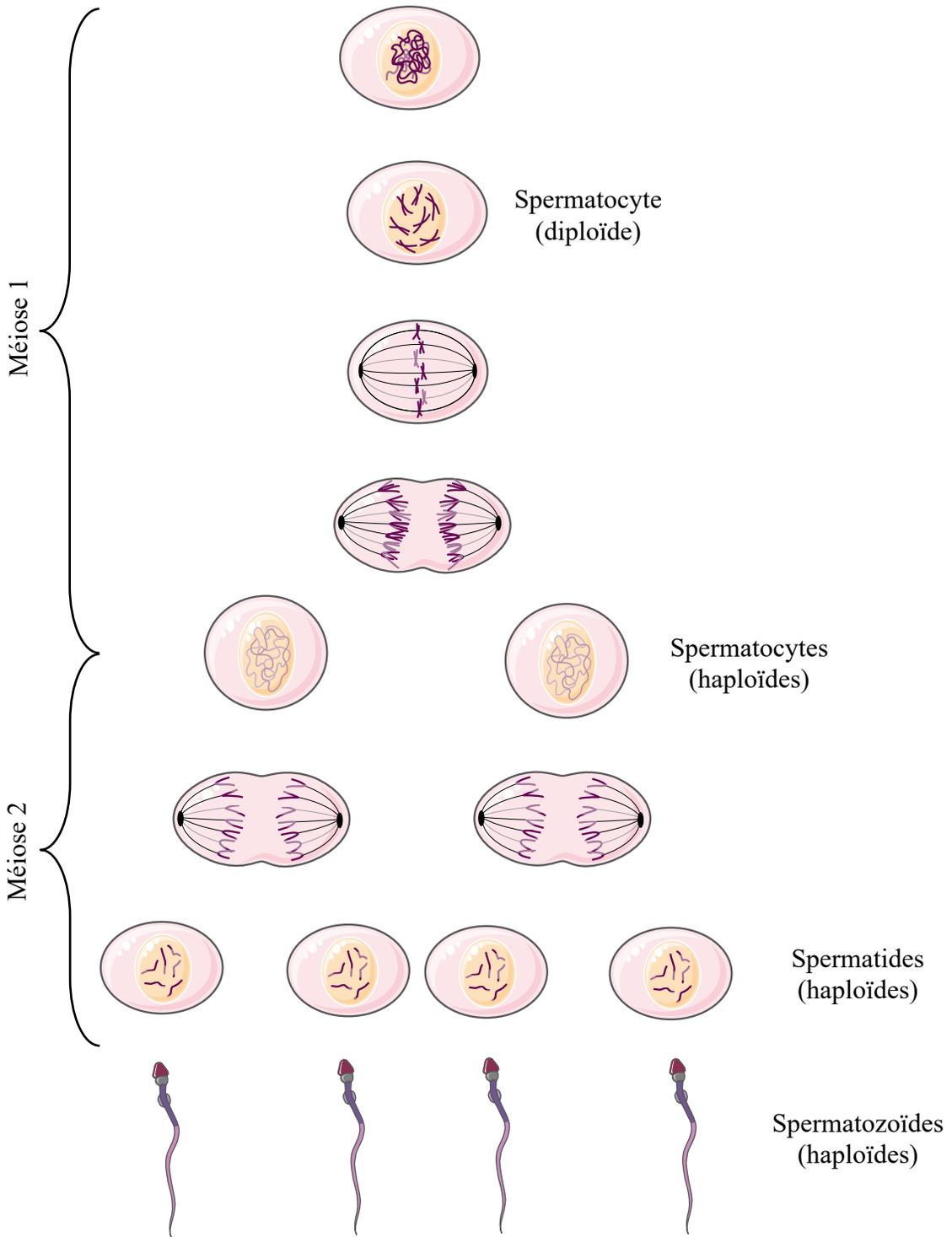


Figure 15 : Schéma représentatif de la méiose

La première division méiotique est une division réductionnelle qui permet de passer d'un spermatocyte primaire diploïde à deux spermatocytes secondaires haploïdes. La seconde division méiotique est dite équationnelle, elle permet la formation de deux spermatides ronds à partir d'un spermatocyte secondaire.

4. Méiose

La méiose est un processus spécialisé de deux divisions cellulaires couplées, propre aux cellules germinales qui constitue chez les eucaryotes la base de la reproduction sexuée. En effet lors de la gamétogenèse, cette étape permet à partir d'une cellule mère diploïde $2n$ (spermatocyte primaire contenant deux copies de chaque chromosome à 2 chromatides) de produire quatre cellules filles haploïdes n (spermatides rondes contenant une copie de chaque chromosome à 1 chromatide), (**Figure 15**).

Chaque division méiotique est divisée en 5 grandes étapes : prophase, métaphase, anaphase, télophase et cytotélerèse. Lors de la première division méiotique, le nombre de chromosome est réduit de moitié, elle est alors dite réductionnelle. La prophase I, intervenant au cours de la première division méiotique, représente 90% de la durée totale de la méiose et se subdivise elle-même en 5 stades faisant référence à l'état de compaction de l'ADN : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. Deux événements importants ont lieu à ce stade. Tout d'abord les spermatocytes leptotènes, initialement présents dans le compartiment basal de l'épithélium séminifère, traversent la barrière hémato-testiculaire pour rejoindre le compartiment apical. L'ouverture de la BHT est transitoire et nécessite en premier lieu une dissociation des interactions entre deux cellules de Sertoli (jonctions serrées). De plus, pour la progression des cellules germinales au sein du tube séminifère la rupture des contacts entre une cellule de Sertoli et une cellule germinale est également nécessaire. L'ensemble de ces interactions sont dynamiques et seront reformées pour assurer l'homéostasie de l'épithélium séminifère. Puis, au cours du stade pachytène, un autre événement essentiel se produit, la recombinaison méiotique. Elle correspond à des échanges réciproques de matériel génétique entre deux chromatides de chromosomes homologues maternels et paternels. On parle aussi de recombinaison homologue, elle permet le brassage de l'information génétique et ainsi la formation de cellules germinales porteuses d'un matériel génétique unique.

Les événements uniques de la méiose ont lieu au cours de cette première division appelée méiose I. La seconde division, la méiose II, est, par de nombreux aspects, très similaire à la mitose, elle est dite équationnelle. Cette fois, ce sont les chromatides sœurs qui se répartissent entre les deux cellules filles. Un spermatocyte secondaire, sortant de la première phase, produira donc deux spermatides rondes à n chromosomes à la fin de la méiose II.

Au cours de ce processus essentiel de différenciation, une vague d'apoptose touche les spermatocytes primaires pour permettre le bon déroulement de la spermatogenèse (W. Xiong

et al. 2009), adaptant ainsi le nombre de cellules germinales aux nombres de cellules de Sertoli (Print et Loveland 2000) et permettant l'élimination des cellules germinales qui présentent des anomalies (Blanco-Rodríguez, Martínez-García, et Porras 2003). C'est grâce aux cellules de Sertoli que seront éliminées les cellules germinales apoptotiques puisqu'elles présentent une activité de phagocytose (Yefimova et al. 2008). Cette élimination permet de réduire la libération de contenus toxiques au sein de l'épithélium et constitue également une source d'énergie considérable pour les cellules de Sertoli qui utilisent les lipides membranaires dans leur métabolisme (W. Xiong et al. 2009).

La signalisation associée aux androgènes est également indispensable au processus méiotique. En effet, les souris invalidées pour le récepteur AR spécifiquement dans les cellules de Sertoli présentent un blocage de la spermatogenèse au stade spermatocyte primaire, entraînant une infertilité des animaux (Chang et al. 2004). Cette observation est associée à une forte apoptose des cellules germinales et à des défauts des fonctions sertoliennes (De Gendt et al. 2004). En effet, les cellules de Sertoli présentent des altérations morphologiques entraînant une perméabilité de la BHT. Ces défauts s'expliquent par l'altération du transcriptome des cellules de Sertoli et notamment par l'altération de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation des interactions cellules – cellules. Les cellules de Sertoli expriment de nombreux gènes codants des protéines d'interaction cellulaire et régulés par la signalisation AR tels que *Claudin3 (Cldn3)*, (Meng et al. 2005), *Cldn11 (Claudin11)*, *Pem (Polymorphic epithelial mucin)*, *Tubb3 (Tubulin beta 3 class III)* et *Cx43 (Connexin 43)*. De plus, l'inhibition de la production des androgènes ou l'altération de la fonction du récepteur AR entraînent une apoptose massive des cellules germinales et un blocage de la spermatogenèse en première division méiotique (Layman et McDonough 2000), (Chang et al. 2013). Ces altérations décrivent un rôle essentiel de la production de testostérone par les cellules de Leydig pour le maintien des fonctions sertoliennes, nécessaires à la méiose des cellules germinales.

La méiose des cellules germinales requiert également d'autres voies de signalisation dépendantes des cellules de Sertoli. La nociceptine est une molécule produite par les cellules de Sertoli, sous l'influence de la FSH (Eto et al. 2012). La nociceptine en agissant sur son récepteur OPR1 (*12-OxoPhytodienoate Reductase 1*), exprimé spécifiquement dans les spermatocytes, induit la phosphorylation de REC8 (Eto, Shiotsuki, et Abe 2013), une protéine impliquée dans la dynamique des chromosomes au cours de la méiose. La nociceptine est donc un des acteurs majeurs de la progression méiotique. Par ailleurs, la BHT, correspondant aux interactions entre deux cellules de Sertoli, possède également à ce stade un rôle immunitaire

essentiel. Elle permet d'isoler les cellules germinales de la circulation sanguine et donc de délimiter un environnement privilégié, séparant les cellules germinales du système immunitaire. En effet, elle prévient l'entrée des lymphocytes dans le compartiment luminal de l'épithélium, évitant ainsi la production d'anticorps auto-immuns à l'origine d'infertilité (Fijak, Bhushan, et Meinhardt 2011), (Francavilla et al. 2007).

5. Spermio-genèse

La spermio-genèse est le processus final de différenciation des gamètes au cours de la spermatogenèse. Elle correspond à la maturation des spermatides rondes en spermatozoïdes testiculaires immatures. Elle débute dès la fin de la première division méiotique équationnelle. La spermio-genèse est subdivisée en 16 étapes chez la souris, chacune associée à des changements morphologiques indispensables pour la genèse des spermatozoïdes fonctionnels (Hess et Renato de Franca 2008).

Les spermatides rondes sont caractérisées par leur noyau arrondi (stades 1 à 8). Chaque spermatide ronde présente une diversité importante au niveau de leur transcriptome. Néanmoins, de manière générale leur activité transcriptomique est élevée et de nombreux ARNs non codants sont notamment synthétisés (Soumillon et al. 2013). Entre les stades 9 et 12, les ARN messagers codant certaines protéines, notamment les protéines de transition TNP1/TNP2 (*Transition Protein 1/2*) et les protamines PRM1/PRM2 (*Protamin 1/2*), sont transcrits (Green et al. 2018). Les protéines de transition synthétisées au cours de la spermio-genèse participent au remplacement des histones par les protamines au moment de la compaction chromatinienne. Au cours des stades 9 à 12, les spermatides vont s'allonger progressivement ; puis entre les stades 12 et 14, elles présentent une chromatine compacte inactive associée à une réduction de leur activité transcriptionnelle. A partir de l'étape 14 et jusqu'à l'étape 16, une grande partie du cytoplasme est éliminée, le flagelle et l'acrosome se développent, et le noyau se condense de plus en plus pour devenir complètement inactif transcriptionnellement.

i. Compaction de la chromatine

Un remaniement majeur de la structure de la chromatine est nécessaire pour la maturation des cellules germinales en spermatozoïdes. En effet, le noyau subit une réorganisation morphologique associée à une condensation progressive de la chromatine. Pour obtenir une compaction maximale, une des étapes initiales essentielles est l'hyperacétylation des histones H4 qui permet d'obtenir initialement une chromatine plus relâchée (Shirakata et

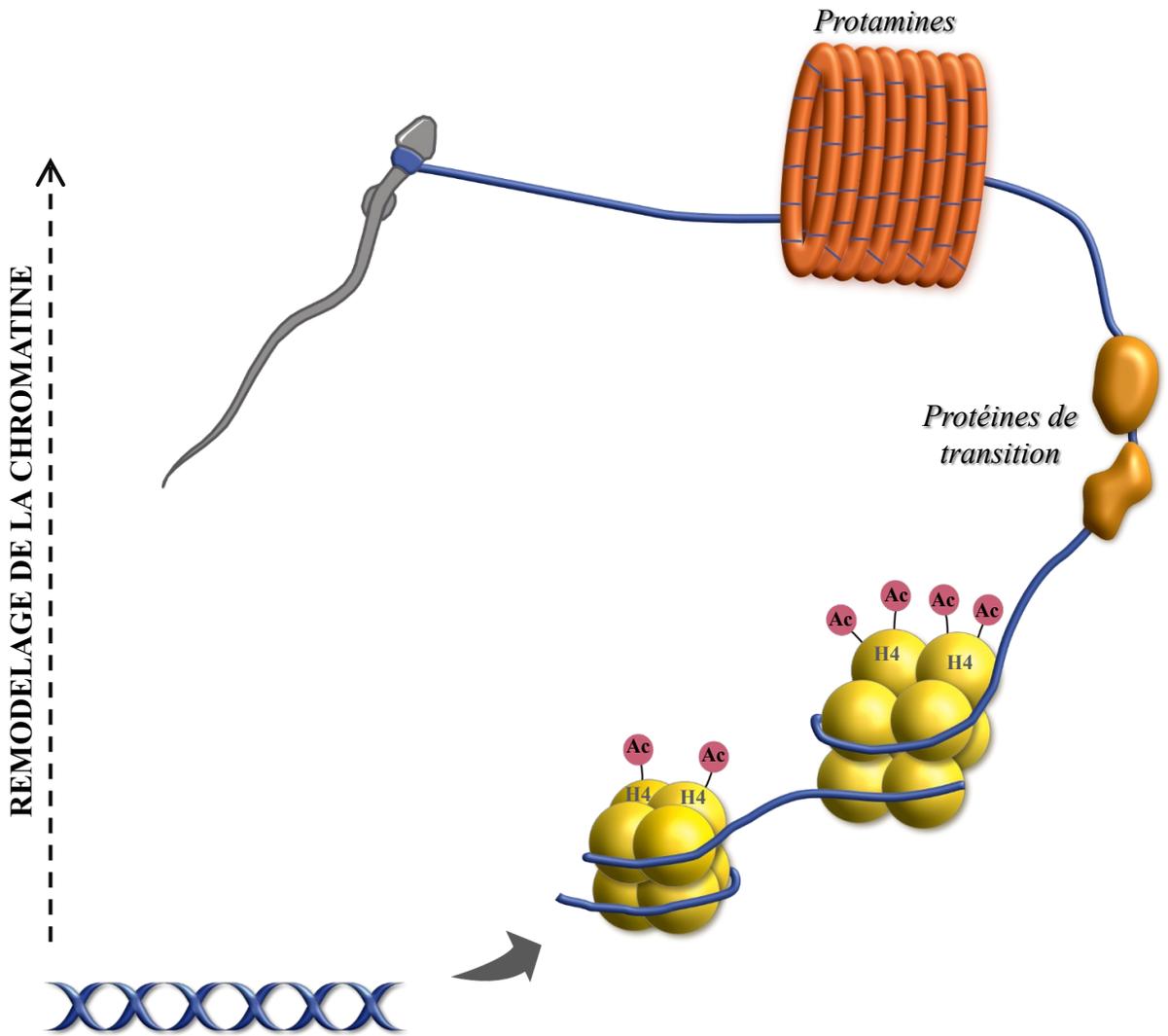


Figure 16 : Le remplacement des histones par les protamines.

L'hyperacétylation de l'histone H4, reconnue par les protéines BRDT, permet le remodelage de la chromatine dans un état plus relâché pour assurer le remplacement des histones par les protéines de transition puis par les protamines. La TOP2B facilite l'élimination des variants d'histone et leur remplacement par les protéines de transitions.

BRDT : Bromodomain testis-specific

TOP2B : topoisomérase II beta

al. 2014). Les protéines NUT (*Nuclear protein in testis*), P300 (*E1A binding protein P300*) et CPB (*CREB binding protein*) sont des HATs (*Histone acetyltransferases*) impliquées dans le processus d'hyperacétylation des histones H4, notamment au niveau des résidus Lysine 5 et Lysine 8 (Shiota et al. 2018).

Une fois hyperacétylées, les histones sont reconnues par les protéines BRDT (Bromodomain testis-specific) qui permettent d'initier le remodelage de la chromatine dans un état plus relâché (Pivot-Pajot et al. 2003). Chez la souris, l'inactivation du gène *Brd7* conduit à un développement anormal des spermatozoïdes, une altération de la formation de l'acrosome des spermatozoïdes, associés à la stérilité des animaux (Heran Wang et al. 2016).

Un consensus scientifique établit il y a quelques décennies suggère que le relâchement initial de la chromatine permet de remplacer en grande majorité les histones associées à l'ADN par des protéines basiques dites de transition (TNP1 et TNP2), qui seraient ensuite à leur tour remplacées par des protéines nucléaires spécifiques du testicule : les protamines (PRM1 et PRM2), (Wouters-Tyrou et al. 1998), (**Figure 16**). Cependant, l'utilisation de souris doublement invalidées pour les gènes *Tnp1/2* suggèrent que les protéines TNP1/2 ne sont pas indispensables au remplacement des histones par les protamines (Shirley et al., 2004, Zhao et al., 2004a, Zhao et al., 2004b). De plus, une étude récente a montré que les protéines de transition ne seraient finalement pas incorporées au nucléosome. Les auteurs suggèrent en effet que le variant d'histone H2A.L.2, coexprimé avec les protéines de transition au moment de l'éviction des histones, serait incorporé au nucléosome, permettant ainsi le recrutement des protéines de transition qui elles-mêmes serviraient de « guide » pour assurer le recrutement et l'incorporation des protamines (Barral et al. 2017).

Les cellules germinales mâles expriment d'autres variants d'histones, dont certains sont exclusivement détectés au sein du testicule tels que H1T, H1T2, TH2A et TH2B, qui sont également remplacés au cours de la spermiogenèse (Bao et Bedford 2016).

Le remplacement progressif des histones et des variants d'histones par les protamines est également associé aux cassures ADN, provoquées par la topoisomérase II beta (TOP2B), (Leduc et al. 2008) qui facilite l'élimination des variants d'histones. De plus, il a été démontré que la protéine PARP1 (poly(ADP-ribose) polymérase 1) se lie à la TOP2B et réalise une poly(ADP-ribosylation). Cette ribosylation permet à la protéine TOP2B de se séparer de la molécule d'ADN. Une autre protéine, PARG (Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase), va finalement digérer ce poly(ADP-Ribose), permettant la séparation de PARP1 et TOP2B et

assurant ainsi l'initiation d'un nouveau cycle. Ces données impliquent que les cassures ADN soient réparées au cours du remplacement histones – protamines.

La transition histones - protamines entraîne la condensation du génome des spermatides rondes et la formation des spermatides allongées. Les modifications des histones (méthylation, acétylation etc.) entraînent l'activation ou la répression de l'expression des gènes, alors que les protamines sont moins permissives et ne permettent quasiment pas d'expression génique (Gannon et al. 2014). De nombreuses protéines sont impliquées dans ces étapes de compaction de la chromatine. Par exemple, les souris invalidées pour *Sirt1*, qui code une lysine désacétylase, présentent une altération de la localisation de la protéine TNP2, associée à une altération de la maturation spermatique conduisant à une hypofertilité révélée par une diminution du nombre et de la qualité des spermatozoïdes (Coussens et al. 2008). Aussi, l'inactivation génique de *Chd5* (*Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 5*) qui code une hélicase impliquée dans le remodelage de la chromatine entraîne une diminution de l'acétylation de l'histone H4 et une rétention des histones dans les cellules germinales associée à une diminution du nombre de spermatides allongées et donc à une hypofertilité (Zhuang et al. 2014). Une étude suggère également que FOXO1 pourrait être impliquée dans la différenciation des stades plus tardifs de la lignée germinale et notamment au moment de la spermiogenèse (Goertz et al. 2011).

Les protamines sont très riches en résidus cystéine, elles seront liées les unes aux autres par de nombreux ponts disulfures, permettant ainsi un état de compaction maximal de l'ADN. Le génome est alors moins sensible aux agressions physiques et chimiques générées en présence d'agents mutagènes. L'intégrité de l'information génétique sera préservée tout au long de la progression des spermatozoïdes dans les voies génitales mâles et femelles jusqu'à la fécondation.

L'intégration des protamines permet également de constituer un code épigénétique essentiel à l'établissement du programme transcriptionnel du zygote lors des premières étapes du développement (Rousseaux et al. 2008). Ce code épigénétique est formé de trois éléments structurels : les protamines, les histones et la matrice nucléaire. La matrice nucléaire constitue une structure nucléaire squelettique impliquée dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN.

ii. Formation du corps résiduel

Tout au long de la spermiogenèse, la spermatide ronde s'allonge et la taille de son cytoplasme est réduite progressivement. Celui-ci, ainsi que les organites cytoplasmiques, migrent du pôle céphalique vers le pôle caudal du futur spermatozoïde, le long du flagelle en croissance. L'élimination progressive du cytoplasme entraîne la formation du corps résiduel. Il sera pris en charge et phagocyté par les cellules de Sertoli à la fin de la spermiation (Kerr et de Kretser 1974). La membrane des phagosomes est digérée par les cellules de Sertoli et une partie de leurs composants est recyclée, permettant ainsi un nouveau cycle de spermatogenèse.

iii. Développement de l'acrosome

L'acrosome est un organite qui se forme dans la tête du spermatozoïde, sa membrane enveloppe le noyau. Il sera essentiel à la dégradation de la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation (grâce à l'action d'enzymes hydrolytiques dont il est composé) permettant au gamète mâle d'atteindre la membrane plasmique du gamète femelle. Il est constitué de vésicules de l'appareil de Golgi qui ont migré et fusionné (Ramalho-Santos et al. 2001).

iv. Développement du flagelle

Le flagelle commence à se développer dès l'initiation de la spermiogenèse. Il permettra la mobilité du spermatozoïde grâce à des mouvements ondulatoires. Les microtubules qui proviennent du centriole distal s'assemblent peu à peu pour former l'axonème, le squelette du flagelle. L'axonème est entouré à sa base d'un grand nombre de mitochondries. Elles apportent l'énergie (ATP, Adenosine triphosphate) nécessaire au mouvement du flagelle, assurant en partie la motilité du spermatozoïde.

6. Spermiation

La spermiation est le processus par lequel les spermatozoïdes sont relargués dans la lumière des tubes séminifères. C'est la dernière étape de la spermatogenèse, elle est donc déterminante pour le nombre de spermatozoïdes présents dans l'épididyme. La spermiation est un processus complexe qui implique des changements au sein des spermatides et des cellules de Sertoli. Les événements clés de ce processus incluent un remodelage nucléaire et cytoplasmique des spermatides (permettant la formation des spermatozoïdes), une suppression des jonctions ES (*Ectoplasmic specialization*) des cellules de Sertoli, une rétractation du cytoplasme des cellules de Sertoli et enfin le passage des spermatides dans la lumière.

Tout au long de la spermatogenèse, les cellules de Sertoli synthétisent des protéases et des anti-protéases permettant la progression des cellules germinales au sein de l'épithélium séminifère et le relargage des spermatozoïdes dans la lumière, via une dynamique des jonctions cellules-cellules (Mruk et al. 2003). Les jonctions ES se forment entre les spermatides et les cellules de Sertoli, mais également entre cellules de Sertoli. Ces jonctions sont associées notamment aux microtubules et à des protéines motrices pour permettre la progression des spermatides au sein de l'épithélium séminifère pendant la spermiogenèse (Guttman, Kimel, et Vogl 2000).

Au début de la spermiation, les spermatides allongées s'alignent le long de la lumière. Une spermatide allongée possède toujours une partie de son cytoplasme, lui-même entouré par le cytoplasme d'une cellule de Sertoli. La tête et le flagelle des spermatides vont s'étendre progressivement dans la lumière du tube séminifère au cours de la spermiation. Pendant cette extension, le volume du cytoplasme des spermatides ne varie pas ; cependant il reste ancré à la membrane basale alors que la tête et le flagelle sont « poussés » dans la lumière. (França et al. 2016). Il a également été observé que le réticulum endoplasmique des cellules de Sertoli subit des changements dynamiques au cours de la spermiation (Ye et al. 1993).

La dernière étape de ce processus est le relargage des spermatides matures dans la lumière, qui sont alors appelées spermatozoïdes ; elle nécessite la rupture des jonctions ES *via* des mécanismes qui restent encore peu identifiés. Il a cependant été décrit que les protéines PA (*Plasminogen Activator*) et CP-2 (*Cyclin Protein-2*) participent à la dégradation des molécules d'adhésion qui lient les spermatides aux cellules de Sertoli (Erickson-Lawrence, Zabludoff, et Wright 1991) (Vihko, Suominen, et Parvinen 1984). La majeure partie du cytoplasme d'une spermatide va se condenser et sera séparée de la cellule pour former le corps résiduel qui demeurera dans l'épithélium séminifère après le relargage. De plus, au moment où les cellules germinales rejoignent la lumière, le peptide F5 est produit au niveau des jonctions ES ce qui va perturber l'intégrité de la BHT *via* la déstabilisation des microfilaments d'actine et des microtubules. Cela permet de faire coïncider la spermiation avec l'ouverture de la BHT, permettant le passage des spermatocytes primaires pachytènes et participant ainsi à la synchronisation des vagues de la spermatogenèse (Gao et al. 2016).

A ce stade, les spermatozoïdes ne sont pas complètement matures, ils sont immobiles et donc incapable de féconder un ovocyte. Cependant leur maturation va se poursuivre une fois qu'ils auront atteint l'épididyme. La chromatine va continuer à se condenser tout au long de ce

processus, notamment par la formation de ponts disulfures entre les protamines, rendant ainsi le spermatozoïde inactif transcriptionnellement.

7. Maturation post-testiculaire

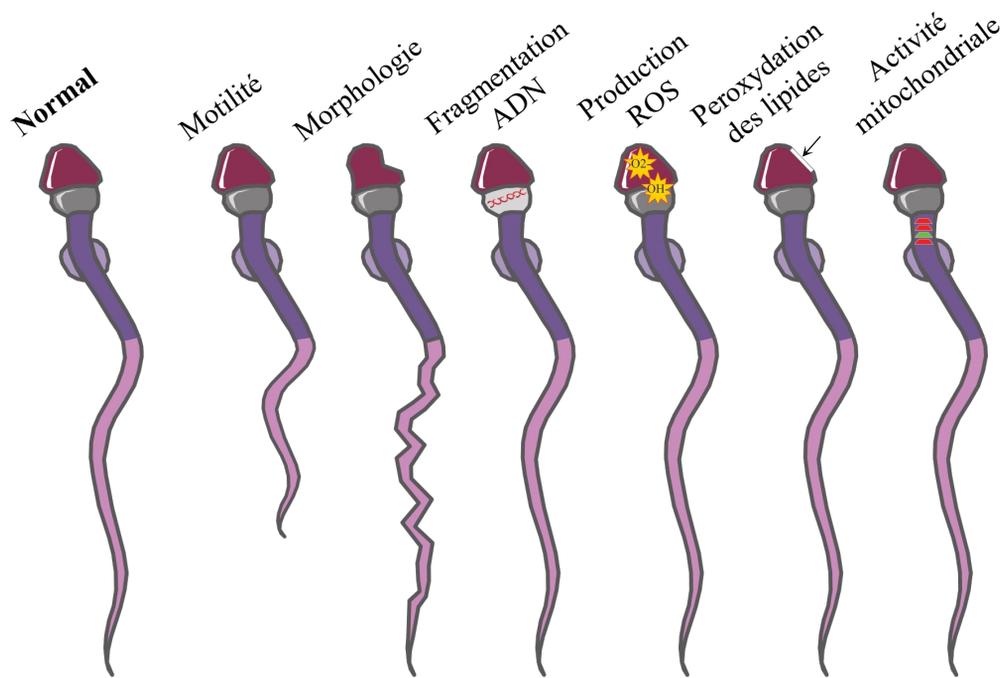
Chez les mammifères après la spermatogenèse testiculaire, les spermatozoïdes demeurent 1 à 2 semaines dans l'épididyme pour continuer leur maturation. Etant donné que l'ADN spermatique est hautement condensé et transcriptionnellement inactif, la maturation post testiculaire dépend exclusivement d'interactions entre les spermatozoïdes et les éléments extracellulaires présents dans le fluide épидидymaire environnant.

Les cellules épithéliales de l'épididyme sécrètent en effet de nombreux facteurs dans la lumière de l'épididyme tels que des protéines (phosphatases, protéases, inhibiteurs de protéases, glucosidases et glycosyltransférases), des ARNs et des ions créant ainsi un microenvironnement optimisé pour une maturation optimale des spermatozoïdes. Ces derniers subissent alors des modifications au niveau de leur membrane spermatique, mais également au niveau de leur protéome et de leur épigénome (H. Chen, Alves, et Belleannée 2021). Pendant ce processus, les cellules épithéliales épидидymaires produisent notamment des vésicules appelées épидидymosomes, capables de fusionner avec les spermatozoïdes et de libérer des petits ARNs impliqués dans la maturation spermatique (Conine et Rando 2022).

Une fois que le spermatozoïde a atteint les voies génitales femelles, il va subir d'autres événements de maturation notamment la capacitation qui permet l'obtention du pouvoir fécondant (Bedford 1970). Elle est caractérisée par des modifications de la membrane du spermatozoïde indispensables pour la réaction acrosomique et la fécondation à venir.

A l'issue de ces différentes étapes de différenciation, le spermatozoïde sera alors mature et sera capable après fécondation de permettre l'obtention d'un zygote, résultat de la fusion du gamète mâle, le spermatozoïde avec le gamète femelle, l'ovocyte.

La mise en place et le maintien de la spermatogenèse sont donc des processus complexes qui nécessitent des interactions cellulaires multiples. Au cours de ces processus, de nombreux acteurs vont intervenir pour maintenir l'homéostasie des différents sous-types de cellules germinales et permettre la fertilité de l'individu. Puisque la production des gamètes requiert une régulation fine, de nombreux facteurs notamment environnementaux peuvent perturber les différentes signalisations impliquées et entraîner une infertilité.



ALTERATIONS QUALITATIVES

ALTERATIONS QUANTITATIVES

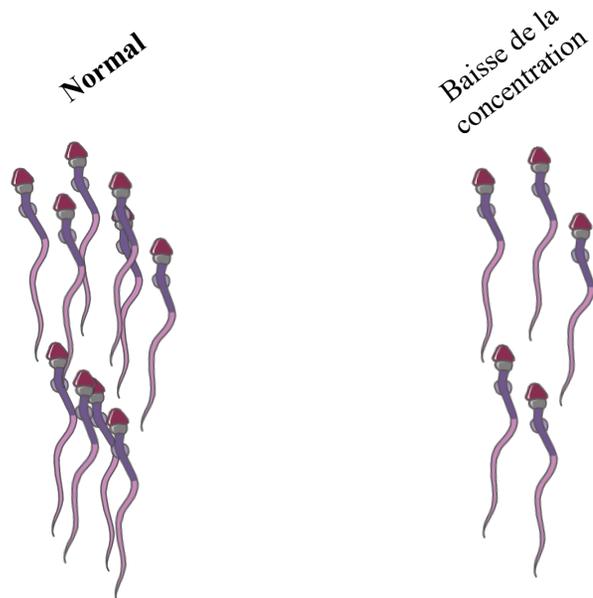


Figure 17 : Les impacts des polluants environnementaux sur les spermatozoïdes.

Les molécules environnementales polluantes peuvent avoir de nombreux impacts sur la spermatogenèse. En effet, elles peuvent impacter la production qualitative notamment en altérant la motilité et/ou la morphologie des spermatozoïdes, en fragmentant la molécule d'ADN, en produisant des ROS, en entraînant une peroxydation des lipides ou encore en altérant l'activité des mitochondries. De plus, les polluants peuvent également impacter la concentration spermatique via des altérations quantitatives de la production des gamètes.

ROS : Reactive oxygen species

D. Atteintes testiculaires et facteurs environnementaux

L'infertilité est un problème de santé publique en constante augmentation depuis quelques décennies. Dans le monde, chez la moitié des couples dits infertiles, une altération de la fonction reproductive masculine est retrouvée. L'étiologie de l'infertilité masculine est souvent multifactorielle, résultant de l'interaction entre des paramètres génétiques, comportementaux et environnementaux, ce qui rend complexe le diagnostic de cette pathologie.

Ces dernières années, une quantité considérable de contaminants environnementaux a été libérée dans l'environnement par les activités agricoles et industrielles et par le développement urbain. Ces composés peuvent être désignés sous le terme général de xénobiotiques et comprennent notamment les médicaments et les drogues, les plastiques, les additifs alimentaires, les biocides, les polluants organiques persistants et bien d'autres. Un xénobiotique est une substance étrangère à l'organisme, qui est capable d'interagir avec la cellule vivante. Les xénobiotiques pénètrent dans l'organisme par ingestion, inhalation, absorption cutanée ou par injection (Themes 2017). Selon la dose, certains xénobiotiques sont toxiques, mutagènes, cancérigènes ou encore de puissants perturbateurs endocriniens (Štefanac, Grgas, et Landeka Dragičević 2021).

La pollution environnementale expose donc progressivement les organismes vivants à de nombreuses molécules toxiques qui ont des effets secondaires, notamment sur l'homéostasie des tissus et des organes reproducteurs. Des études ont montré que les altérations quantitative et qualitative des gamètes par ces polluants environnementaux (**Figure 17**) affectent les capacités reproductives à plusieurs niveaux : la fécondation, le développement embryonnaire, le taux de gestation et le nombre de naissances viables (Gallo, Boni, et Tosti 2020). De plus, la communauté scientifique témoigne aujourd'hui de préoccupations accrues quant à l'impact du mode de vie sur les fonctions reproductives. En effet, dans le monde moderne, les habitudes alimentaires, les problèmes de poids, et la consommation excessive de tabac et d'alcool sont corrélés à des altérations de la fertilité (Sharma et al. 2013).

Bien que certaines causes d'infertilité soient désormais identifiées, les mécanismes moléculaires de ces pathologies et notamment ceux impliquant des facteurs environnementaux restent à identifier. En effet, malgré le fait que certains contaminants pourraient être présents dans l'environnement depuis plusieurs décennies, ils ne sont soumis à investigations que depuis quelques années.

Mes recherches s'inscrivent dans un contexte d'hypofertilité corrélée à des expositions environnementales, c'est pourquoi cette partie sera consacrée à la survenue d'atteintes testiculaires en lien avec les expositions à certains facteurs environnementaux.

1. Les polluants environnementaux et leurs modes d'action

L'humanité a atteint le seuil de pollution chimique et plastique à ne pas dépasser, sous peine de conséquences brutales et imprévisibles, alerte une étude publiée au début de l'année 2022 (Persson et al. 2022). Mais quels sont les polluants à prendre en compte pour définir ce seuil ? La question est délicate puisqu'une multitude de molécules chimiques sont présentes dans l'environnement. De plus, leurs productions augmentent très rapidement depuis quelques décennies. Ces polluants peuvent pénétrer au sein des organismes, impactant les organes et mettant en péril les grandes fonctions physiologiques. Toute classification est souvent critiquable étant donné la diversité des molécules à classer. Dans la suite de cette partie introductive, nous aborderons l'impact sur la fertilité des perturbateurs endocriniens, d'autres polluants environnementaux et de leurs modes d'action ainsi que l'impact du mode de vie sur la fonction de reproduction.

i. Les perturbateurs endocriniens

La communauté scientifique a déjà décrit de nombreux xénobiotiques comme présentant une activité de perturbateurs endocriniens (PEs). D'après la définition de l'Union Européenne, les PEs sont des molécules chimiques qui peuvent interférer avec le système hormonal et ainsi être nocif pour l'Homme et la faune. Leurs interférences avec les signalisations hormonales naturelles représentent notamment une menace pour la reproduction de nombreuses espèces dont l'Homme (Colborn et Clement 1992), (Gonsioroski, Mourikes, et Flaws 2020). Le grand nombre de PEs identifiés inclut une variété de produits chimiques notamment les pesticides, les herbicides, les composés chimiques perfluorés et les plastifiants. Une étude épidémiologique réalisée au Danemark a révélé que les hommes avec de forts taux de substances per- et polyfluoroalkylées (PFAS) dans le sang présentent une diminution significative du nombre de spermatozoïdes normaux dans l'éjaculat (Joensen et al. 2009). Cependant, si dans cette étude aucune altération significative de la signalisation des hormones hypophysaires (telles que FSH et LH) n'a été corrélée aux altérations observées, d'autres ont déjà identifiées les PFAS comme perturbateurs endocriniens puisque capables d'interagir avec le récepteur de l'hormone thyroïdienne T4 (Kar et al. 2017).

Les PEs peuvent avoir une multitude d'action : ils sont capables d'altérer la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison ou encore l'élimination des hormones endogènes (Kavlock et al. 1996). En fait, une étude récente décrit leurs impacts sur le système endocrinien selon 9 mécanismes d'action différents : 1- Liaison au récepteur et activation de sa signalisation, 2- Liaison au récepteur et inhibition de sa signalisation, 3- Interaction avec la signalisation en aval du récepteur, 4- Stimulation de la biosynthèse hormonale endogène, 5- Inhibition de la biosynthèse hormonale endogène, 6- Liaison à une protéine de liaison hormonale circulante, 7- Stimulation ou inhibition de la synthèse ou de la dégradation d'une protéine de liaison hormonale, 8- Stimulation de l'expression d'un récepteur hormonal, et 9- Inhibition de l'expression d'un récepteur hormonal. Seulement 2 de ces mécanismes impliquent que les PEs se lient directement au récepteur de l'hormone (Combarous et Nguyen 2019).

Les PEs peuvent altérer la signalisation de récepteurs d'hormones stéroïdiennes tels que le récepteur des androgènes, le récepteur des œstrogènes, le récepteur des hormones thyroïdiennes et le récepteur des glucocorticoïdes, mais aussi celle de récepteurs moins étudiés, dont des récepteurs orphelins tels que AhR (*Aryl hydro-carbon receptors*), CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) ou PXR (*Pregnan X Receptor*), (Lauretta et al. 2019).

Certains PEs tels que le BPA (Bisphénol A) sont capables de moduler l'activité des récepteurs ER α et ER β (*Estrogen receptor*) dans le testicule. En effet, le BPA prévient la fixation du 17 β -estradiol sur ces récepteurs, empêchant ainsi la transcription des gènes stéroïdogènes et altérant la fonction testiculaire (Rehman et al. 2018). Le plastifiant DEHP (*Di(2-ethylhexyl) phtalate*) ainsi que le BPA ont également la capacité de se lier aux récepteurs des androgènes. Ils entrent donc en compétition avec la testostérone et entravent la translocation nucléaire du récepteur (Borch et al. 2006) (H. Wang et al. 2017), empêchant la transcription de ces gènes cibles et affectant la physiologie testiculaire. De plus, des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que, les PEs peuvent également affecter l'expression et/ou l'activité d'enzymes cruciales pour la reproduction mâle (Sifakis et al. 2017). Par exemple, certains phtalates comme le DEHP inhibent l'expression des gènes *Cyp17a1* (*Cytochrome P450 17A1*) et *Hsd3b2* (*3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II*) dans les cellules de Leydig. Ces gènes codent des enzymes de la stéroïdogénèse, leur dérégulation va donc inhiber la synthèse de testostérone, altérant *in fine* les fonctions de reproduction (Foster 2005). De même, l'exposition périnatale de souris ou l'exposition de cultures primaires de cellules Leydig au DEHP conduit à une diminution du nombre de transcrits du gène *Insl3* (*Insulin-like 3*). Ce gène code une enzyme essentielle pour la descente testiculaire pendant la vie fœtale. Ces données suggèrent que

l'exposition au DEHP pourrait notamment être à l'origine de certains cas de cryptorchidie (défaut de migration/descente testiculaire) et donc d'infertilité. Le glyphosate est un herbicide qui présente une toxicité émergente chez de nombreuses espèces. Par exemple, il a été montré chez le rat que l'exposition au glyphosate augmente sévèrement les transcrits du gène codant l'aromatase, enzyme permettant la transformation des androgènes en œstrogènes. Cette donnée est corrélée avec une augmentation du nombre de spermatozoïdes morphologiquement anormaux et une altération de la fertilité (Cassault-Meyer et al. 2014).

Aussi, il faut noter que les PE n'ont pas uniquement des impacts sur les signalisations hormonales. En effet, les PE n'induisent pas un seul effet spécifique, mais sont souvent des molécules pléiotropes, ayant une diversité d'effets. Ils seraient ainsi capables d'altérer l'expression de gènes par leur génotoxicité, leur cytotoxicité et leur capacité à modifier les profils épigénétiques (Combarous et Nguyen 2019).

Les PE peuvent provoquer des dommages ADN durant la spermatogenèse en dérégulant l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Il a été montré que des concentrations urinaires et sanguines en DEHP et ses métabolites, notamment le MEHP (*Mono(2-éthylhexyl)phtalate*), sont corrélées à des dommages de l'ADN spermatique dans différentes populations humaines (Hauser et al. 2007), (Wang et al. 2016). Dans ce contexte, il a été démontré que le DEHP induit une apoptose des spermatocytes en augmentant l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX (*Bcl-2 Associated X-protein*) et en diminuant celle de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Fu et al. 2017). Le BPA peut également causer des dommages à l'ADN, *via* le récepteur ER mais également indépendamment de la signalisation oestrogénique (Aghajanzpour-Mir et al. 2016). La capacité des bisphénols, des phtalates et des parabènes à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive oxygen species*), leur vaut la caractéristique d'agents génotoxiques (Gassman 2017), (Song et al. 2019), (Samarasinghe et al. 2018). Une augmentation de la concentration des ROS entraîne un stress oxydant qui endommage la molécule d'ADN par la phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et le variant d'histone H2AX. De plus, une augmentation des niveaux de ROS peut également induire une apoptose dépendante de la caspase 3 (George et Rupasinghe 2018).

Si la plupart des toxines environnementales n'entraîne pas de modifications génétiques, elles peuvent cependant drastiquement influencer l'épigénome, et par conséquent altérer la physiologie cellulaire (McCarrey 2012). Les altérations environnementales des marques

épigénétiques, sur l'ADN ou les histones, sont appelées épimutations. Si ces modifications touchent directement les cellules germinales, alors elles sont susceptibles d'être transmises à travers les générations.

Le BPA a été largement impliqué dans les modifications de méthylation de l'ADN au niveau du promoteur de certains gènes, parfois entraînant une hypométhylation et d'autres fois une hyperméthylation, notamment en fonction du temps d'exposition, de l'espèce, du type cellulaire et des gènes impliqués (Doshi et al. 2011), (Miao et al. 2014). Il a également été rapporté que l'exposition au BPA affecte l'acétylation des histones *via* l'altération de l'expression d'enzymes catalysant l'acétylation ou la désacétylation des histones (Chen et al. 2017), et pouvant ainsi impacter la spermatogenèse (González-Rojo et al. 2019).

ii. Les autres perturbateurs environnementaux

Les biocides tels que les pesticides, les herbicides et les fongicides (dont certains sont des PEs) sont utilisés mondialement. Leurs effets sur les capacités reproductives sont nombreux : altérations testiculaires, dysfonctionnements des mitochondries, altération de la spermatogenèse (qualitative ou quantitative) et infertilité. Une étroite corrélation entre l'exposition aux pesticides et une diminution de la qualité spermatique a été démontrée depuis environ deux décennies (Swan 2006). Récemment, une étude a montré que l'herbicide atrazine entraîne des modifications épigénétiques de l'ADN des spermatozoïdes chez le rat, accompagnées de maladies développementales avec une transmission transgénérationnelle (McBirney et al. 2017). De plus, l'insecticide diazinon est lui aussi responsable de dysfonctionnement de la reproduction mâle. En effet, il agit *via* de multiples mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à des dommages de l'ADN, une diminution de l'activité mitochondriale et une augmentation de la mort des cellules germinales associés à une augmentation de la production de ROS (Harchegani et al. 2018).

De plus, certaines molécules utilisées en chimiothérapie et notamment les agents alkylants sont responsables d'altérations de la spermatogenèse et donc de la fertilité. Les patients pré-pubertaires sont plus à risque de développer une infertilité à long terme, puisqu'ils ne produisent pas encore de spermatozoïdes, rendant difficile la préservation de leurs gamètes (Poganitsch-Korhonen et al. 2017). Le busulfan est un agent cytotoxique utilisé par exemple pour préparer les patients à une greffe de moelle osseuse. Le busulfan est un agent alkylant qui va entraîner la mort cellulaire *via* la génération d'espèces réactives de l'oxygène et de liaisons covalentes entre les brins de l'ADN. Au niveau testiculaire, le busulfan entraîne l'apoptose

des spermatogonies souches ou indifférenciées *via* la génération de nombreux dommages à l'ADN et la dérégulation de leur transcriptome (Thirouard et al. 2021). Une dose unique à plus de 30mg/kg entraîne chez la souris une azoospermie complète 56 jours après le traitement. A des doses plus faibles, certaines spermatogonies survivent mais entraînent la génération de spermatozoïdes morphologiquement anormaux, conduisant donc à une hypofertilité (Bucci et Meistrich 1987).

Il a également été démontré que l'exposition à différents métaux induit du stress oxydant *via* l'accumulation de ROS, qui a des effets nocifs sur la peroxydation de la membrane plasmique des lipides (Wang et al. 2017). Dans les modèles mammifères comme la souris, l'accumulation de plomb altère les principales fonctions spermatiques et la fertilité (Li et al. 2018). De plus, le cadmium est l'un des métaux les plus toxiques en raison de sa longue demi-vie et de son abondance élevée. Il est aussi mal excrété par l'organisme et va s'accumuler dans les organes reproducteurs. Cette accumulation entraîne des altérations qualitatives des gamètes résultant en une diminution de la fécondation et des taux de reproduction (Marettová, Marettá, et Legáth 2015).

Une relation étroite a été établie entre les polluants atmosphériques et les altérations de la qualité spermatiques ces deux dernières décennies (Rubes et al. 2005). En particulier, il a été montré que les particules fines en suspension dans l'air sont génotoxiques pour la cellule germinale mâle, induisant des dommages à l'ADN et des altérations fonctionnelles des spermatozoïdes (Somers 2011).

iii. Les impacts du mode de vie sur la fertilité masculine

Une mauvaise alimentation peut conduire au surpoids, à l'obésité et au diabète, ce qui augmente le risque de maladies métaboliques, liées à une accumulation excessive de graisse dans les tissus adipeux. Cette accumulation peut entraîner des modifications au niveau hormonal. De nombreuses études épidémiologiques ont rapporté une corrélation significative entre le fait d'être en surpoids ou obèse et les troubles de la fertilité, souvent associé à un hypogonadisme entraînant une diminution de la production de testostérone (Liu et Ding 2017). En plus d'affecter l'axe pituitaire-gonade, l'obésité provoque des effets secondaires sur les paramètres spermatiques, modulés indirectement par un dysfonctionnement des cellules de Sertoli ou par une température trop élevée du scrotum associé à un stress oxydant. De plus le tissu adipeux représente le principal lieu de stockage des molécules polluantes qui s'attachent facilement aux lipides. Une corrélation inverse entre le tour de taille et le nombre de

spermatozoïdes ainsi que leur motilité a été démontrée, associée à des altérations de l'activité mitochondriale et de l'intégrité de l'ADN. Si les mécanismes d'action de ces impacts délétères restent à identifier, les résultats de fécondation *in vitro* et les taux de grossesse impliquant des hommes en surpoids appuient cette relation de cause à effet. En effet, une réduction de 15% de l'efficacité de la fécondation *in vitro* a été observée chez les hommes en surpoids comparé aux hommes présentant un indice de masse corporelle normal. De même, une augmentation d'environ 15% de la mortalité *in utero* a été observée lorsque le père est en surpoids (Bellastella et al. 2019).

Des études comparatives entre fumeurs et non-fumeurs ont montré une corrélation entre le tabagisme et une diminution non seulement du nombre de spermatozoïdes mais aussi de leur motilité et de leur viabilité. De plus, le nombre de spermatozoïdes morphologiquement anormaux est aussi plus élevés chez les fumeurs, avec un impact dépendant de la dose et de la durée de l'exposition (Bundhun et al. 2019). De plus, parmi les nombreuses molécules toxiques présentes dans les cigarettes, du cadmium est retrouvé. Ce dernier est associé à des dommages à l'ADN corrélés à un stress oxydant et à une hypofertilité. De plus, de nombreuses études sur des modèles animaux appuient ces données. Elles montrent en effet que l'exposition à la nicotine diminue significativement le nombre de spermatozoïdes et leur motilité, et augmente les dommages à l'ADN et les défauts de la spermatogenèse, conduisant ainsi à l'infertilité (J.-B. Dai, Wang, et Qiao 2015).

L'abus d'alcool altère également les paramètres physiologiques spermatiques tels que le volume, la concentration, la motilité et la morphologie. La consommation excessive d'alcool est notamment associée à une apoptose des cellules germinales, corrélée à des désordres génétiques comme la fragmentation de l'ADN. Ces défauts affectent la fécondation et le développement embryonnaire (Muthusami et Chinnaswamy 2005), (Borges et al. 2018).

2. L'impact de la dose, de la durée, de la fenêtre développementale d'exposition et de l'effet cocktail

Si la nature du xénobiotique est essentielle pour comprendre son impact sur la santé, la dose, la durée et la fenêtre d'exposition déterminent aussi des facteurs de risque importants (Diamante et al. 2017). De plus, il est également nécessaire d'intégrer aux études sur les xénobiotiques, les impacts d'une exposition à de multiples molécules, appelée effet cocktail, qui reflète de la diversité de molécules chimiques présentes dans l'environnement.

L'évaluation de l'effet de la dose d'un xénobiotique est fondamentale puisqu'à certaines doses, même les plus faibles, des altérations physiologiques peuvent survenir (« Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment », s. d.). En effet comme évoqué précédemment, le busulfan à faible dose peut interférer avec les fonctions cellulaires et altérer la qualité spermatique. A de fortes doses, il peut provoquer la mort cellulaire et entraîner une forte diminution du nombre de spermatozoïdes (Bucci et Meistrich 1987). Une étude chez le rat montre également que les effets de l'insecticide deltaméthrine au niveau testiculaire sont dépendants de la dose. Les animaux sont traités pendant 28 jours à 2, 3 ou 6mg/kg de deltaméthrine. Si les effets sur les paramètres associés à la fonction de reproduction sont moindres à 2mg/kg, à 6mg/kg les rats présentent de nombreuses altérations notamment une diminution du poids des testicules, une diminution du nombre de spermatozoïdes et du nombre de spermatozoïdes morphologiquement normaux, une baisse de leur motilité ainsi qu'une réduction des taux de testostérone, de LH et de FSH dans le sérum (Sharma, Singh, et Jan 2014). Cependant, il est essentiel de rappeler que lorsque l'on schématise la relation entre la dose et l'effet d'un xénobiotique, on obtient généralement une droite, qui croit à mesure que la dose augmente. Cette relation est dite monotone. Mais dans certains cas, les courbes peuvent par exemple avoir l'allure d'un U. Cela signifie que l'effet maximal n'est pas nécessairement obtenu avec les doses les plus fortes. Ce phénomène appelé dose-réponse non monotone est connu et décrit depuis longtemps en pharmacologie. Il n'est pas spécifique aux PE, mais est décrit pour certains d'entre eux (Vandenberg et al. 2012). Ces données compliquent l'établissement par exemple de la dose journalière admissible d'un polluant, qui représente la quantité d'une substance qu'un individu devrait pouvoir ingérer chaque jour, sans risque pour la santé.

Il est également connu depuis plusieurs décennies qu'une exposition aigue à un xénobiotique peut entraîner des impacts différents d'une exposition chronique. Par exemple, l'exposition aigue de souris au cobalt a des effets minimes sur la capacité reproductive des animaux. Si une faible baisse de la fertilité est observée, ni le nombre de spermatozoïdes épидидymaire ni le poids des testicules ne sont affectés. En revanche, une exposition chronique conduit à une forte diminution de la concentration spermatique associée à une altération des niveaux de testostérone, affectant ainsi la fertilité des souris (Pedigo, George, et Anderson 1988). Les effets d'une exposition aigue à un polluant sur les capacités de reproduction sont souvent identifiés pendant une évaluation de la fertilité masculine. Cependant, une grande partie des infertilités demeure idiopathique. Il est important de noter que les expositions chroniques

aux xénobiotiques sont difficiles à identifier. En effet, établir une corrélation entre une exposition passée et un trouble de la fertilité n'est pas aisée, puisque l'histoire (la fréquence et la dose) de l'exposition est presque impossible à déterminer *a posteriori* ; ces expositions chroniques sont pourtant très fréquentes. Il a toutefois été montré que ces expositions ont des effets dramatiques sur la spermatogenèse, impactant ainsi la fertilité (Gabrielsen et Tanrikut 2016).

Des études utilisant des modèles animaux ainsi que des études épidémiologiques ont montré que des expositions dans des périodes précoces (périnatales) à des polluants environnementaux peuvent notamment altérer la physiologie testiculaire et prédisposer à une infertilité à l'âge adulte. Par exemple, l'exposition néonatale de rats mâles au BPA conduit à une hypofertilité à l'âge adulte. Cette observation s'explique notamment par une diminution du nombre de spermatozoïdes ainsi qu'à des déséquilibres hormonaux (Salian, Doshi, et Vanage 2009). De plus, l'exposition gestationnelle de la femelle rat au linuron, un herbicide, entraîne chez la descendance mâle des défauts structurels des tubes séminifères et des cellules de Leydig, corrélés à une diminution significative de la production de testostérone, altérant la fertilité des animaux (Ding et al. 2017). Le fipronil est un autre biocide largement utilisé. L'exposition de femelles rats à cet insecticide altèrent la motilité des spermatozoïdes dans la descendance, compromettant ainsi la qualité spermatique. Cependant, le ou les mécanismes d'action permettant d'expliquer cette observation restent à identifier (de Barros et al. 2017). Si les effets d'une exposition maternelle à des xénobiotiques peuvent avoir des effets délétères sur la descendance, les altérations produites dans les spermatozoïdes par une exposition paternelle sont cependant moins étudiées mais peuvent également avoir des impacts à long terme (Braun, Messerlian, et Hauser 2017). Ainsi, les périodes fœtales et néonatales, pendant lesquelles les organismes sont immatures, sont aujourd'hui définies comme les périodes les plus sensibles à l'exposition aux xénobiotiques.

Aussi, les organismes vivants sont de manière générale exposés à une multitude de polluants environnementaux. Il est donc essentiel de prendre en compte les impacts d'une exposition multiple, souvent définie sous le terme d'effet cocktail. Chez le rat mâle, il a été montré que l'exposition précoce au paracétamol et à un mélange de PEs induit des effets délétères à long terme sur le système reproducteur. Un des mélanges contient 4 composés oestrogéniques, un autre comprend 8 composés anti-androgéniques, et le dernier est constitué d'agents oestrogéniques, anti-androgéniques et de paracétamol. Le nombre de spermatozoïdes épидидymaires est significativement réduit à l'âge adulte dans tous les groupes exposés, malgré

des modes d'actions différents des molécules. Ces données révèlent notamment que l'exposition multiples à des PEs ayant une activité anti-androgénique réduit de manière significative la concentration spermatique et altère la fertilité des animaux, alors que seules, ces molécules ne présenteraient pas d'effets délétères (Axelstad et al. 2018).

L'ensemble de ces données doit nous alerter sur les impacts nombreux des polluants sur la fonction de reproduction, en prenant en compte la dose et la durée d'exposition mais aussi la fenêtre développementale et les expositions multiples auxquelles nous sommes tous exposés quotidiennement.

Les molécules toxiques telles que les xénobiotiques peuvent toutefois être éliminées par l'organisme grâce à des mécanismes de détoxification. En effet, des processus impliquant notamment des enzymes hépatiques permettent de réduire la toxicité de ces molécules (Guengerich, Waterman, et Egli 2016). L'expression de ces enzymes, indispensables pour la clairance hépatique, est finement régulée. Les récepteurs nucléaires CAR et PXR font partie des acteurs impliqués dans le contrôle du catabolisme des xénobiotiques (Wang et al. 2012). Le récepteur CAR étant au centre de ce projet, les rôles et mécanismes d'actions de PXR ne seront pas décrits dans la suite de l'introduction.

Partie 2 : Le récepteur nucléaire des xénobiotiques : CAR (NR1I3)

A. Généralités

Le récepteur CAR (*Constitutive Androstane Receptor*), également nommé NR1I3 (*Nuclear Receptor Subfamily 1 Group I Member 3*), est une protéine de 41 kDa (KiloDalton) et de 358 acides aminés qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces derniers constituent une famille de facteurs de transcription qui régulent un grand nombre de processus biologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, importants notamment pour la reproduction, le développement et le métabolisme. CAR est majoritairement exprimé dans le foie, même si son expression est détectée dans d'autres organes notamment le duodénum, le cerveau, le cœur et les reins (Uhlén et al. 2015).

B. Isolement, caractérisation et structure du récepteur CAR

Le gène *CAR* a été décrit pour la première fois en 1994 par Baes et *al.* à partir d'une banque d'ADNc (Acide désoxyribonucléique complémentaire) hépatiques humains. La

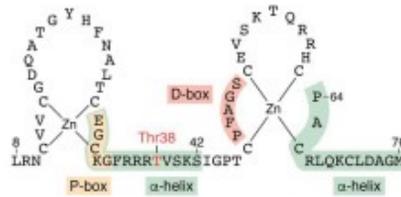
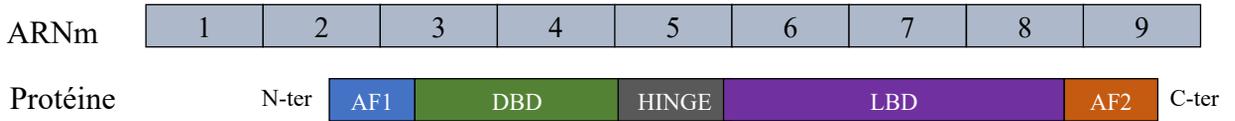


Figure 18 : Structure du récepteur hCAR

Représentation schématique de l'ARNm du gène *hCar*, de sa protéine, et de la séquence des acides aminés à l'intérieur du DBD. Le DBD du récepteur hCAR est composé de 2 doigts de zinc. La localisation de la thréonine 38 (Thr38) y est représentée, ainsi que celles des 2 hélices- α et des boîtes P (P-box) et D (D-box).

Domaine de transactivation indépendant du ligand AF1 (Activation function 1) ; domaine central de liaison à l'ADN (DBD) ; interface de dimérisation pour interagir avec RXR (HINGE) ; domaine de liaison au ligand (LBD, ligand binding domain) ; domaine de transactivation AF2 (Activation function 2) dépendant du ligand

D'après Negishi et al., 2020 / PMID: 32788213

recherche d'analogie avec une séquence particulière (boîte P) du domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) du récepteur à l'acide rétinoïque (RAR), du récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR) et d'autres récepteurs notamment HNF4 (*Hepatic Nuclear factor 4*) a permis l'identification de cette nouvelle protéine initialement nommée MB67 et apparentée aux récepteurs nucléaires dits orphelins (Baes et al. 1994). Cette étude a montré que le récepteur CAR se fixe sur une séquence directe espacée de 5 nucléotides (DR-5) typique des éléments de réponse aux acides rétinoïques (RARE). Cette fixation est constitutive, elle ne nécessite pas la présence de ligand, et est amplifiée par l'hétérodimérisation de CAR avec son partenaire RXR (*Retinoid x receptor*). Quelques années plus tard en 1997, le gène *Car* a également été identifié chez la souris à partir d'une banque d'ADNc hépatiques murin (Choi et al. 1997).

Les récepteurs CAR humain et murin (hCAR, mCAR) ont donc d'abord été identifiés comme des récepteurs nucléaires constitutivement actifs, potentiellement modulés par l'acide rétinoïque. Cependant leurs ligands endogènes demeurant encore inconnus, ils ont été affiliés à la sous famille des récepteurs orphelins. Comme les autres récepteurs nucléaires, CAR est une protéine modulatrice qui possède plusieurs domaines fonctionnels : un domaine de transactivation indépendant du ligand AF1 (*Activation function 1*) en position N-terminal, un domaine central de liaison à l'ADN (DBD) qui détermine la sélectivité des gènes cibles, une interface de dimérisation pour interagir avec RXR (HINGE), un domaine de liaison au ligand (LBD, *ligand binding domain*) en position C-terminal qui contient la poche de liaison du ligand (LBP, *ligand binding pocket*) et un domaine de transactivation AF2 (*Activation function 2*) dépendant du ligand (**Figure 18**).

Le gène hCAR se situe sur le chromosome 1, sur le locus 1q23. Il est composé de 9 exons, séparés par 8 introns. L'épissage alternatif du gène hCAR peut donner naissance à des isoformes. 15 isoformes ont été identifiées chez l'Homme, et 4 d'entre elles sont exprimées dans le foie (Auerbach et al. 2003). Il est prédit que chaque isoforme de hCAR possède une structure différente de l'isoforme principale au niveau de son LBD. Ce domaine remplit diverses fonctions : dimérisation, recrutement et transactivation. Diversifier le protéome d'un système xénosenseur, notamment par l'épissage alternatif, pourrait faciliter la capacité des organismes à s'adapter à leur environnement chimique. Une caractérisation plus poussée des isoformes de hCAR pourrait permettre d'identifier de nouvelles fonctions biologiques adaptatives en réponse à des expositions aux xénobiotiques.

<u>Molécule</u>	<u>Utilisation</u>	<u>Activateur de CAR</u>	<u>Inhibiteur de CAR</u>
BPA	Plastifiant	Souris	
Triclosan	Antibactérien		Souris Humain
DEHP	Plastifiant	Humain Souris	
PFOA	Tensioactif fluoré	Souris	
Chlorpyrifos	Pesticide	Souris	
Meclizine	Antihistaminique Antiémétique		Humain Souris
Clotrimazole	Antimycosique		Humain
Phénobarbital	Antiépileptique	Humain Souris	
Tebuconazole	Fongicide		Humain
Propiconazole	Fongicide	Souris	Humain

Figure 19 : Exemples de molécules modulatrices de CAR chez l'Homme et la souris.

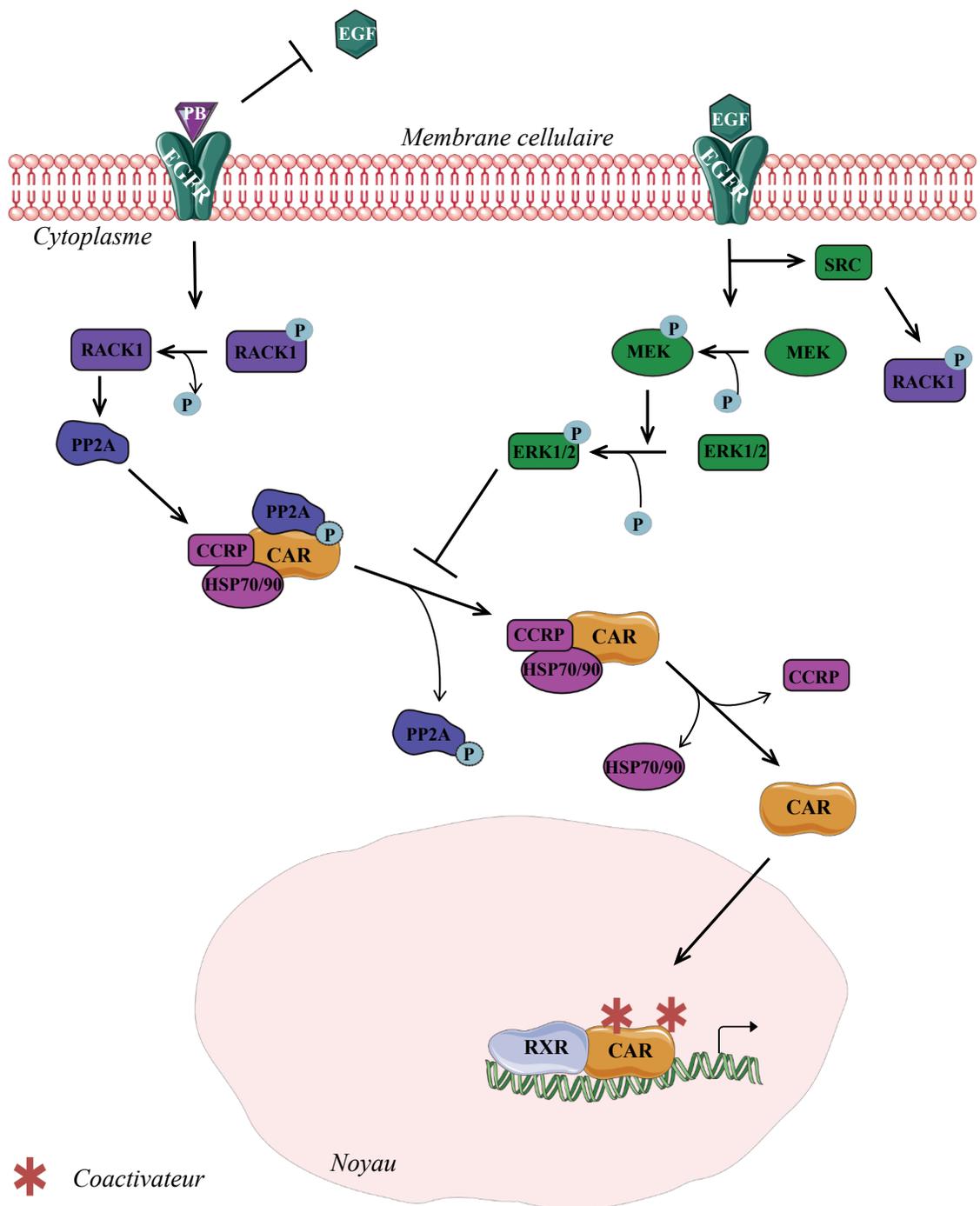
La première étude concernant le rôle de CAR a été réalisée en 1998 par Forman et al. qui ont décrit l'inhibition de l'activité constitutive de CAR par certains métabolites stéroïdiens tels que l'androstanol et l'androsténol (Forman et al. 1998). Cette étude montre également que l'effet de ces molécules naturelles est stéréospécifique : seules certaines formes d'androstanes sont actives (3alpha-hydroxy, 5alpha-reduced). Ces stéroïdes n'interfèrent pas avec l'hétérodimérisation du récepteur, ni avec sa liaison à l'ADN ; en revanche, ils entraînent le relargage des coactivateurs, initialement liés au LBD.

En 1998, CAR a été identifié comme un facteur régulant *in vitro* la transcription du gène *Cyp2b10* en réponse au phénobarbital (PB), (P. Honkakoski et al. 1998). En effet, CAR se fixe au niveau des éléments de réponse au phénobarbital (PBRE, *Phenobarbital Response Element*), un barbiturique aux propriétés anti convulsivantes, sédatives et hypnotiques, utilisé pour traiter les troubles épileptiques. Ces éléments induisent l'expression de gènes de la famille des cytochromes P450 (CYP) 2B en réponse à plusieurs classes de xénobiotiques (Trottier et al. 1995), (Honkakoski et Negishi 1997). Plusieurs études ont montré *in vivo*, grâce à l'invalidation de CAR, sa fonction de senseur de xénobiotiques. En effet, les souris invalidées pour CAR ne présentent plus d'activation du gène *Cyp2b10*, ni d'augmentation de la taille du foie et de la progression tumorale hépatique en réponse au PB (Wei et al. 2000), (Ueda et al. 2002). La protéine CAR est alors décrite comme un récepteur de xénobiotiques ayant une activité hépatique pro-tumorale.

Depuis de nombreuses études s'intéressent à identifier les nombreux ligands de CAR et les mécanismes d'action associés.

C. Ligands et mécanismes d'action

CAR a été décrit comme un récepteur nucléaire de xénobiotiques qui contrôle la détoxification hépatique d'agents chimiques étrangers mais aussi de molécules endogènes telles que les acides biliaires ou la bilirubine (Wei et al. 2000). De nombreuses molécules chimiques incluant des pesticides, des retardateurs de feu, des contaminants environnementaux, des médicaments et des substances chimiques industrielles sont aujourd'hui connues pour moduler l'activité de CAR chez l'homme ou chez d'autres espèces animales (Küblbeck, Niskanen, et Honkakoski 2020), (**Figure 19**). CAR est activé par une multitude de molécules, incluant le phénobarbital (barbiturique), la chlorpromazine (antiémétique), (Wei et al. 2002),



* Coactivateur

Figure 20 : Activation indirecte de la signalisation CAR.

Dans les conditions basales, lorsque la signalisation EGFR est active celle-ci entraîne la phosphorylation de la protéine CAR ce qui permet sa séquestration cytoplasmique par le complexe protéique CCRP - HSP70/90. La liaison du phénobarbital sur l'EGFR entraîne l'inactivation de la voie sous-jacente, permettant la déphosphorylation de la protéine RACK1. Cette dernière active la PP2A qui déphosphoryle CAR. La protéine CAR se dissocie des protéines cytoplasmiques qui la séquestrent et transloque dans le noyau pour former un hétérodimère avec RXR et se fixer au niveau de ses éléments de réponse. Le recrutement des coactivateurs permet alors la transcription des gènes cibles.

EGF(R) : Epidermal growth factor (receptor) ; HSP : Heat shock protein ; RACK1 : Receptor of activated C kinase 1 ; CCRP : Cytoplasmic CAR retention protein ; PP2A : phosphatase protein A2 ; ERK/MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; MEK/MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; SRC : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase src ; P : phosphorylation

l'acétaminophène (médicaments anti-inflammatoire), (Jun Zhang et al. 2002), le TCPOBOP (insecticide) et un métabolite de la bilirubine (Huang et al. 2003).

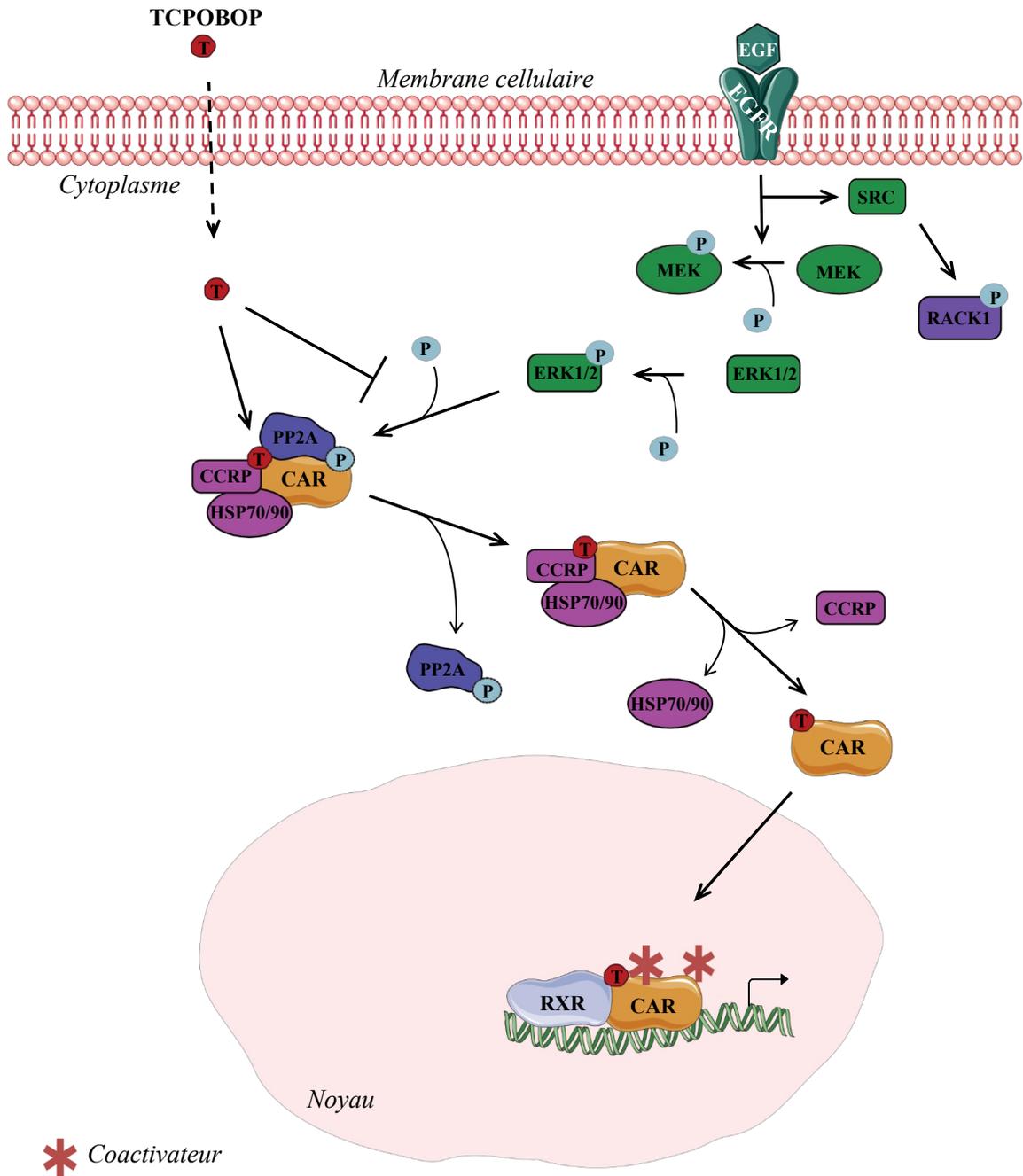
Les mécanismes régissant l'activité du récepteur CAR sont complexes et ne restent aujourd'hui que partiellement élucidés. En fonction des molécules, interagissant directement ou indirectement avec CAR, des signalisations spécifiques sont observées.

1. Activité constitutive

Comme pour les autres récepteurs nucléaires, l'activité transcriptionnelle de CAR est médiée par le recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs. Cependant, comparé aux autres récepteurs nucléaires, CAR possède une signalisation unique, caractérisée par sa fixation constitutive à ses éléments de réponse dans certaines lignées cellulaires. L'activité constitutive intrinsèque à la protéine CAR nécessite des mécanismes spécifiques de régulation, outre la liaison au ligand. Le récepteur CAR possède une petite hélice X qui oriente l'hélice H12 dans une conformation active. Aussi, l'hélice H12 du domaine AF2 n'a pas d'extension C-terminal, laissant donc un carboxylate libre et permettant de stabiliser la conformation active, même en absence de ligand, facilitant le recrutement de coactivateurs et permettant d'expliquer son activité constitutive (Xu et al. 2004).

2. Activation indirecte

CAR possède un mécanisme d'activation qui inclue une translocation et une activation nucléaire (Paavo Honkakoski, Sueyoshi, et Negishi 2003). Une autre caractéristique de la signalisation de CAR est le fait qu'un certain nombre de composés induisant son activité transcriptionnelle ne sont pas des ligands (Carazo et al. 2018) ; c'est-à-dire que le récepteur CAR peut être activé par des molécules endogènes et exogènes, sans forcément de liaison directe (Mackowiak et Wang 2016). Un exemple bien caractérisé de ce phénomène est celui du phénobarbital qui permet l'augmentation de l'expression de CYP2B *via* la translocation de CAR du cytoplasme vers le noyau, sans jamais se lier au récepteur (Kawamoto et al. 1999). Le phénobarbital induit une translocation indirecte de CAR par compétition avec l'EGF pour la liaison à son récepteur l'EGFR. Cette compétition empêche l'activité de la kinase SRC (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase src*) et permet la déphosphorylation de RACK1 (*Receptor of activated C kinase 1*). L'activation de la phosphatase PP2A qui en résulte (par RACK1) entraîne la déphosphorylation de CAR et sa translocation nucléaire (Mutoh et al. 2009), (**Figure 20**). Une fois dans le noyau, CAR s'hétérodimérise avec son partenaire RXR et se lie à ses éléments



* Coactivateur

Figure 21 : Activation directe de la signalisation CAR

La liaison du TCPOBOP sur CAR entraîne le recrutement de PP2A qui déphosphoryle CAR. La protéine CAR se dissocie des protéines cytoplasmiques qui la séquestrent et transloque dans le noyau pour former un hétérodimère avec RXR et se fixer au niveau de ses éléments de réponse. Le recrutement des coactivateurs permet alors la transcription des gènes cibles.

_EGF(R) : Epidermal growth factor (receptor) ; HSP : Heat shock protein ; RACK1 : Receptor of activated C kinase 1 ; CCRP : Cytoplasmic CAR retention protein ; PP2A : phosphatase protein A2 ; ERK/MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; MEK/MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; SRC : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase src ; P : Phosphorylation ; T : TCPOBOP.

de réponse. Ces propriétés font de CAR un récepteur unique au sein de la sous famille NR1I des récepteurs nucléaires.

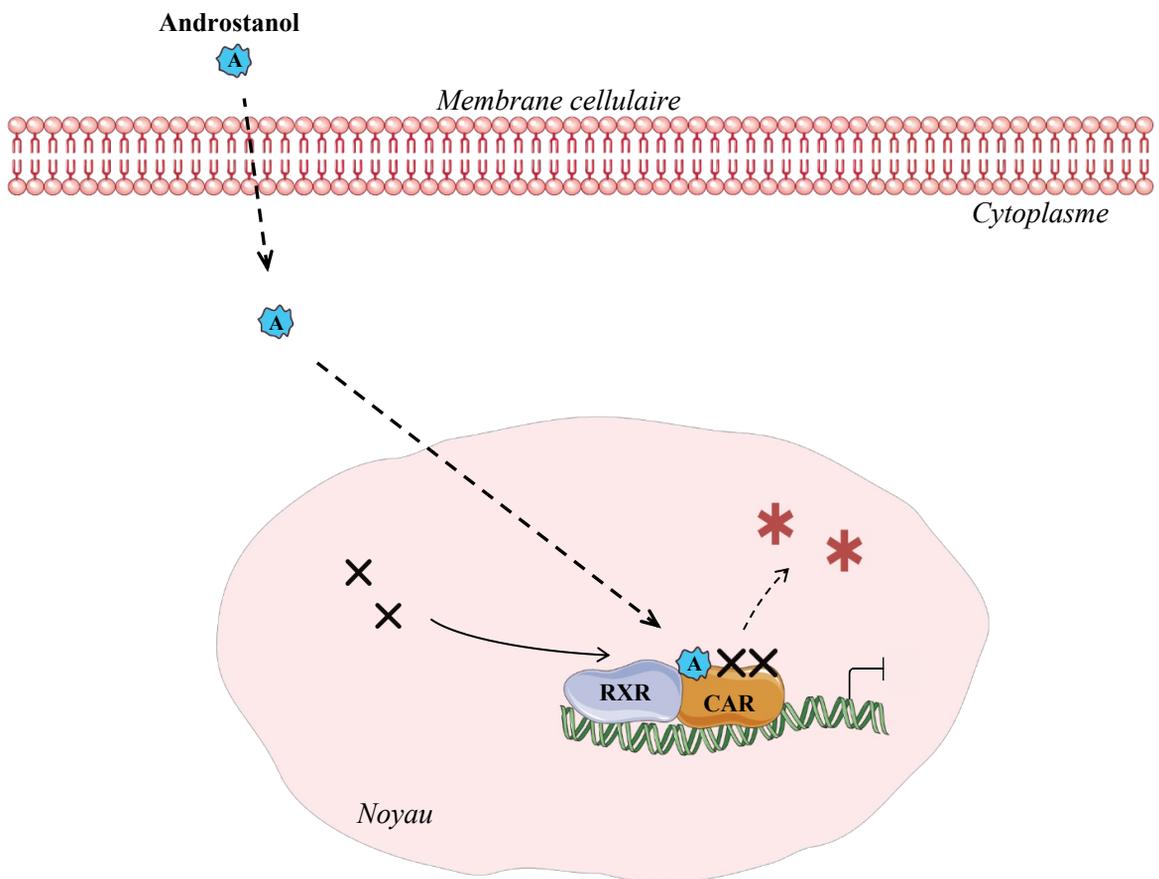
3. Activation directe

Des études biochimiques et structurales sur de nombreux récepteurs nucléaires ont démontré que la liaison du ligand agoniste au récepteur entraîne un changement conformationnel, associé à une activation transcriptionnelle. Ces changements de conformation sont caractérisés par l'alignement du domaine AF2 le long de la surface du récepteur, créant ainsi une nouvelle interface autorisant le recrutement de protéines co-activatrices. Ces changements sont nécessaires pour permettre l'activité transcriptionnelle et semblent conserver chez les récepteurs ayant une activation dépendante du ligand (Shan et al. 2004).

Certaines molécules peuvent aussi se lier directement à CAR pour moduler son activité, notamment certains composés ayant une action agoniste qui active la signalisation d'un récepteur (**Figure 21**).

Il est important de noter qu'une partie des ligands de CAR se recoupent avec ceux d'un autre récepteur de xénobiotiques, le récepteur PXR, bien que la pharmacologie des molécules soit différente selon les espèces. Par exemple, la 5 β -pregnanedione est un agoniste pour les formes murines et humaines de CAR et PXR ; le clotrimazole est un agoniste pour la forme humaine de PXR (hPXR) et pour sa forme murine (mPXR) mais un agoniste inverse pour le récepteur hCAR, et n'a pas d'effet sur l'activité du récepteur mCAR (Moore et al. 2000). De plus, l'agoniste TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5 dichloropyridyloxy)]benzene) et l'agoniste inverse androstanol sont des molécules spécifiques de mCAR (Chai et al. 2016). Une molécule modulatrice spécifiquement de la signalisation hCAR a également été identifiée : l'agoniste CITCO. Il ne semble pas interagir avec PXR et active de manière spécifique les gènes cibles de CAR dans les cultures primaires d'hépatocytes humains (Maglich et al. 2003).

Dans son état inactif, CAR est localisé dans le cytoplasme cellulaire dans un complexe protéique incluant notamment les protéines HSP90 (*Heat shock protein 90*) et CCRP (*Cytoplasmic CAR retention protein*), (Zelko et al. 2001), (Yoshinari et al. 2003), (Kobayashi et al. 2003), (Sueyoshi et al. 2008) (**Figure 21**). De plus, ce complexe protéique est stabilisé dans un état inactif par la protéine chaperone HSP70 (*Heat shock protein 70*), (Timsit et Negishi 2007). Lorsque CAR va interagir dans le cytoplasme avec un ligand agoniste comme le TCPOBOP, les protéines chaperonnes HS90 et CCRP vont se dissocier, permettant au récepteur



* Coactivateur

X Corépresseur

Figure 22 : Inactivation de la signalisation CAR

La fixation de l'androstanoal sur la protéine nucléaire CAR entraîne le départ des coactivateurs et le recrutement des corépresseurs, réduisant fortement l'activité transcriptionnelle du récepteur.

A : Androstanoal

CAR de transloquer dans le noyau. Cette translocation requiert le recrutement de la phosphatase PP2A (*phosphatase protein A2*), responsable de la déphosphorylation de CAR au niveau de la thréonine 38 chez l'Homme, et de la thréonine 48 ou de la sérine 202 chez la souris (Mutoh et al. 2009), libérant CAR de son complexe cytosolique. La liaison d'un agoniste sur le récepteur va stabiliser l'hélice H12 dans la conformation active et promouvoir le recrutement de coactivateurs.

4. Inactivation

La signalisation du récepteur CAR peut également être inactivée par la fixation d'un agoniste inverse qui va réprimer de manière considérable l'activité transcriptionnelle du récepteur. En effet, à l'inverse d'un agoniste, la liaison d'un agoniste inverse comme l'androstanol déstabilise l'hélice H12 du domaine AF2 et l'empêche de prendre sa conformation active entraînant alors le recrutement de corépresseurs (Li, Lambert, et Xu 2003), (**Figure 22**). Cependant, ce mécanisme d'action décrit uniquement l'impact de l'androstanol se fixant sur CAR lorsqu'il est présent dans le compartiment nucléaire au sein des lignées cellulaires immortalisées (qui présente une fixation constitutive de CAR au niveau de ses éléments de réponse). Ces données suggèrent que dans ces lignées, l'androstanol n'affecterait pas la capacité de CAR à se fixer à la chromatine (Forman et al. 1998). Les effets des molécules agonistes inverses sur le récepteur CAR lorsqu'il est dans le compartiment cytoplasmique ne sont à ce jour pas décrits. L'activité du récepteur CAR est donc dépendante d'une signalisation complexe partiellement élucidée.

La diversité des molécules et des mécanismes d'action régulant CAR reflète également la complexité des rôles physiologiques de la protéine. Ces rôles sont décrits de manière non exhaustive dans la sous partie suivante.

D. Rôles physiologiques

Les rôles de CAR dans le foie sont les mieux décrits, le foie étant l'organe périphérique majeur de réponse aux stress métaboliques et xénobiotiques. La génération de souris invalidées pour le gène *Car* et l'utilisation de molécules pharmacologiques activatrices ou inhibitrices de sa signalisation permettent de mieux comprendre les rôles de CAR dans la physiologie et la pathologie.

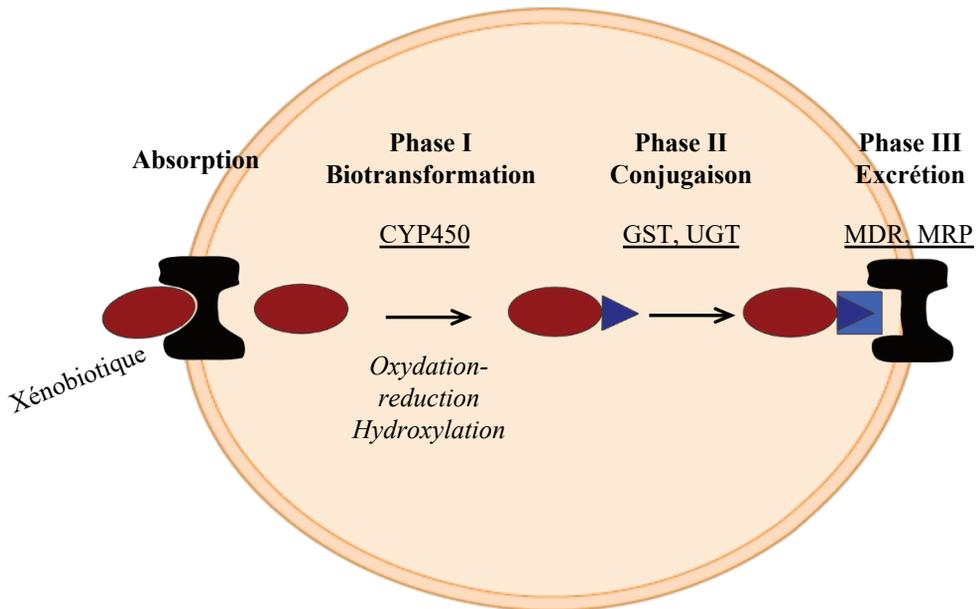


Figure 23 : Détoxification des xénobiotiques et enzymes des phases I, II et III.

Le xénobiotique pénètre dans la cellule et est pris en charge par des enzymes de phases I (principalement des cytochromes) qui vont le biotransformer. Puis les enzymes de phases II (notamment GST et UGT) vont le conjuguer à des résidus endogènes permettant son élimination par les transporteurs (notamment MDR et MRP) ou enzymes de phase III.

GST : Glutathion S-transférase ; *UGT* : Glucuronosyltransférase ; *MDR* : Multidrug resistance mutation ; *MRP* : Multidrug resistance protein ; *CYP450* : Cytochromes P450.

1. Détoxification : xénobiotiques et endobiotiques

CAR est le médiateur de l'expression de gènes codant des enzymes cytochromes P450 dans le foie en réponse au phénobarbital (Kawamoto et al. 1999). La protéine CAR régule directement l'expression d'une multitude d'enzyme de phase I, II et III impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (**Figure 23**), (Li et al. 2015). CAR contrôle l'expression de nombreux cytochromes (CYP) de phase I : CYP2B, CYP3A, CYP2C, contribuant ainsi à la détoxification d'un grand nombre de médicaments et de molécules chimiques environnementales. De plus, l'activation de CAR entraîne la régulation positive d'enzymes de phase II telles que UGT (*uridine diphosphate glucuronosyltransferase*), SULT (*Sulphotransferases*) mais également celle de transporteurs d'efflux tels que MDR1 (*Multidrug resistance mutation 1*), MRPs (*Multidrug resistance proteins*) et OATP (*Organic-anion-transporting polypeptides*), (H. Li et Wang 2010), (Maglich et al. 2002). L'inactivation du gène *Car* peut induire une sensibilité aux toxines, en conséquence de l'altération de la régulation d'enzymes de détoxification. De plus, l'hépatoprotection de CAR contre les xénobiotiques ne consiste pas seulement en l'induction de gènes de détoxification. En effet, l'activation de CAR va aussi permettre la répression d'un certain nombre de gènes. Par exemple, CAR prévient l'induction de CYP4A, une enzyme de peroxydation lipidique, en augmentant la synthèse de SOD (*Superoxide dismutase-3*) pour limiter le stress oxydant (Ueda et al. 2002). Cependant l'activation de la signalisation CAR, notamment par le PB, conduit à l'hépatomégalie chez la souris (qui serait une réponse adaptative à un stress aiguë) et à la tumorigenèse hépatique en cas d'activation chronique. Les animaux traités au PB et invalidés pour le gène *Car* ne présentent aucune altération. Ces données révèlent également dans certains cas un impact délétère de l'activation de CAR (Huang et al. 2005).

Grâce à la régulation de l'expression de différentes enzymes et de transporteurs, CAR régit également la détoxification des acides biliaires et de la bilirubine, qui peuvent être toxiques en cas d'accumulation hépatique (Saini et al. 2004), (Sugatani et al. 2002). L'accumulation d'acides biliaires est notamment à l'origine d'inflammations des voies biliaires associées au développement de choléstases (Chiang et Ferrell 2018). L'accumulation de bilirubine peut conduire à la jaunisse et provoquer des troubles graves tels que des troubles cérébraux et des retards de développement (Sullivan et Rockey 2017). L'activation de CAR chez la souris induit l'expression de gènes codant des enzymes (CYP3A11, SULT2A1, CYP2A5) et des transporteurs (MRP3) impliqués dans le métabolisme et l'élimination des acides biliaires et de la bilirubine (Jun Zhang et al. 2004), (Kim et al. 2021).

Il est important de noter que l'activation de CAR n'est pas toujours bénéfique puisque le métabolisme hépatique peut convertir certains médicaments en molécules potentiellement toxiques. Par exemple, l'activation de la signalisation CAR par l'acétaminophène entraîne la production d'un métabolite, le N-acetyl-p-benzoquinone imine. Ce métabolite entraîne une défaillance hépatique aigüe en se liant à des macromolécules cellulaires et en générant des espèces réactives de l'oxygène (Jun Zhang et al. 2002). L'impact bénéfique ou délétère de la signalisation CAR sur les fonctions hépatiques pourrait également être en lien avec la durée d'exposition, comme abordé précédemment avec les polluants environnementaux. De plus, les effets hépatotoxiques de la cocaïne seraient aussi médiés par la signalisation CAR. En effet la cocaïne serait métabolisée par des cytochromes dont la régulation est contrôlée par CAR, et un métabolite résultant de ce catabolisme induirait la mort cellulaire. Chez la souris, le pré-traitement au PB augmente l'hépatotoxicité de la cocaïne (Bornheim 1998), (Wei et al. 2000). La capacité des molécules à activer ou inhiber CAR peut donc avoir de multiples effets, aussi bien protecteurs que délétères.

L'ensemble de ces données présente la protéine CAR comme un acteur clé du métabolisme des xénobiotiques et des endobiotiques. En effet, en fonction de l'activation ou de l'inactivation de sa signalisation, elle peut être impliquée soit dans la protection cellulaire contre de nombreux agents endogènes et exogènes soit au contraire dans le développement de pathologies.

2. Métabolisme des glucides

Le rôle de CAR dans le métabolisme glucidique a été initialement formulé suite aux résultats d'une étude clinique dans laquelle des patients diabétiques présentaient une meilleure sensibilité à l'insuline et une diminution des niveaux de glycémie après avoir été traités au phénobarbital (Lahtela, Arranto, et Sotaniemi 1985). Aussi, une étude montre chez la souris que l'activation de la signalisation CAR avec l'agoniste TCPOBOP améliore la tolérance au glucose (Dong et al. 2009). Cet effet s'explique par la suppression de la production hépatique de glucose. L'activation de CAR réprime la transcription des gènes codant les enzymes de la néoglucogénèse PEPCK (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*) et G6Pase (*Glucose 6-phosphatase*). L'action répressive de CAR sur les gènes de la néoglucogénèse a ensuite été confirmée dans des cultures primaires d'hépatocytes humains (Lynch et al. 2014). Plusieurs mécanismes d'action ont été suggérés : CAR entrerait en compétition avec FOXO1 et HNF4 α (*Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) pour la liaison aux éléments de réponse IRE (*Iron-*

responsive element) et HNF4RE (*Hepatocyte nuclear factor 4 α responsive element*), présents respectivement sur les promoteurs de PEPCK et G6Pase (Kodama et al. 2004). CAR pourrait aussi se lier à des coactivateurs de HNF4 α (SRC2/GRIP1 et PGC1 α), entraînant une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogenèse (Miao et al. 2006). Mais il a aussi été montré que CAR agit comme un co-répresseur de FOXO1 et qu'il est également capable *via* son interaction nucléaire avec la protéine FOXO1 de réduire de son activité transcriptionnelle, diminuant ainsi l'expression des gènes *Pepck* et *G6Pase* (Kodama et al. 2004), (Pustylnyak, Gulyaeva, et Pustylnyak 2020).

3. Métabolisme des lipides

Le rôle de CAR dans la régulation du métabolisme des lipides reste controversé. Certaines études rapportent des effets positifs de la signalisation CAR sur la lipogenèse alors que d'autres suggèrent des effets inverses.

Le traitement chronique de patients avec des activateurs de CAR comme le phénobarbital est associé à des troubles hépatiques métaboliques (La Vecchia et Negri 2014). Ces observations cliniques ont été confirmées par l'utilisation de modèles animaux révélant un contrôle du catabolisme des acides gras et de gènes hépatiques impliqués dans la lipogenèse par CAR. En effet, CAR agit négativement sur la lipogenèse en interférant dans la β -oxydation des acides gras *via* la modulation de l'activité du récepteur nucléaire PPAR α (*Peroxisome proliferator-activated receptor α*), (Kassam et al. 2000). En effet, CAR s'hétérodimérise avec RXR et réduit donc sa disponibilité pour son autre partenaire PPAR α . De plus, chez les souris obèses de génotype *ob/ob* nourries avec un régime en matières grasses, l'activation de CAR entraîne une diminution de la stéatose hépatique en inhibant la lipogenèse *de novo* (Gao et al. 2009).

Cependant, des données plus récentes ont rapporté un effet positif de CAR sur la lipogenèse, *via* l'induction de l'accumulation hépatique de lipide après activation de CAR chez la souris (Marmugi et al. 2016). CAR induirait l'expression de gènes hépatiques de la lipogenèse tel que *Pnpla3* (*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*). Des effets similaires de l'activation de CAR ont été rapportés dans des lignées primaires d'hépatocytes humains, révélant que *Thrsp* (*Thyroid Hormone Responsive*), un gène cible de CAR codant une protéine de réponse à l'hormone thyroïdienne, est un important régulateur de la lipogenèse hépatique (Breuker et al. 2010)

Les effets contradictoires de CAR sur le métabolisme des lipides pourraient s'expliquer par les différentes caractéristiques physiologiques au sein des études. CAR apparaît comme un inhibiteur de la lipogenèse dans une situation de stress métabolique induit par un régime riche en graisse, alors qu'il serait plutôt activateur en présence d'une molécule chimique agoniste exogène. Ces données suggèrent que CAR est un senseur répondant de manière spécifique à un stress donné, apportant une réponse adaptée afin de réguler les fonctions cellulaires et physiologiques et conserver l'homéostasie au sein de l'organisme.

4. Régulation d'hormones stéroïdiennes

L'implication de CAR dans la régulation hormonale a été initialement suggérée lorsque l'androstanol et l'androsténol furent identifiés comme ligands de CAR. Ces stéroïdes inhibent l'activité de CAR en induisant la dissociation des coactivateurs de CAR. Les niveaux d'hormones stéroïdiennes sont maintenus par un équilibre dynamique entre synthèse et dégradation. Cette coordination est essentielle pour maintenir des fonctions physiologiques normales. De nombreux cytochromes (CYP11, CYP17, CYP19, CYP21) sont impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, leur catabolisme et leur inactivation (Schenkman 1992). Le foie est le site principal de catabolisme des stéroïdes, où CAR joue donc un rôle essentiel à travers la régulation de nombreuses enzymes dont les cytochromes. Par exemple, l'activation de CAR par l'agoniste TCPOBOP induit le catabolisme des œstrogènes pour permettre leur excrétion (Yamamoto et al. 2006), (Oliviero et al. 2020). De plus, l'inactivation du gène *Car* conduit à une augmentation du taux plasmatique de testostérone chez la souris mâle et à une augmentation du taux plasmatique d'œstradiol chez la souris femelle (Lukowicz et al. 2019).

5. CAR et cancer

Une étude a montré en 2004 que l'activation chronique de CAR (directe ou indirecte) chez la souris est responsable de la promotion tumorale hépatique (Yamamoto et al. 2004). En effet, seules les souris exprimant la forme sauvage de CAR présentent des carcinomes hépatocellulaires suite à l'induction de la signalisation CAR (Huang et al. 2005). De plus, une étude suggère que l'activation de CAR par le phénobarbital altère la méthylation de l'ADN ce qui conduirait à la tumorigenèse hépatique (Phillips et al. 2007).

CAR induit également l'expression de *Gadd45 β* (*Growth arrest and DNA damage inducible 45 β*), un inhibiteur de l'apoptose, ce qui conduit à la prolifération cellulaire

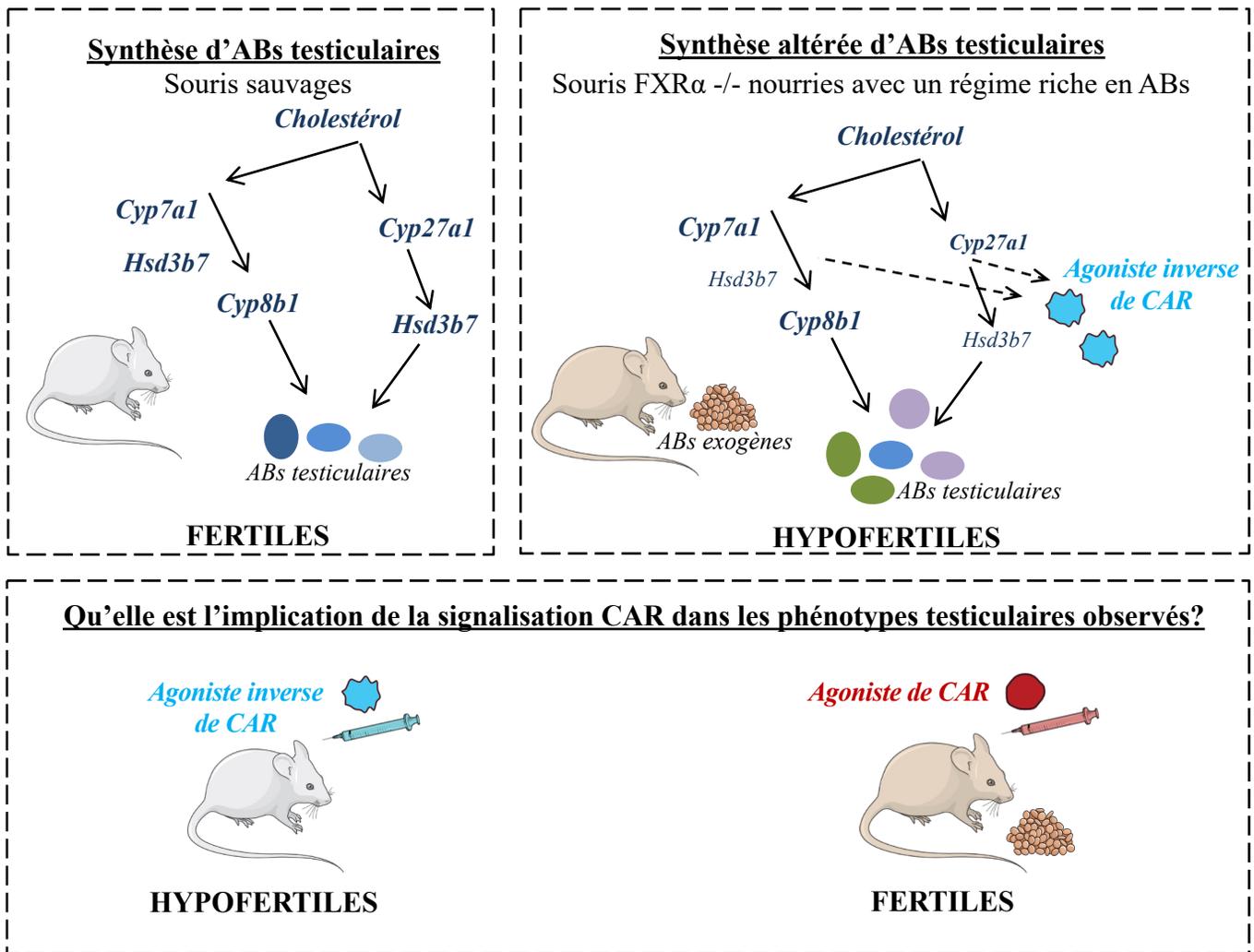


Figure 24 : L'accumulation d'un agoniste inverse de CAR au niveau testiculaire entraîne une hypofertilité chez la souris.

Les souris invalidées pour *Fxrα* et nourries avec un régime riche en acides biliaires présentent des altérations du pool d'acides biliaires testiculaires. Ces altérations sont corrélées à la modification de l'expression d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides biliaires, ce qui entraîne l'accumulation de métabolites intermédiaires notamment agonistes inverses de CAR.

Le traitement de souris sauvage adulte avec l'androstanol (un agoniste inverse de CAR) permet de reproduire le phénotype d'hypofertilité observé. A l'inverse le traitement des souris invalidées pour *Fxrα* nourries avec un régime en acides biliaires avec le TCPOBOP (un agoniste de CAR) permet d'inhiber les impacts délétères sur la fertilité. Ces données suggèrent un rôle de CAR dans la physiologie testiculaire adulte chez la souris.

ABs : Acides biliaires ; CYP : Cytochromes P450 ; Hsd3b7: 3Beta-hydroxysteroid-dehydrogenase type 7

D'après Martinot et al., 2017 ; PMID: 28181583

et à la croissance tumorale chez la souris (Columbano et al. 2005). De plus, chez la souris, le traitement au TCPOBOP entraîne une augmentation des niveaux de transcrits du gène *Cyclin d1*, un évènement majeur impliqué dans la prolifération cellulaire hépatique (Ledda-Columbano et al. 2000). De plus, il a été démontré que l'activation de la signalisation CAR chez la souris régulerait positivement *Mdm2* (*Double minute oncogene*), un oncogène qui promeut la réplication de l'ADN et inhibe l'expression du suppresseur de tumeur P53 (Huang et al. 2005).

Cependant, dans le contexte humain, les données disponibles contrastent avec les données obtenues chez la souris. Il apparaît que l'activation de CAR par son agoniste humain CITCO inhibe la progression tumorale cérébrale en induisant un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules (Chakraborty, Kanakasabai, et Bright 2011).

Les études réalisées chez la souris indiquent de manière concluante que CAR régule la prolifération cellulaire. Cependant, avant de considérer CAR comme une cible thérapeutique chez l'Homme dans le cas de cancer ou de désordres métaboliques, il est important d'approfondir le travail sur les rôles et le fonctionnement du récepteur CAR humain.

Présentation du projet de recherche

CAR est un récepteur nucléaire impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques et physiopathologiques telles que la détoxification (des endobiotiques et des xénobiotiques), le métabolisme (notamment glucidique et lipidique) et la régulation hormonale (notamment stéroïdienne). Il est exprimé majoritairement dans le foie, mais son expression est également détectée dans le duodénum, le cerveau, le cœur et les reins.

Récemment, des travaux réalisés dans notre équipe de recherche ont révélé l'expression de CAR dans le testicule. Il pourrait donc participer au développement de pathologies testiculaires d'origine environnementale permettant notamment de mieux comprendre certaines infertilités idiopathiques. En effet, les travaux de l'équipe ont montré chez la souris adulte une signalisation CAR active au sein du testicule, dont la modulation est capable d'impacter la physiologie testiculaire. Cette étude révèle que l'accumulation d'un agoniste inverse (AI) de CAR dans le testicule, causée initialement par une altération de la biosynthèse des acides biliaires testiculaires, conduit à des troubles de la fertilité chez la souris adulte (Martinot et al. 2017), (**Figure 24**). Ces données suggèrent un rôle du récepteur CAR dans l'homéostasie

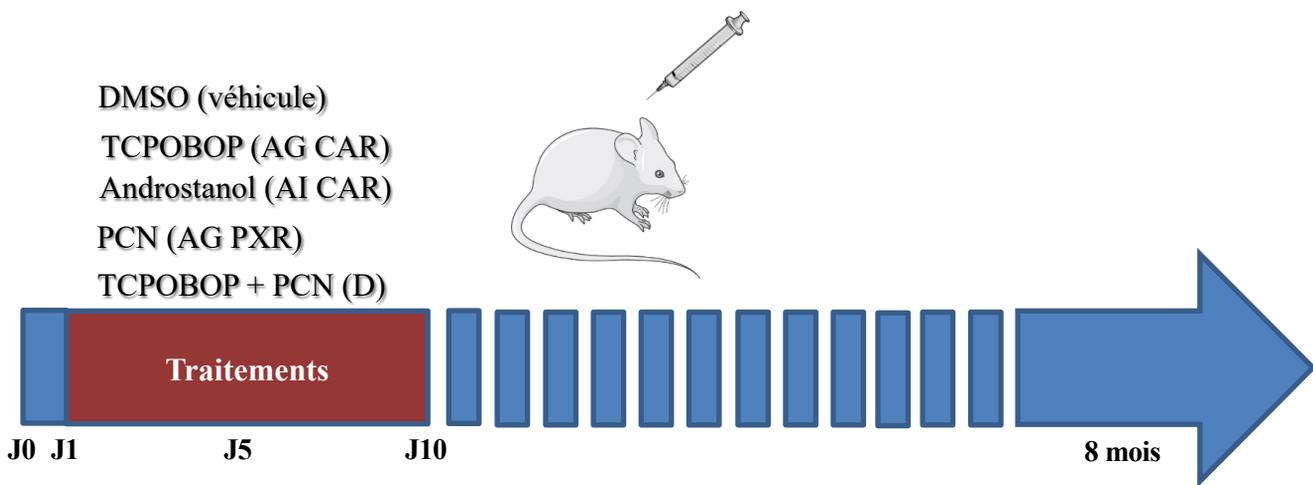


Figure 25 : Protocole expérimental de traitements des souris aux différentes molécules.

testiculaire, et plus précisément dans la spermatogenèse. En effet, l'équipe a mis en évidence que l'expression de *Car* au sein du testicule est retrouvée majoritairement dans les cellules germinales indifférenciées.

L'objectif de mon projet de recherche est d'identifier les rôles de CAR dans la physiologie et la physiopathologie testiculaires, notamment au sein de la lignée germinale. D'une part, notre étude vise à caractériser *in vivo* l'impact de la modulation néonatale de la signalisation CAR sur la physiologie testiculaire et la fertilité à l'âge adulte. Dans ce contexte, des souris issues de la souche C57Bl/6J, sauvages ou invalidées pour *Car* de manière totale, ont été traitées pendant les 5 ou 10 premiers jours de leur vie avec un agoniste (TCPOBOP) ou avec un agoniste inverse (androstanol) du récepteur CAR. L'étude des impacts de ces traitements a ensuite été réalisée à différents âges (5 jours, 10 jours, 8 mois), (**Figure 25**) grâce à des analyses phénotypiques, histologiques, biochimiques et moléculaires. D'autre part, afin de s'affranchir des biais de cellularité retrouvés à l'échelle du testicule *in vivo*, cette approche a été complétée *in vitro* par l'utilisation de la lignée cellulaire C18.4 de spermatogonies indifférenciées sauvages ou invalidées pour le gène codant CAR par la technique de CRISPR/Cas9.

Les données obtenues montrent que l'inhibition néonatale de la signalisation CAR par l'agoniste inverse (AI) androstanol affecte la fertilité des souris à l'âge adulte, sans impact sur le nombre de spermatozoïdes épидидymaires, suggérant ainsi une atteinte qualitative de la lignée germinale. Cet effet est corrélé à une altération de la voie de signalisation associée à FOXO1 dans les spermatogonies indifférenciées. Cela suggère que les altérations précoces subies par les spermatogonies indifférenciées au moment de la modulation néonatale de la signalisation CAR sont « mémorisées/conservées » et transmises lors des étapes de différenciation, impactant *in fine* la qualité des spermatozoïdes.

De plus, dans un contexte d'exposition multiple aux xénobiotiques, nous avons également étudié l'impact d'une double activation des signalisations CAR et PXR. Les animaux (sauvages ou invalidés pour le gène *Car*) ont été traités comme décrit précédemment avec un agoniste de CAR (TCPOBOP), ou un agoniste de PXR (PCN), ou avec les 2 agonistes (**Figure 25**). De même des analyses phénotypiques, histologiques, biochimiques et moléculaires ont été réalisées à différentes périodes de la vie des souris pour identifier les impacts des expositions néonatales. Nos résultats démontrent que la co-exposition au TCPOBOP et au PCN induit des défauts de la fonction reproductive mâle plus importants que ceux observés dans le cas d'une exposition simple au TCPOBOP ou au PCN. En effet, la co-exposition néonatale à ces

molécules altère de manière additive la fertilité des animaux. Les animaux sauvages présentent une diminution de la production spermatique, associée à une diminution du taux de testostérone intra-testiculaire après la double exposition. De manière intéressante, les paramètres testiculaires altérés par la co-exposition ne sont que faiblement affectés chez les souris invalidées pour le gène *Car*. Ces données suggèrent un rôle important de CAR dans les troubles testiculaires induits par la double exposition. De plus, il est important de noter que ces deux récepteurs ne sont pas exprimés dans les mêmes types cellulaires dans le testicule, illustrant le rôle majeur des interactions et des dialogues entre les types cellulaires testiculaires dans la survenue d'altérations de la fonction de reproduction en réponse aux xénobiotiques.

Résultats

Article 1

Inhibition of the Constitutive Androstane Receptor by Inverse Agonist Leads to Male Fertility Disorders. En préparation.

Monrose Mélusine, Holota Hélène, Martinot Emmanuelle, Thirouard Laura, de Haze Angélique, Damon-Soubeyrand Christelle, Saru Jean-Paul, Caira Françoise, Lakhil Laila, Beaudoin Claude, Volle David H.

A. Introduction

Depuis quelques décennies, des études alarmantes témoignent de la baisse de la fertilité chez l'homme, associée à une augmentation constante des atteintes quantitatives et qualitatives de la spermatogenèse (Rolland et al. 2013). Si les origines de certaines infertilités sont corrélées à des altérations génétiques, selon les sources entre 30% et 60% d'entre elles demeurent idiopathiques. De plus en plus d'études démontrent néanmoins chez l'homme et chez des modèles animaux, l'implication de facteurs environnementaux, notamment de perturbateurs endocriniens, dans l'étiologie de l'infertilité (Rehman et al. 2018), (Somers 2011). Cependant, la fonction endocrinienne n'est pas la seule altérée par les signalisations induites par les molécules chimiques environnementales pénétrant dans l'organisme. La protéine CAR (*Constitutive Androstane Receptor*), membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, est un senseur de xénobiotiques impliqué notamment dans le contrôle hépatique de leur métabolisme (Timsit et Negishi 2007). Notre équipe de recherche a montré en 2017 que CAR est exprimé dans le testicule de souris et que l'inhibition de sa signalisation chez la souris à l'âge adulte entraîne une diminution de la production spermatique altérant ainsi la fertilité des animaux (Martinot et al. 2017). L'organisme humain comme celui de nombreuses espèces est fréquemment exposé aux xénobiotiques, et les périodes fœtales et néonatales reflètent des fenêtres développementales particulièrement sensibles aux signaux environnementaux.

Dans ce contexte, nous avons étudié les rôles néonataux de la signalisation CAR et les conséquences à l'âge adulte de ses modulations dans la physiologie et les physiopathologies testiculaires notamment dans un contexte d'exposition aux molécules environnementales. Pour cela, des souris sauvages ou invalidées pour le gène *Car* ont été traitées pendant les 10 premiers jours de leur vie avec l'androstanol (AI), démontré comme une molécule exerçant une activité agoniste inverse spécifique de la forme murine de CAR (mCAR), (Forman et al. 1998). Les

fonctions testiculaires et les capacités de reproduction des animaux ont été analysées à différents âges.

Nos résultats démontrent que l'inhibition néonatale de la signalisation CAR a un impact à l'âge adulte sur la qualité spermatique et diminue la fertilité des animaux. Les spermatozoïdes issus des mâles traités avec l'AI présentent une rétention de l'histone H3, ce qui suggère une altération du processus de spermiogenèse (Yuen et al. 2014), (Oliva et Ballescà 2012). De plus, des analyses en période néonatale juste après le traitement avec l'AI, et *in vitro* sur une lignée de spermatogonies indifférenciées ont permis de montrer que l'inhibition de la signalisation CAR impacte initialement l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées. En effet le traitement AI entraîne des modulations de la signalisation FOXO1 et des niveaux de l'acétylation de l'histone H4 dans les cellules germinales qui sont maintenues jusqu'à l'âge adulte au niveau testiculaire. Nos données suggèrent que ces modulations altéreraient en partie la différenciation des cellules germinales, médiant ainsi des impacts à long terme sur la fonction testiculaire. Nos travaux démontrent pour la première fois l'implication de CAR dans l'homéostasie des cellules germinales.

Inhibition of the Constitutive Androstane Receptor by Inverse Agonist Leads to Male Fertility Disorders.

Monrose Mélusine¹, Holota Hélène¹, Martinot Emmanuelle¹, Thirouard Laura¹, de Haze Angélique¹, Damon-Soubeyrand Christelle¹, Saru Jean-Paul¹, Caira Françoise¹, Lakhal Laila², Beaudoin Claude^{1*} and Volle David H.^{1*}.

¹ INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD Institute, Team-Volle, F-63001 Clermont–Ferrand, France

² INRA UMR1331, ToxAlim, University of Toulouse, Toulouse, France

***Correspondence.** C. Beaudoin, D.H. VOLLE. INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD Institute, Team-Volle, 28 place Henri Dunant, TSA 50400, 63037 Clermont-Ferrand, France. Email addresses: claude.beaudoin@uca.fr, david.volle@inserm.fr or david.volle@uca.fr

Running title: CAR inhibition & xenobiotic repro-toxicity

Key words: CAR, repro-toxicity, xenobiotic, spermatogonia, FOXO1.

Disclosure. The authors declare to have no conflict of interests.

Abstract

Male sexual function can be disrupted by fetal or neonatal administration of compounds that alter testicular physiology. Several studies have revealed that the Constitutive Androstane Receptor (CAR; NR113) is a receptor of xenobiotics. We hypothesized that CAR could be involved in the reprotoxic effects of environmental pollutants, such as endocrine disruptors. To test this hypothesis, we performed a proof-of-concept approach using reference molecules to activate (TCPOBOP) or inhibit (androstanol) CAR activity. Data demonstrates that CAR is mainly expressed in germ cell lineage. The roles of the CAR signaling pathway were investigated on spermatogonial homeostasis using *in vivo*, *in vitro*, and pharmacological methods. *In vivo* studies were performed using wild-type and *Car*-deficient mouse models. Following the exposure to the inverse agonist, inhibiting CAR activity, wild-type animals showed impaired fertility. Indeed, CAR modulates the expression of key genes of undifferentiated spermatogonia such as *Id4*. At the molecular level, the present data highlight the molecular mechanisms underlying the interactions between CAR, FOXO1 and acetylated histone H4 in spermatogonia associated with impaired germ cell differentiation and altered sperm quality after inverse agonist exposure.

This work makes an important contribution to the literature as it shows for the first time that CAR plays a key role in germ cell homeostasis in the context of xenobiotic exposures and that the CAR signaling pathway may now need to be studied to better identify the adverse impacts of environmental molecules on male fertility.

Introduction

Infertility is a major public health issue defined by the World Health Organization as the inability of a couple to conceive a child after 1 year of regular unprotected intercourse. Today, approximately 15% of couples worldwide are affected by fertility disorders¹. The male factor is totally or partially involved in 30 to 50% of cases².

Next to genetic causes, the impact of environmental pollutants on male fertility seemed to have major detrimental effects, as sustained by epidemiological studies and experimental models using animal models^{3,4}. The fetal and neonatal periods are defined as the most sensitive windows for xenobiotics exposures. These exposures lead to the alteration of the two main functions of the male gonad, the endocrine and exocrine functions. They correspond respectively to the synthesis of testicular hormones such as testosterone by the Leydig cells in the interstitial space, and to the production of spermatozoa within the seminiferous tubules.

To protect health, molecules can be eliminated by the body through detoxification mechanisms. Indeed, processes involving enzymes, such as cytochromes, allow the toxicity of these molecules to be reduced⁵. The expression of these enzymes, essential for clearance of these molecules, is finely regulated. The Constitutive Androstane Receptor (CAR/Nr113), a member of the nuclear receptor superfamily is among the actors involved in the control of xenobiotic catabolism as demonstrated in the liver⁶. CAR is activated in two ways, either by direct ligand binding or by indirect regulation. This later being associated with its dephosphorylation. Indeed, in response to phenobarbital induction, the protein phosphatase-2 (PP2A) is recruited by the CAR:HSP90 (heat shock protein-90) complex⁷, that results in the dephosphorylation of serine 202 of the murine CAR receptor⁸ or threonine 38 of the human CAR receptor⁹. These activations lead to the release of CAR from the multiprotein complex and to its translocation into the nucleus. Then, CAR binds and acts as a heterodimer with the Retinoid X Receptor (RXR)¹⁰. As a receptor of xenobiotics, CAR activity is modulated by environmental pollutants or clinically used drugs, which are either ligands or indirect activators¹¹.

In addition several endogenous or exogenous molecules have been defined as CAR inverse agonists (IA)¹², such as androstanol in mice¹³. IA represses CAR transcriptional activity by destabilizing the Helix-12 of the activation function-2 domain, leading to the departure of coactivators and the recruitment of corepressors¹⁴. CAR is still bound to chromatin, but its transcriptional activity is significantly reduced/repressed. Interestingly, data have previously demonstrated that within mouse testis, in the context of altered bile acid homeostasis, metabolites defined as CAR inverse agonists are detected¹⁵.

Over the last decades, the roles of CAR have been deciphered mainly in the liver where it plays a role in detoxification, thyroid and steroid hormone metabolism as well as in the

regulation of carbohydrate and energy metabolisms¹⁶. Its functions in other organs are less established.

In contrast, the roles of CAR on testicular physiology and pathophysiology have not been fully investigated to date. We hypothesized that CAR, which is expressed in the testis, may be involved in the development of environmentally induced testicular pathologies and male fertility disorders. The combination of *in vivo*, *in vitro*, and pharmacological approaches was used to define the roles of the CAR signaling pathway on germ cell homeostasis and male fertility.

Results

CAR is expressed in testis from early life to adulthood.

CAR has been demonstrated to be expressed in the testis¹⁵. To decipher its roles in male reproductive function, we first revisited its expression in the mouse testis. The present data showed that CAR was expressed in mouse testis from neonatal period to adulthood (**Figure 1A**). In neonatal mice, *Car* mRNA was mainly detected in spermatogonia cells using analysis of CD90 positive (CD90+) sorted cells compared to eluate part (**Figure 1B**). However, *Car* mRNA was expressed in both cell types (CD90+ and CD90- cells) (**Figure 1B**). Consistently, data showed that in adult mice *Car* mRNA was detected in both tubular and interstitial compartments of the testis (**Figure 1C**). In adult, *Car* mRNA was also enriched in CD90+ germ cells compared to the other cell types in the eluate (**Figure 1D**).

Expression in the germ cell lineage was confirmed by immunohistochemistry in neonatal and adult mouse testes by detection of CAR in undifferentiated germ cells revealed by the PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger, encoded by the BTB domain zinc finger containing 16 (Zbtb16)) marker and in differentiated germ cells identified using the G9A marker. Note that no staining was observed in Sertoli cells, which were detected using SOX9 (SRY-Box Transcription Factor-9) staining (**Figure 1E**). Results also showed staining in the interstitial space (**Figure 1E**), which sustained previous data highlighting the expression of *Car* in the Leydig cells¹⁵. Consistently to the *in vivo* data, the expression of *Car* in germ cells and Leydig cells was confirmed by qPCR approach using the MLTC1 Leydig cell lines and the C18-4 and GC1spg germ cell lines (**Figure 1F**). The present data highlighted that CAR could be involved in xenobiotic response within testis.

Car deficiency alters male mice reproductive capacities throughout aging.

We first analyzed the effects of *Car* gene deficiency on reproductive capacities in male mice. As *Car* is expressed in different cell types of the testis, we used a full-knockout model (*Car*^{-/-})¹⁷. At 8 months of age, an impact of the lack of CAR was noticed on male fertility. Indeed, there were sterile males in *Car*^{-/-} (11%) whereas all WT males were fertile (**Figure 2A**). No impact of the absence of the *Car* gene was observed on sperm production, as revealed by

counting the number of sperm in the epididymal head at 8 months of age (**Figure 2B**). However, a lower testis weight was observed in *Car*^{-/-} mice compared to WT males at 8 months of age (**Figure 2C**). These data suggested that the *Car* gene deficiency had some impacts on male fertility in normal physiological conditions. Moreover, the lower testicular weight observed in *Car*^{-/-} males compared to WT males supported the idea that the CAR signaling pathway may play some roles in testicular pathophysiology.

Inhibition of CAR signaling pathway using inverse agonist leads to male fertility disorders.

As CAR is a nuclear receptor of xenobiotics and is involved in detoxification, we wondered whether the roles of CAR in testis could be revealed upon exposure to toxicants. Neonatal exposure to CAR agonist TCPOBOP, a molecule initially identified in pesticide¹⁸, had almost no impact on the percentage of fertility males (**data not shown, see paper 2**). As endogenous and exogenous molecules could act as CAR inverse agonist (IA), we wondered whether CAR inhibition by IA could reveal its testicular functions. We thus tested whether neonatal IA exposure, using androstanol^{13,15}, could alter testicular physiology and fertility. Male mice were exposed from 1 to 10 days postnatally and then fertility analysis was performed at adulthood. At 8 months of age, while no difference between groups was noted in the percentage of plugged females (**Figure 3A**), there was a higher percentage of sterile *WT* males after IA exposure compared with the vehicle-treated group, whereas no effect of IA was observed in *Car*-deficient (*Car*^{-/-}) male mice (**Figure 3A**). IA-treated *WT* males that remained fertile, the number of fecundations was slightly (around 1 pup per litter) different with also fewer live pups and more dead pups *in utero* compared to control *WT* mice (**Figure 3B**). Of note, no effect of IA was observed in *Car*^{-/-} male mice. (**Figure 3B**). Consistently, the altered fertility in *WT* males exposed to IA was not associated with decreased spermatozoa production as revealed by the sperm cell count in the head of the epididymis (**Figure 3C**). These data suggested that the fertility defects found after IA exposure were due to altered germ cell quality.

IA impacts testosterone production in a CAR independent manner.

The impacts of many environmental molecules have been associated with endocrine disrupting activity in recent decades¹⁹. The lack of *Car* had been demonstrated to modulate the level of blood testosterone in old mice¹⁷. We wondered whether altered intra-testosterone levels might be involved in the observed IA-induced phenotypes. Lower intra-testicular of testosterone were observed in adult *WT* males neonatally treated with IA compared to vehicle treated mice (**Supplemental Figure 1A**). This impact on steroidogenesis clearly demonstrated a non-specific effect of IA as similar effect was detected in *Car*^{-/-} males. Thus, these data suggested that the decrease in testosterone levels following IA exposure did not contribute to

the impact of IA on fertility. Indeed, IA-treated *Car^{-/-}* males, even though they had lower testosterone levels, did not show altered fertility compared to vehicle treated *Car^{-/-}* males. Note that in neonatal mice there was no impact of IA on intra-testicular testosterone levels mice (**Supplemental Figure 1B**).

Inhibition of CAR signaling pathway using inverse agonist leads to alterations of the spermatogenesis.

Interestingly, the current data show that IA exposure was associated with a slight increase in germ cell apoptosis in *WT* males at adulthood (**Supplemental Figure 1C**). However, this increase was not strong enough to have an impact on the number of sperm produced (see **Figure 2B**). Furthermore, since in IA-treated *WT* males there was an alteration of the number of alive pups, the present data suggested that the impaired fertility must be also due to abnormal germ cell quality. The remaining question was to decipher how neonatal exposure to IA could program germ cells throughout life.

To better understand the impacts of IA on male fertility, we focused on male gonad. No major difference in testicular histology was seen between groups (**Figure 4A**), as reflected by the normal number of Sertoli cells and spermatogonia as revealed respectively by the SOX9 or PLZF positive cell counts (**Figures 4B & 4C**). In addition, no difference was observed in the number of seminiferous tubules stained for meiotic marker SYCP3 (Synaptonemal complex protein 3) (**Figure 4D**). As no effect was observed for all these markers on *WT*, the impact of IA on *Car^{-/-}* males was not analyzed.

Similarly, no difference was observed for the overall number of seminiferous tubules with post-meiotic cells revealed by ac-H4 (acetylated histone H4) (**Figure 4E**). However, further analyses of the data using ac-H4 staining on IA-treated *WT* males showed an abnormal proportion of seminiferous tubules with round or elongated spermatids compared to the vehicle-treated group (**Figure 4F**). In contrast, no alteration of the ratio of round to elongated spermatids was observed in *Car^{-/-}* mice in response to IA treatment (**Figure 4F**). The importance of altered ac-H4 levels in the observed phenotype was sustained by data showing a similar decrease of the ratio of round to elongated spermatids in vehicle treated *Car^{-/-}* males compared to vehicle treated *WT* males. These data suggested that neonatal inhibition of CAR by IA led to impaired spermatogenesis in adulthood with abnormalities in germ cell differentiation, as revealed by the abnormal ratio of round to elongated spermatids.

These data suggested that inhibition of CAR might be associated with alterations in spermiogenesis, as ac-H4 has been shown to be a key player in the initiation of spermiogenesis leading to the histone-to-protamine transition. We therefore analyzed histone retention in sperm cells. The data showed a higher level of histone H3 in sperm from IA-treated *WT* males compared to sperm from control males (**Figure 4G**). These histone retention data

were consistent with the idea that IA treatment in *WT* mice resulted in impaired sperm quality associated with decreased fertility and increased offspring mortality in litters compared to control mice. Consistently, no effect of IA was detected on sperm cells of *Car*^{-/-} male mice (**Figure 4G**).

Neonatal exposure to CAR IA alters neonatal spermatogonial stem cell homeostasis.

To better decipher the longer-term impacts of IA exposure that led to male fertility disorders at adulthood, we decided to define the initial impacts of IA. Testicular homeostasis of male mice was analyzed at post-natal days 5 (P5) and 10 (P10), during and at the end of the exposure. At P5 the numbers of ID4 (inhibitor of differentiation 4), PLZF and SOX9 positive cells were similar between IA and vehicle treated animals in *WT* males (**Figure 5A, 5B & 5C**). At P10, the number of ID4+ spermatogonia was similar between IA and vehicle treated animals (**Figure 6A**). However, lower numbers of PLZF+ and G9A+ cells were observed in the IA-treated *WT* animals compared to vehicle treated ones (**Figure 6B & 6C**). This was not associated with a significant increase of the apoptotic rate of germ cells in the IA-treated *WT* males compared to controls (**Figure 6D**). These data suggested that IA could be, by the end, associated with an alteration of germ cell differentiation. A more precise analysis of germ cells showed that, at P5 and P10, there was an abnormal localization of spermatogonia at the center of the seminiferous tubules following IA exposure compared to vehicle-treated males (**Figure 5D & 6E**). This was illustrated using ID4 and PLZF immunostainings at P5 and P10 respectively (**Figure 5D & 6E**). Note that these effects of the IA exposure were not seen in *Car*^{-/-} males. This impact was transitory as adult spermatogonia were perfectly positioned at the basal membrane of the seminiferous tubules (**see Figure 4B**). Interestingly, the vehicle treated *Car*^{-/-} males presented an accumulation of ectopic ID4+ cells compared to vehicle treated *WT* males at P5 (**Figure 5D**). This was less pronounced at P10 with the number of ectopic PLZF+ cells compared to IA-*WT* treated males; even though it was significantly higher in vehicle treated *Car*^{-/-} males than in vehicle treated *WT* (**Figure 6E**). These data suggested that inhibition of CAR activity using IA or *Car* deficiency led in part to similar phenotypes in germ cell homeostasis during early neonatal life. The data observed at P10 for ectopic PLZF cells suggested that chronic exposure to IA had a stronger impact than *Car* deficiency (**Figure 6E**). This could be because in the IA context, there was inhibition of CAR activity whereas in the knockout context, there was simply no CAR activity. Taken together, these data suggested that the abnormal localization of spermatogonia during the neonatal period, which was much more strongly affected by CAR inhibition than by *Car* deficiency, may be due to altered migration and/or differentiation processes, both of which are interconnected during the transition from gonocytes to spermatogonia in the neonatal mouse testis.

CAR inhibition alters FOXO1 pathway in spermatogonia.

To define the potential impact of CAR on the gonocyte to spermatogonia transition, we decided to analyze the FOXO1 signaling. Indeed, FOXO1 had been demonstrated to be involved in the gonocyte to spermatogonia transition in neonatal mouse testis²⁰. This is particularly important because the FOXO1 and CAR signaling pathways had been shown to interact and to respectively control their transcriptional activities²¹. At P5, no effect was noticed on the overall number of FOXO1 positive cells following the IA treatment in *WT* males (**Figure 7A**). However, as seen for ID4+ cells, a higher number of FOXO1+ ectopic germ cells was noticed in the center of the seminiferous tubules in IA-treated *WT* males (**Figure 7B**). At P10, the number of FOXO1+ ectopic cells was still higher in IA-treated *WT* males than in controls (**Figure 7C**). In addition, at P10, the overall number of FOXO1+ cells was lower in IA-treated *WT* males compared to controls (**Figure 7D**). No impact of IA treatment was observed in *Car*^{-/-} males at both P5 and P10 (**Figures 7A to 7D**). Note that vehicle treated *Car*^{-/-} males presented higher accumulation of ectopic FOXO1+ cells compared to vehicle treated *WT* at P5 and P10 (**Figures 7B & 7C**). This was consistent with the fact that FOXO1 could be involved in the reproductive phenotype, as both IA-treated *WT* and veh-treated *Car*^{-/-} mice showed altered fertility. The involvement of FOXO1 in the gonocyte to spermatogonia transition relies on its nuclear-cytoplasmic trafficking²⁰. Indeed, even if the transition starts during embryonic life, it had been shown that in P3 gonocytes, FOXO1 undergoes translocation from the cytoplasm to the nucleus and it had been proposed that this contributes to the transition from gonocytes to SSCs²⁰. Analysis of FOXO1 cellular sub-localization showed that in IA-treated *WT* males, there was a lower percentage of ectopic cells with nuclear localization of FOXO1 and a higher percentage of ectopic cells with cytoplasmic localization of FOXO1, compared to vehicle-treated *WT* males at P10 (**Figure 7E & 7F**). No effect of IA was observed in *Car*^{-/-} males. Of note, for this parameter, similar impact on FOXO1 nuclear localization was observed in *Car*^{-/-} males under vehicle condition (**Figure 7E**). However, the percentage of ectopic cells with cytoplasmic localization of FOXO1 did not seem impacted in *Car*^{-/-} males compared to vehicle-treated *WT* males, supporting the idea that IA-treated *WT* males showed higher incidence of fertility disorder than veh-treated *Car*^{-/-} mice (**Figure 7F**). These data suggested that after IA treatment, FOXO1 was less present in the nucleus and more present in the cytoplasm, thus less able to induce its transcriptional activity compared to vehicle treated *WT* males. This was consistent with the idea that cytoplasmic-nuclear translocation, proposed to contribute to the transition from gonocytes to SSCs²⁰, was impaired by IA and thus could explain greater retention of cells in the center of the seminiferous tubules due to altered differentiation and/or migration processes.

Regarding the identification of mechanisms linking early neonatal exposure and deleterious phenotypes in adulthood, it is noteworthy that some of the effects observed in

neonatal mice were also found in adult life such as alterations in FOXO1 signaling (**Figure 8**). Indeed, the number of FOXO1 positive spermatogonia was lower in IA-treated *WT* males at adulthood compared to vehicle treated males (**Figure 8A**). In addition, no effect of IA was observed in *Car^{-/-}* males (**Figure 8A**). However, at this age, the number of FOXO1+ cells were lower in *Car^{-/-}* vehicle treated males compared to vehicle-treated *WT* males (**Figure 8A**). This was consistent with the fact that FOXO1 could be involved in the reproductive phenotype, as both IA-treated *WT* males and vehicle-treated *Car^{-/-}* mice showed altered fertility. No change was observed, in IA-treated males, in the number of cells with cytoplasmic or nuclear staining for FOXO1 (**Figure 8B**). Thus, the main change, following IA exposure, was for the number of FOXO1 positive cells in IA-treated *WT* males compared to vehicle *WT* mice (**Figure 8A**). These data suggested that the expression of FOXO1 must be altered up to adulthood too. No effect of IA was observed in *Car^{-/-}* males. However, vehicle treated *Car^{-/-}* males showed lower levels of nuclear FOXO1 and higher levels of cytoplasmic FOXO1 compared to *WT* vehicle treated animals (**Figure 8B**). Interestingly, it has been suggested that at adulthood, the lack of FOXO1 could be associated with the alteration of spermatogonia but also with abnormalities in post-meiotic cells²⁰, even if the mechanisms still to be defined. This was consistent with the alteration observed in adult IA-treated *WT* mice that showed an altered number of FOXO1+ spermatogonia as well as impaired spermiogenesis leading to histone retention in spermatozoa.

CAR inverse agonist leads to modulation of AKT-FOXO1 signaling pathway in spermatogonia.

At the molecular level, as some cellularity differences might exist between these groups at P5 and P10 (**Figure 4**), we decided to analyze the expression of spermatogonial genes in cell sorted spermatogonia. The enrichment of the samples was confirmed through qPCR analyses of cell specific markers for Leydig cells (*Cyp11a1*), Sertoli cells (*Fshr*) and spermatogonia (*Oct3/4* and *Plzf*) (**Supplemental Figure 2**). Data confirmed a lower mRNA expression of *CD90*, *Id4*, *Plzf* and *Gfra1* (**Figure 9**). These data confirmed that IA exposure altered the expression of key genes in undifferentiated spermatogonia. No effect was observed on *Foxo1* mRNA levels. In addition, even if *Foxo1* mRNA accumulation was not altered, the present data suggested that FOXO1 downstream targets were impacted such as *Cdh1* (**Figure 9**). This sustained the fact that CAR-FOXO1 signaling could be involved in altered spermatogonia homeostasis following IA exposure. This must result in delayed/altered establishment of SSC pool compared to vehicle treated males.

To better define if CAR-FOXO1 signaling was involved in the effects of IA, we decided to analyze the impact of CAR inhibition through IA exposure *in vitro* using the spermatogonial cell line (C18-4). First, we established the impact of the lack of CAR on this cell line. For that

purpose, we generated a C18-4 cell line deficient for the *Car* gene (CAR-KO cells), using the CRISPR/Cas9 technology (see materials and methods & Figures S3A to S3E). No expression of *Car* was noticed in the knock-out cells as revealed by qPCR (Supplemental Figure S3C). The impact of IA treatment was then analyzed on WT and KO cells at different timing.

As observed *in vivo* the treatment with IA led to a lower mRNA accumulation of *Id4* at 3h and 6 hours after treatment (Figure 10A). FOXO1 signaling pathway was altered as highlighted by lower mRNA accumulations of its target genes such as *Gata2*, *Tex19.1* and *Cdh1* specifically in WT cells treated with IA at either 6h or 24h after treatment (Figure 10B). These data suggested that the transcriptional activity of FOXO1 must be altered by IA treatment.

We decided to analyze the impact of IA on FOXO1. IA treatment altered *Foxo1* mRNA accumulation at 3h specifically in WT cells (Figure 10C). Interestingly, data confirmed the impact of IA treatment on FOXO1 at protein level (Figure 10C). These effects were CAR dependent as no effect was observed in CAR-KO cells. In addition, altered levels of CDH1 protein was observed specifically in IA- treated WT cells compared to controls (vehicle) (Figure 10D).

The transcriptional activity of FOXO1 has been demonstrated to be related to its post-translational modifications such as phosphorylation²². Data showed that the level of phosphorylated-FOXO1 was higher in IA treated WT cells, whereas no effect of IA was observed on *Car*-KO cells (Figure 10E). Note that a similar impact on P-FOXO1 was observed between vehicle treated CAR-KO cells and IA-treated WT cells (Figure 10E). To define whether phosphorylation of FOXO1 was involved in the effects of IA treatment, experiments were done using a constitutively active FOXO1, retained in the nucleus and so called FOXO1-AAA where phosphorylation site were mutated²². Data showed that transfection using FOXO1-AAA in cells was able to counteract the impact of IA on FOXO1's target genes namely *Gadd45β* at mRNA levels (Figure 10F) and at protein level CDH1 as revealed by western-blot analyses (Figure 10G).

To define how the CAR signaling pathway interact with the FOXO1-phosphorylation in spermatogonia, we focused on the PI3K pathway as it had been demonstrated that FOXO1 is phosphorylated by AKT²³ and that CAR is able to modulate the AKT pathway²⁴. Data showed that the treatment with IA led to an increased in the P-AKT/AKT ratio, that was consistent with the increased level of P-FOXO1 (Figure 11A). The PI3K/AKT and FOXO1 pathways were known to regulate cell proliferation, growth, and survival. Interestingly, the IA treatment led to a lower number of cells in a CAR dependent manner (Figure 11B). No impact of IA was observed on apoptosis (Figure 11C); whereas a lower on proliferation was observed (Figure 11D). Moreover, the present *in vivo* data suggested that IA could alter germ cell differentiation;

interestingly CDH1 (**Figure 10D**), a FOXO1 target gene, is expressed in undifferentiated spermatogonia, where it has been connected to germ cell differentiation.

Combined all these data suggested that FOXO1 might be *phosphorylated* by Akt, and this *phosphorylation* might lead to the exclusion from the nucleus (that we must confirm), which decreased the transcriptional activity of FOXO1. Consistently with the lower level of FOXO1, it could be hypothesized that IA might lead to degradation of FOXO1, as recent findings suggested a degradation of FOXO1 upon phosphorylation by Akt²⁵.

The CAR-FOXO1-ac-H4 alters spermiogenesis.

It had been demonstrated that FOXO1 initiates a cascade of events that influence later steps of spermatogenesis²⁰. Even if the mechanism had not been defined, it was suggested that alteration of FOXO1 in spermatogonia leads to defect during post-meiotic steps²⁰. The present data showed an alteration of the spermiogenesis process associated with a modulation of the transition between round and elongated spermatid stages following IA exposure (**Figure 4**). This was reflected by modulation of the epigenetic mark ac-histone H4. We wondered whether there could be a link between CAR inhibition, via IA exposure, modulation of FOXO1 and altered level of Histone H4 acetylation. It is even more interesting as the modulation of ac-H4 plays critical roles in spermatogonia and spermatids homeostasis. The *in vitro* analyses revealed that exposure to IA led to a reduced ratio of H4ac/H4 compared to vehicle treated condition in WT cells (**Figure 12A**). The negative effect of the IA was not observed in *Car*-KO cells (**Figure 12A**). The impact of IA exposure on the level of ac-H4 was observed at 3 hours after treatment (**Figure 12A**), suggesting that it did not involve transcriptional CAR activity but might rely on modulation of intra-cellular signaling pathways leading to the modulation of histone acetylases or deacetylases. To define whether it involved FOXO1, experiments were performed using FOXO1-AAA transfected cells. When cells were transfected with FOXO1-AAA. The negative effect of the IA was not observed on ac-H4 levels (**Figure 12B**). Combined all these data suggested that CAR inhibition altered ac-H4 levels through FOXO1, what was consistent with altered ac-H4 levels and spermiogenesis defect (round/elongated spermatid ratio) *in vivo*.

CAR inhibition could lead to long term alterations of germ cell through epigenetic modulations.

In addition, next to ac-H4, during the screening of actors to understand how neonatal exposure could lead to impact in adults, we analyzed epigenetic modulators that were already defined to be involved in the process of the developmental origin of health and diseases. Among them, we identified that IA exposure led to altered mRNA accumulation of *Dnmt3a* and *Dnmt1* (DNA methyltransferase 3A and 1) (**Figure 12C**). These data opened some

perspectives to better decipher how the initial impact of IA-CAR signaling pathway was memorized within testis leading to alteration of germ cell lineage and by the end to fertility disorders.

Discussion.

Over the last decades, following its discovery, the nuclear receptor CAR has emerged as a critical player in the liver physiology, where it controls metabolic physiological processes. It has been associated with development of hepatic disorders such as non-alcoholic fatty liver disease. In that line, the modulation of CAR transcriptional activity is associated with the development of liver pathologies following acute or chronic exposure to environmental molecules such as pesticides¹⁷. It is interesting to note that many natural or synthetic environmental molecules have been described to modulate its activity. Indeed, CAR exhibit the ability to bind multiple molecules and the ligand specificity is species dependent²⁶. It represents a wide variety of structurally diverse compounds that are housed in the CAR-ligand binding pocket²⁶. CAR plays a major role in the detoxification process of exo- and endo-genous molecules.

Surprisingly, while xenobiotics are known to be associated with male fertility disorders, the role of CAR as a xenobiotic receptor on testicular pathophysiology and thus on fertility has never been fully studied before in the context of environmentally induced pathologies. This is even more relevant as previous data have demonstrated that CAR signaling pathway is effective within the adult mouse testis. In addition, we have previously shown that in adult mice, CAR inverse agonist treatment was associated with deleterious effects on the testes in the context of abnormal bile acid homeostasis¹⁵. Indeed, adult exposure to CAR-IA (androstanol) was able to increase the rate of apoptotic germ cells¹⁵.

The role of CAR in the response to xenobiotics and the presence of its pathway in the testis pave the way that CAR could be involved in testicular pathologies in the context of the developmental origin of health and diseases. It is important to decipher the mediators of the deleterious impacts of xenobiotics on male reproductive functions as the incidence of various male reproductive disorders such as cryptorchidism, testicular cancer, and low sperm count has gradually increased in some parts of the world over the last decades^{27,28}. It has been hypothesized that these abnormalities may be related, at least in part, to increasing exposure to environmental pollutants. In that line, the use of experimental rodent models has demonstrated that the fetal and neonatal periods are critical windows of sensitivity to toxic substances. This is mainly related to the fact that these are critical developmental windows for the testis and that alterations in testicular physiology during these periods could lead to fertility disorders in adults.

The present data clearly demonstrate for the first time the impact of the modulation of

CAR signaling pathway during neonatal period on testicular physiology, with immediate impacts in early neonatal development and consequences in adulthood, at least on fertility. It is well established that the relationship between CAR and xenobiotics is complex ; loss of CAR function can increase or decrease the organism's sensitivity to a given xenobiotic^{6,26}. It seems that CAR activation using the TCPOBOP has no major impact on male fertility. Interestingly the present data suggest that CAR deficiency have some effects on male fertility associated with a smaller testis in these mice compared to WT males. In addition, the present data demonstrate that CAR inhibition using exposure to an inverse agonist leads to male fertility disorders. These data clearly show that inhibition of CAR activity, either by using the genetic invalidation strategy (KO mice) or by a pharmacological approach have similar phenotypes but with some differences at the molecular levels. This opens interesting perspectives that need to be focused on at the molecular level to better understand the mechanisms of action of CAR in the context of IA exposure. Indeed, if the mechanisms are well described for the direct or indirect activation of CAR, few works have focused on the mechanisms related to its inhibition. An inverse agonist is a drug that binds to the same receptor as an agonist but induces an opposite response, it is thus expected that its effects must be different than what is observed in the KO where the receptor is not present and thus cannot interact with either co-activators or co-repressors. This is complicated to reconcile for CAR, as this nuclear receptor has established a "reverse" paradigm of nuclear receptor action, where the receptor is active in the absence of ligand and inactive when bound to inverse agonists.

However, it is interesting to note that CAR inhibition and deficiency affected in the same way key factors that must be linked with the alteration of fertility ranging from altered neonatal spermatogonia with the gonocytes-spermatogonia transition. This was associated, between *Car*^{-/-} and IA-treated WT mice, with similar alterations of germ cell localization and at the molecular level with alteration of FOXO1 and ac-H4.

The initial impacts of CAR inhibition using the IA are associated with alterations of spermatogonia. The present data show that the inhibition of the CAR signaling pathway using IA leads to abnormal regulation of FOXO1 signaling pathway. These results are consistent with reports showing that when CAR interacts with a ligand in the cytoplasm then translocate to the nucleus; the activated CAR binds to FOXO1, thereby blocking its interaction with the insulin-responsible sequence (IRS) in the gene promoters²¹. Thus CAR acts as a co-repressor of the transcription factor FOXO1, which positively regulates the expression of genes encoding gluconeogenic enzymes such as PEPCK1 (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase-1) and G6Pase (Glucose-6-phosphatase)²¹. These data illustrate the numerous physiological functions regulated by the CAR; however, its mechanisms of action are not completely elucidated. Moreover, a CAR-mediated decrease in miR-122 produces activation of the Akt through initiation of the cMyc-FoxM1-Nedd4-1- PTEN pathway²⁹ and subsequent Akt-Foxo1-

mediated decrease of p21³⁰. In that line, the present data demonstrate the interferences of CAR signaling with the AKT and then the FOXO1 signaling pathway, which is known to control spermatogonia renewal and survival^{20,31,32}.

We need to better understand how exposure to CAR IA leads to modulation of FOXO1 cellular localization and thus alters its activity in spermatogonia. The effect of IA on FOXO1 seems to be very rapid at 3h suggesting that it might involve intracytoplasmic signaling rather than transcriptomic effects. The present data show that following IA exposure, CAR pathway leads to AKT-phosphorylation, then phosphorylation of FOXO1 and in turn it might lead to exclusion from the nucleus (that must be defined using cellular fraction experiments) and to its lower transcriptional activity. Interestingly, at the molecular level, both FOXO1 and CAR have to be dephosphorylated to translocate to the nucleus. It must be noticed that for both this process is mediated by the phosphatase PP2A. There is thus a need for additional studies to clearly decipher CAR and FOXO1 interactions in the context of IA treatment.

Another important result of this work is the finding that of CAR inhibition decreases male fertility, what appears to be related to an alteration in sperm quality rather than an impact on germ cell production. CAR inhibition was also associated with regulation of epigenetic processes through the modulation of the lysine acetylation of histone H4, which is known to be critical in spermatogonia homeostasis³³ but also in spermatids³⁴. This later being associated with altered histone to protamine transition³⁵, which leads to the generation of abnormal sperm cell and male fertility disorders³⁶.

This is consistent with the observation that IA exposure was associated with altered spermiogenesis as revealed by the abnormal ratio between seminiferous tubules with round and/or elongated spermatids. This suggests that there must be an abnormal histone to protamine transition; what was previously demonstrated to be associated with fertility disorders. As the acetylation of histone H4 has been demonstrated to be a key initiator of spermiogenesis, we analyzed the impact of IA on this. Interestingly, IA exposure leads, specifically in WT males, to a decrease of ac-H4 levels compared to vehicle treated males. No effect of IA was observed in *Car*^{-/-} males. Interestingly, data showed that this effect was FOXO1-dependent as transfection with the constitutive nuclear form of FOXO1 counteracted this effect of IA. This suggests that CAR impacts intra-cellular signaling pathways rather than acting at the transcriptional level. This was sustained by the fact that the effect of IA on the level of ac-H4 was rapid within 3 hours. This FOXO1-dependent alteration of ac-H4 could therefore be the cause of impaired spermatogenesis. This could partly explain the impact of FOXO1 on the late stages of spermatogenesis, which was previously observed without identification of the molecular mechanisms²⁰.

Even if the precise molecular interactions must be defined, these data highlight the crosstalk between CAR-FOXO1 and the acetylation of H4, which might be at the origin of the

altered spermiogenesis, leading to abnormal histone to protamine transition and in turn to male infertility.

These data are relevant because it has been shown that exposure to xenobiotic had an increased risk of persistent azoospermia. The present work helps to further understand fertility disorders in the context of xenobiotic exposure and provides new perspectives to work on as it demonstrates for the first time that the nuclear receptor CAR, a known receptor for many environmental molecules, participates to testicular pathophysiology. This is of major importance as the impact of pollutants is a public health issue due to the increasing number of molecules, which could have a serious impact on human health.

In conclusion, all these data indicate that inhibition of the CAR signaling pathway could pave the way for better understanding of the impacts of environmental molecules on male reproduction and could open new perspectives for treatment solutions for fertility disorders.

Materials and Methods

Experimental procedures

Animals

C57Bl/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) mice were acclimated at least 2 weeks before experiments. The *Car*^{-/-} mice used have been previously described¹⁷. The mice used in this study were maintained in a C57BL/6J background.

Mice were housed in temperature-controlled rooms with 12 hours light/dark cycles. Mice had *ad libitum* access to food and water. The refinement is based on the housing and monitoring of the animals as well as the development of protocols that consider the animal welfare. This has been achieved by enriching the cages (cardboard tunnel and mouse houses). The mice were housed in social groups with cage sizes that complied with the legislation according to the number of mice.

Mice were exposed from 1 to 10 days postnatal with DMSO or androstanol (IA) (25mg/kg) subcutaneously (5µL). Organs were harvested at several time points after from 5dpn, 10dpn or at adulthood (3 months and 8 months) after exposure. The number of animals per group was defined on independent experiments to validate the reproducibility of results.

To minimize the confounders, several independent experiments were done, and groups of animals were not sacrifice in the same order from one experiment to another. These protocols have already been performed in adult mice where no suffering was reported in the time frame of our experiment. However, we have performed daily monitoring of the animals in the first few days following the injections. We have checked for signs of suffering activity disorders or physiological changes such as altered feces, increased weight loss in response to bile acids. The signs observed will be abnormal weight loss or activity disorders (hypoactivity), hunched

back, sunken eyes. No case suffering signs were reported.

This study was conducted in accordance with current regulations and standards approved by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Animal Care Committee and by the animal care committee (CE2EA Auvergne; APAFIS#16680-2020072216408245 v1).

4.2. Fertility Test

Each male was mated at night with a female C57Bl6J (Charles River) for 10 days. Mating was monitored daily for vaginal plugging to determine if mating had occurred. After 17 days, the mating efficiency was inspected and the number of pups per litter was counted.

4.3. Histology

The testes were collected, fixed in 4% PFA and embedded in paraffin, and 5µm-thick sections were prepared and stained with H&E.

4.4. In vivo TUNEL Analysis.

TUNEL experiments were performed, as previously described on 5µm of testis fixed in paraformaldehyde 4%. The results are expressed as the relative number of TUNEL positive cells per seminiferous tubules. Vehicle groups of each genotype have been arbitrarily set at 100.

4.5. Immunohistochemistry

5µm sections were mounted on positively charged glass slides (Superfrost plus), deparaffinized, rehydrated, treated for 20 min at 93°–98°C in 0.01 M citric buffer-tween 0.1% (pH 6), rinsed in osmosed water (2 × 5 min), and washed (2 × 5 min) in Phosphate-buffered saline (PBS). Immunohistochemical studies were conducted according to the manufacturer's recommendations. Slides were then counterstained with Hoechst medium (1 mg/mL) and then mounted on PBS/glycerol (50/50). The antibodies used are reported in **Table S1**. Vehicle groups of each genotypes have been arbitrarily set at 1.

4.6. Cell line approaches.

C18-4 cells (were obtained from Dr Froment, France) were used as previously described³⁷. *Car* knockout cells (*Car*^{-/-}) were generated as following:

*** Generation of Crispr/CAS9 *Car* deficient C18-4cells**

For the generation of the *Car* knockout cells, using Crispr/CAS9 approach (**see Supplementary Fig.3**). Guides were defined based on the mm9 version of the mouse genome and using the website <http://crispor.tefor.net/>. The sequences used are for guide-1: AGCCCTACAAGTCAGGGCG and for guide-2: TAGTGTTAGCATAGCTGTCA. Then, the

guides were introduced on PX458: pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene Plasmid #48138) and PX459: pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene Plasmid #62988). pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 48139; <http://n2t.net/addgene:48139> ; RRID:Addgene_48139)³⁸. Guides were cloned on vectors at the BbsI restriction site.

C18-4 cells were plated on 6-well plates and transfected, using Jet PEI (Ozyme) with 1 µg of guide 1 in PX458 (expressing pfg) and 2 µg of guide 2 in PX459. 24 hours after transfection, using GFP expression, C18-4 cells were sorted by FACS (BD FACSMelody™ Cell Sorter from BD Biosciences) and plated as individual cell in a 96-well plate in GC1spg conditioned medium (DMEM and 1% SVF). The clones were then validated by sequencing and genotyping. Primer sequences for PCR see **Table S2**.

For non-transfected C18-4 or *Car*-KO cells, cells were plated in 6 well plates. 24 hours after plating, cells were treated for with vehicle (DMSO, 1/1,000), IA 10⁻⁶µM. Then, cells were harvested at different time points later, and messenger RNA (mRNA) or protein extractions were performed.

*** Transient Transfection.**

For over-expression. C18-4 cells were transfected with Jet-PEI RNA (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) in six-well plates (50,000 cells per well). The plasmids vector of FOXO1-AAA (Addgene #9023) or empty vector were transfected at 200 ng per well.

*** BrdU incorporation.** To define proliferation rate, cells were treated with IA or DMSO for 24hours. Cells were then incubated with BrdU (10µM) for the one last hour. Then cells were washed with PBS1X and then fixed with methanol. The detection of BrdU was performed using primary antibody anti-Bromodeoxyuridine (11170376001, Merck) revealed with specific Alexa488-coupled secondary antibody.

*** TUNEL.** For TUNEL experiments, cells were fixed with PFA 4% on 6 well plates and then the experiments were performed as described above in the immunohistochemistry section. The revelation of the staining was visualized by immunofluorescence.

4.7. Real-time RT-PCR

RNA from C18-4 cells samples was isolated using RNAzol. cDNA was synthesized from total RNA with the MMLV and random hexamer primers (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The real-time PCR measurement of individual cDNA was performed using SYBR green dye (Master mix Plus for SYBR Assay, *Takara Bio*) to measure duplex DNA formation with the Eppendorf-Realplex system. For each experiment, standard curves were generated

with pools of cDNA from cells with different genotypes and/or treatments. The results were analyzed using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method. Primers sequences are reported in **Table S3**.

4.8. Western Blotting

Cells or testis proteins were extracted from tissues using RIPA lysis buffer completed with protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). Antibodies were suspended in Tris-buffered saline, 0.1% Tween, and 5% BSA. The list of Abs used is given in the Supporting Information (**Table S4**).

4.10. Magnetic Cell sorting.

Testis cell suspensions from adult WT or *Car*^{-/-} males were used for spermatogonia using selection for CD90 using antibodies conjugated to MACS microbeads (CD90; Miltenyi Biotec).

4.11. Statistical Analyses

4.11.1. Pre-processing of data. For some *in vivo* experiment raw number of positive cells is given for each group in dedicated graphs and then to analyze the impact of pharmacological molecules compared to vehicle groups; vehicle groups of each genotype have been arbitrarily set at 100.

4.11.2. Data presentation. All numerical data are represented as mean \pm SEM. Significant difference was set at $P < 0.05$.

4.11.4. Statistical methods. Error bars represent SEM. Differences between groups were determined by ANOVA or two-way ANOVA. Multiple comparisons were made with by Dunnett or Holm-Sidak's test respectively for ANOVA1 and ANOVA2. Spearman correlation test was used for analysis.

4.11.5. Statistical analyses were done using Sigmastat software.

5. Acknowledgments. We thank Sandrine Plantade, Khirredine Ouchen and Philippe Mazuel for their help at the animal facility. We also thank the AniPath platform from the GReD for histological analysis on mice.

Grant supports. The study was funded by Inserm; CNRS; Université Clermont Auvergne. Team Volle also received supports from *Ligue contre le cancer* (Comité Puy de Dôme); Mélusine Monrose received support from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (ARCD0C42021020003357); Laura Thirouard and Manon Garcia received support from the *Fondation Recherche Médicale* (FDT202001010780 and R17089CC). Volle's team received support by the Cancer-Inserm (C20010CS) and by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

7. Author contributions. All authors agree with this publication.

Perform and design exp M.M and V. DH

Perform experiments M.M, T.L, H.H, M.M, G.M, dH. A, D-S. C, R. Y, S. J-P.

Participate to write the paper: M.M, F.C, B. C & V. DH

Corresponding Author and Lead Contact: V. DH

8. Data availability. Data are available from corresponding author.

9. Competing interests. The authors have no conflict of interest.

References.

1. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A. & Chyatte, M. R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* **13**, (2015).
2. Sharlip, I. D. *et al.* Best practice policies for male infertility. *Fertil. Steril.* **77**, 873–882 (2002).
3. Ding, H. *et al.* Reproductive toxicity of linuron following gestational exposure in rats and underlying mechanisms. *Toxicol Lett* **266**, 49–55 (2017).
4. Volle, D. H. *et al.* The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3752–3764 (2009).
5. Guengerich, F. P., Waterman, M. R. & Egli, M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends Pharmacol Sci* **37**, 625–640 (2016).
6. Wang, Y.-M., Ong, S. S., Chai, S. C. & Chen, T. Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **8**, 803–817 (2012).
7. Yoshinari, K., Kobayashi, K., Moore, R., Kawamoto, T. & Negishi, M. Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett* **548**, 17–20 (2003).
8. Hosseinpour, F., Moore, R., Negishi, M. & Sueyoshi, T. Serine 202 regulates the nuclear translocation of constitutive active/androstane receptor. *Mol Pharmacol* **69**, 1095–1102 (2006).
9. Mutoh, S. *et al.* Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor CAR (NR113). *J Biol Chem* **284**, 34785–34792 (2009).
10. Choi, H. S. *et al.* Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR. *J Biol Chem* **272**, 23565–23571 (1997).
11. Li, H., Chen, T., Cottrell, J. & Wang, H. Nuclear translocation of adenoviral-enhanced yellow fluorescent protein-tagged-human constitutive androstane receptor (hCAR): a novel tool for screening hCAR activators in human primary hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **37**, 1098–1106 (2009).
12. Hernandez, J. P., Mota, L. C. & Baldwin, W. S. Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation. *Curr Pharmacogenomics Person Med* **7**, 81–105 (2009).
13. Forman, B. M. *et al.* Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* **395**, 612–615 (1998).
14. Jyrkkäinen, J. *et al.* Molecular dynamics simulations for human CAR inverse agonists. *J Chem Inf Model* **52**, 457–464 (2012).

15. Martinot, E. *et al.* Bile acid homeostasis controls CAR signaling pathways in mouse testis through FXR α . *Sci Rep* **7**, 42182 (2017).
16. Oliviero, F. *et al.* Constitutive Androstane Receptor: A Peripheral and a Neurovascular Stress or Environmental Sensor. *Cells* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells9112426> (2020).
17. Lukowicz, C. *et al.* Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environ. Health Perspect.* **126**, 067007 (2018).
18. Tzamelis, I., Pissios, P., Schuetz, E. G. & Moore, D. D. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol* **20**, 2951–2958 (2000).
19. Amir, S. *et al.* Endocrine Disruptors Acting on Estrogen and Androgen Pathways Cause Reproductive Disorders through Multiple Mechanisms: A Review. *Int J Environ Res Public Health* **18**, 1464 (2021).
20. Goertz, M. J., Wu, Z., Gallardo, T. D., Hamra, F. K. & Castrillon, D. H. Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *J Clin Invest* **121**, 3456–3466 (2011).
21. Kodama, S., Koike, C., Negishi, M. & Yamamoto, Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol* **24**, 7931–7940 (2004).
22. Zhang, X. *et al.* Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem* **277**, 45276–45284 (2002).
23. Fabre, S. *et al.* Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control. *J Immunol* **174**, 4161–4171 (2005).
24. Yarushkin, A. A., Mazin, M. E., Pustyl'nyak, Y. A., Prokopyeva, E. A. & Pustyl'nyak, V. O. Activation of the Akt pathway by a constitutive androstane receptor agonist results in β -catenin activation. *European Journal of Pharmacology* **879**, 173135 (2020).
25. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K. & Fukamizu, A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11285–11290 (2003).
26. Timsit, Y. E. & Negishi, M. CAR and PXR: The Xenobiotic-Sensing Receptors. *Steroids* **72**, 231–246 (2007).
27. Serrano, T., Chevrier, C., Multigner, L., Cordier, S. & Jégou, B. International geographic correlation study of the prevalence of disorders of male reproductive health. *Hum. Reprod.* **28**, 1974–1986 (2013).
28. Skakkebaek, N. E. A Brief Review of the Link between Environment and Male Reproductive Health: Lessons from Studies of Testicular Germ Cell Cancer. *Horm Res Paediatr* **86**, 240–246 (2016).
29. Promotion of liver growth by CAR is accompanied by Akt pathway activation and FoxM1-Nedd4-mediated repression of PTEN - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31394088/>.
30. CAR-mediated repression of Cdkn1a(p21) is accompanied by the Akt activation - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29890134/>.
31. Sinha, D. *et al.* Cep55 overexpression causes male-specific sterility in mice by suppressing Foxo1 nuclear retention through sustained activation of PI3K/Akt signaling. *FASEB J* **32**, 4984–4999 (2018).
32. Wang, J. *et al.* Effects of Diabetes Mellitus on Sperm Quality in the Db/Db Mouse Model and the Role of the FoxO1 Pathway. *Med Sci Monit* **27**, e928232 (2021).
33. Hazzouri, M. *et al.* Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**, 950–960 (2000).
34. Bao, J. & Bedford, M. T. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction* **151**, R55-70 (2016).
35. Awe, S. & Renkawitz-Pohl, R. Histone H4 acetylation is essential to proceed from a

histone- to a protamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Syst Biol Reprod Med* **56**, 44–61 (2010).

36. Arévalo, L. *et al.* Loss of the cleaved-protamine 2 domain leads to incomplete histone-to-protamine exchange and infertility in mice. *PLoS Genet* **18**, e1010272 (2022).

37. Zinc transporter ZIP12 maintains zinc homeostasis and protects spermatogonia from oxidative stress during spermatogenesis - PubMed.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35065654/>.

38. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**, 2281–2308 (2013).

39. Thirouard, L. *et al.* Identification of a Crosstalk among TGR5, GLIS2, and TP53 Signaling Pathways in the Control of Undifferentiated Germ Cell Homeostasis and Chemoresistance. *Adv Sci (Weinh)* e2200626 (2022) doi:10.1002/adv.202200626.

Figure-1

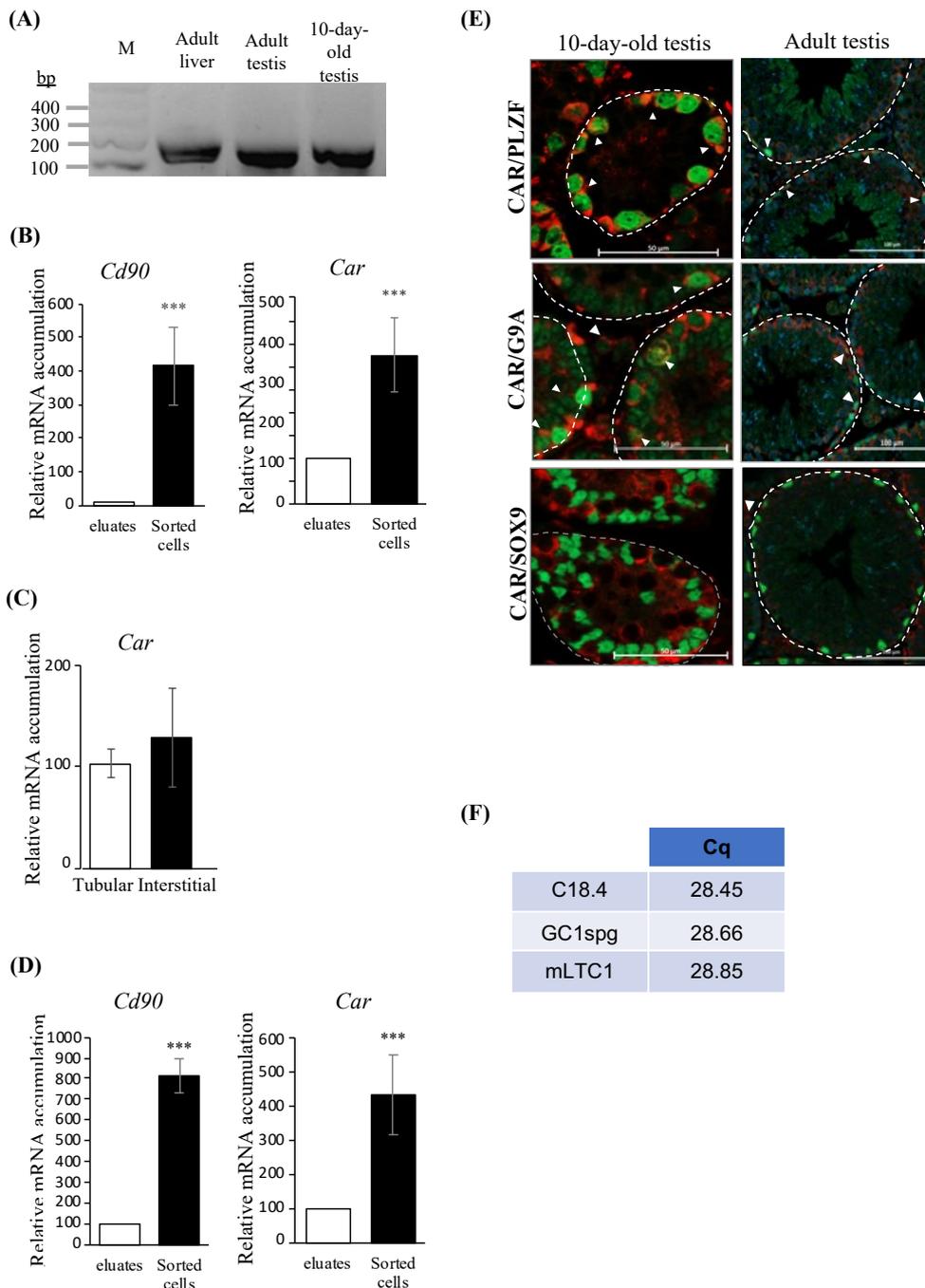


Figure-1. *Car* is expressed in mouse testis.

(A) Representative image of RT-PCR analysis of the expression of *Car* mRNA in adult liver, adult testis and 10-day-old testis.

(B) *Car* mRNA accumulations normalized to β -actin in CD90+ cells isolated from 6 to 7 days or adult of males. n=5. The CD90- unsorted cell group was arbitrary set at 100.

(C) *Car* mRNA accumulations normalized to β -actin in tubular and interstitial cells isolated from adult mouse testis. The tubular cells were arbitrary set at 100.

(D) *Car* mRNA accumulations normalized to β -actin in CD90+ cells isolated from adult days of males. n=5. The CD90- unsorted cell group was arbitrary set at 100.

(E) Representative micrographs of immuno-staining in mouse neonatal and adult testis for CAR (red) and PLZF (green), or G9A (green) or SOX9 (green). The white arrowheads indicate co-stained cells. The dotted lines delineate the seminiferous tubules.

(F) Table of quantification cycles for *Car* mRNA detection in C18-4, GC1spg and mLTC1 cell lines.

In panels, n=5 to 20. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: ***, p<0.001.

Figure-2

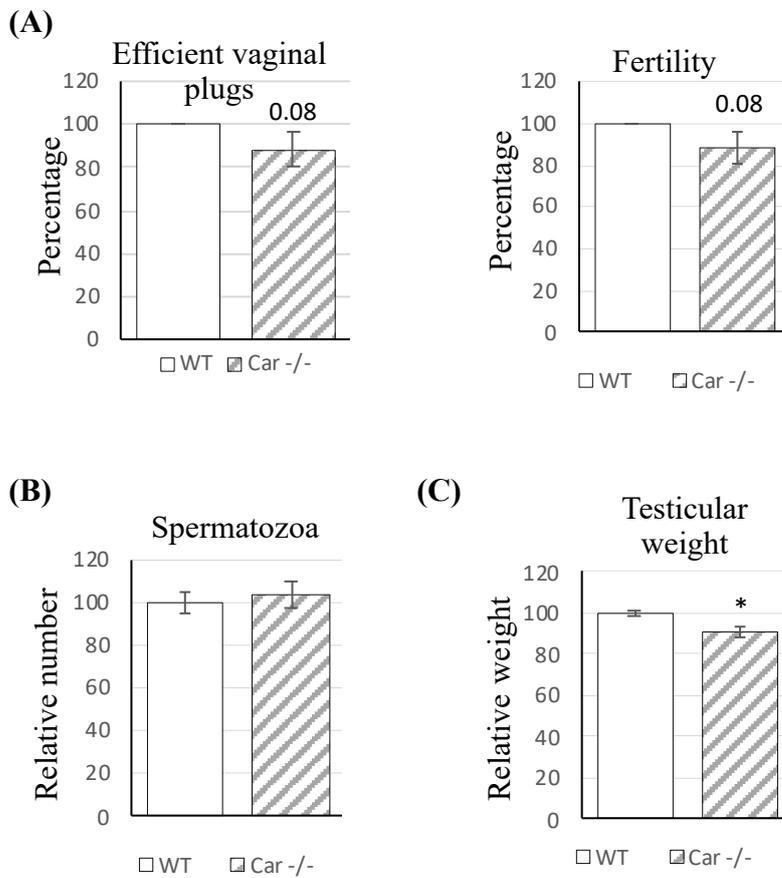


Figure-2. Inhibition of CAR using inverse agonist leads to male infertility.

(A) Percentage of efficient vaginal plugs and percentage of fertile *WT* or *Car^{-/-}* males at 8-month-old of age.

(B) Number of sperm count in the epididymis head of *WT* or *Car^{-/-}* males at 8-month-old of age.

(C) Testicular weights of *WT* or *Car^{-/-}* males at 8-month-old.

In all panels, n=8 to 20. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05.

Figure-3

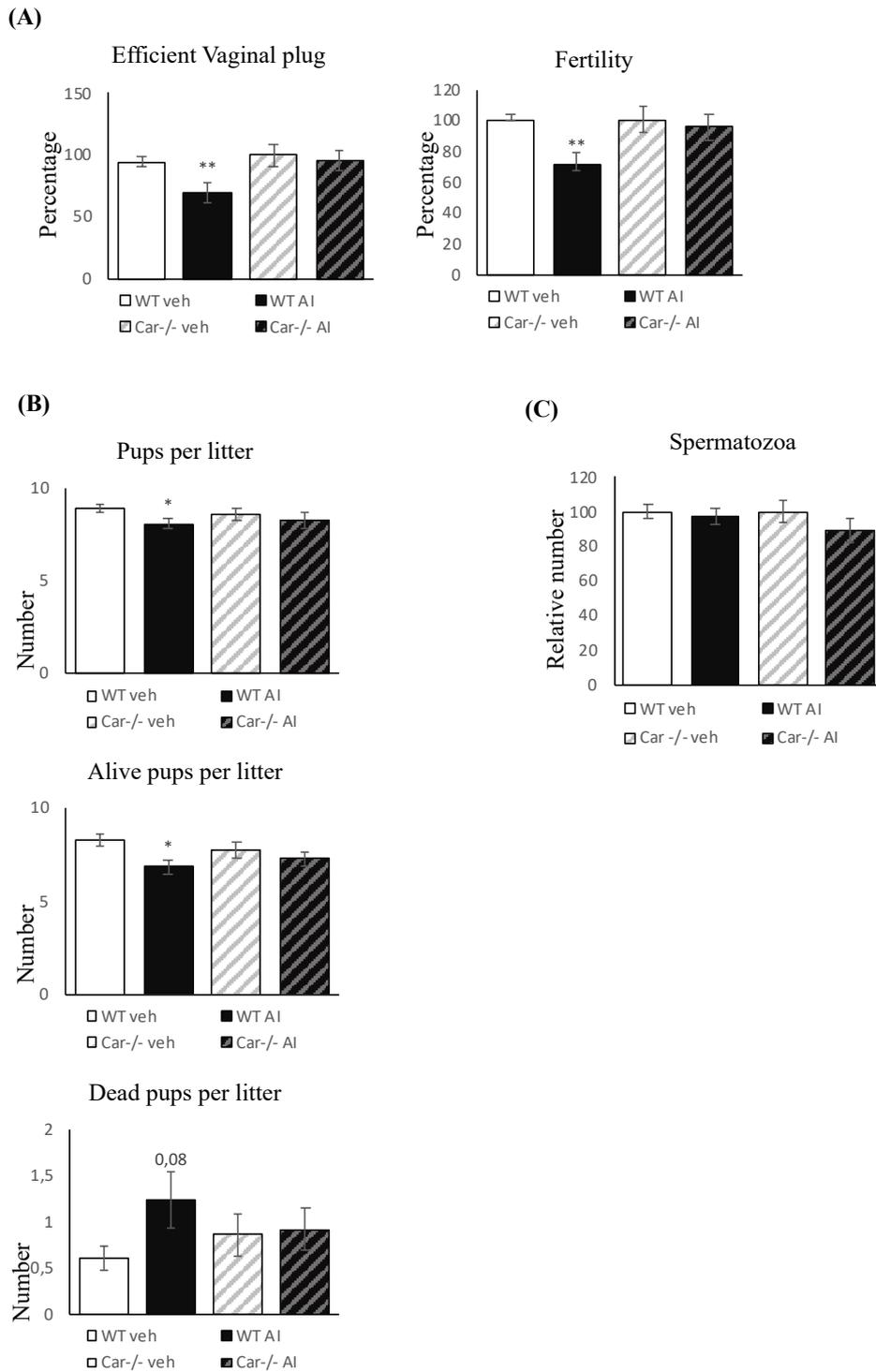


Figure-3. Inhibition of CAR using inverse agonist leads to male infertility.

(A) Percentage of efficient vaginal plugs and percentage of fertile *WT* or *Car^{-/-}* males at 8-month-old of age after neonatal exposure to IA or vehicle.

(B) Number of fecundations, as well as the number of alive and dead pups per litter obtained from fertile *WT* or *Car^{-/-}* males at 8-month-old of age after neonatal exposure to IA or vehicle.

(C) Number of sperm count in the epididymis head of *WT* or *Car^{-/-}* males at 8-month-old of age after neonatal exposure to IA or vehicle.

In all panels, n=8 to 20. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01.

Figure-4

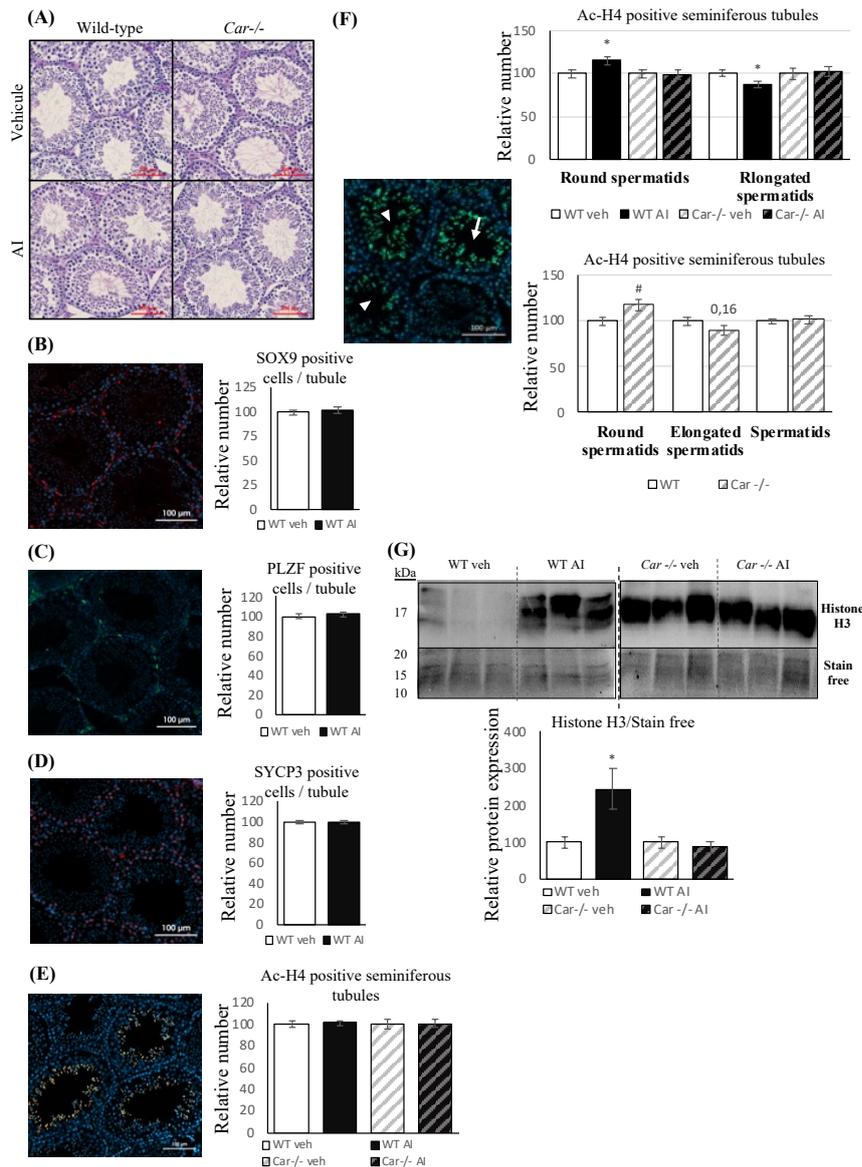


Figure-4. Inhibition of CAR using inverse agonist alters adult testicular histology.

(A) Representative micrographs of hematoxylin/eosin-stained testes of *WT* or *Car^{-/-}* males 8 months after neonatal exposure to IA or vehicle.

(B) (Left) Representative micrograph of testis stained for SOX9. (Right) Quantification of the number of SOX9 positive seminiferous tubules in testis of *WT* males 8 months after neonatal exposure to IA or vehicle.

(C) (Left) Representative micrograph of testis stained for PLZF. (Right) Quantification of the number of PLZF positive seminiferous tubules in testis of *WT* males 8 months after neonatal exposure to IA or vehicle.

(D) (Left) Representative micrograph of testis stained for SYCP3. (Right) Quantification of the number of SYCP3 positive seminiferous tubules in testis of *WT* males 8 months after neonatal exposure to IA or vehicle.

(E) (Left) Representative micrograph of testis stained for acetylated histone H4 (ac-H4). (Right) Quantification of the number of ac-H4 positive seminiferous tubules in testis of *WT* or *Car^{-/-}* males 8 months after neonatal exposure to IA or vehicle.

(F) Quantification of the number of seminiferous tubules with either round or elongated spermatids in testis of *WT* or *Car^{-/-}* males 8 months after neonatal exposure to IA or vehicle (upper graph and *WT* and *Car^{-/-}* in normal condition (bottom panel) as determined using ac-H4 staining. Arrows indicate seminiferous tubules with round spermatids; arrow heads indicate seminiferous tubules with elongated spermatids.

(G) (Upper panel) Representative western blots of H3, and (Bottom panel) quantification of H3 versus total proteins in sperm cells of *WT* or *Car^{-/-}* males 8 months after neonatal exposure to IA or vehicle. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

In all panels, n=8 to 20. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; vs respective vehicle group for each genotype. #, p<0.05; vs respective vehicle group for each genotype.

Figure-5

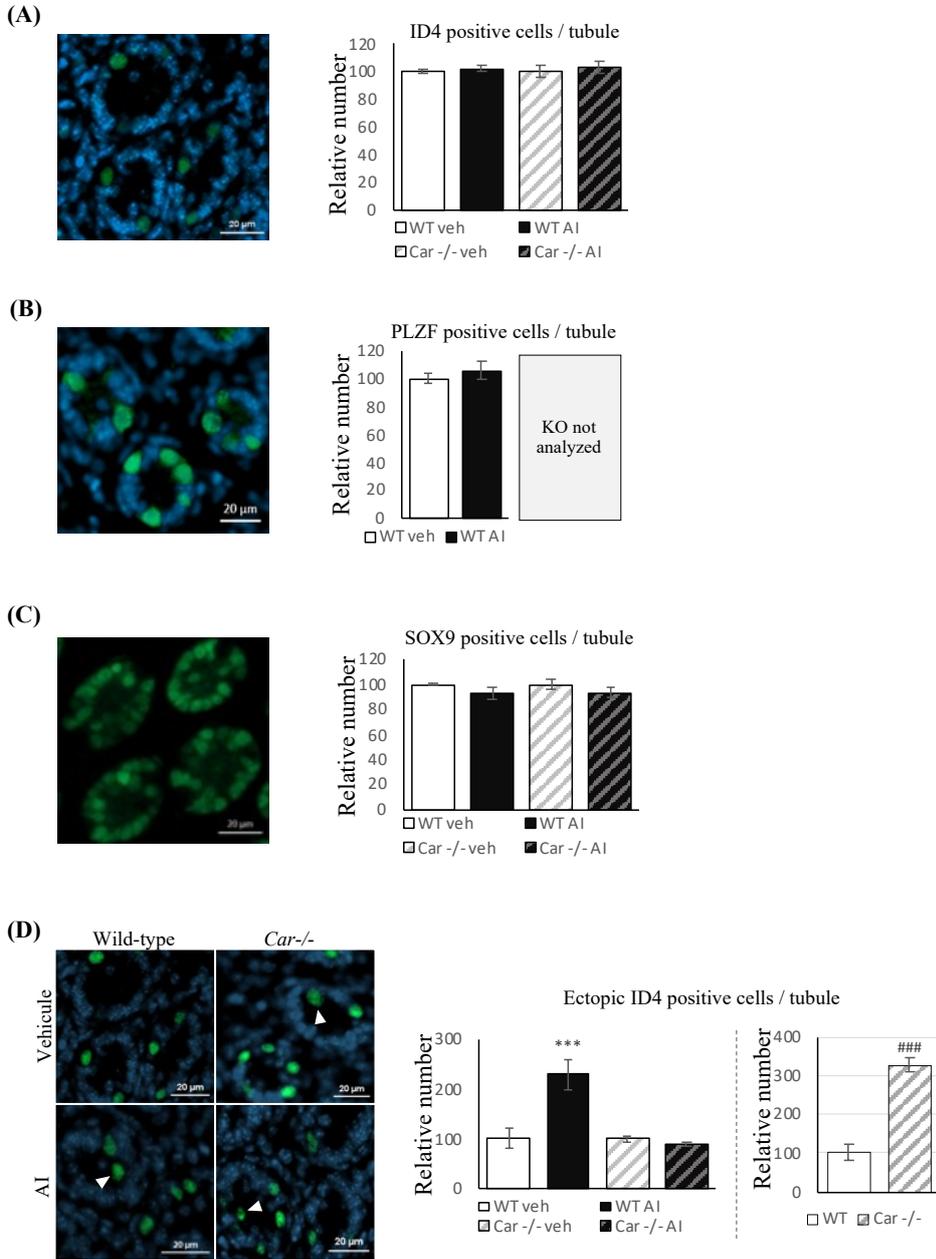


Figure-5 Inhibition of CAR using inverse agonist alters neonatal testicular histology at 5 days.

(A) (Left) Representative micrograph of testis stained for ID4. (Right) Quantification of the number of ID4 positive seminiferous tubules in testis of vehicle or IA treated *WT* or *Car^{-/-}* males at 5 day-postnatal.

(B) (Left) Representative micrograph of testis stained for PLZF. (Right) Quantification of the number of PLZF positive seminiferous tubules in testis of vehicle or IA treated *WT* males at 5 day-postnatal.

(C) (Left) Representative micrograph of testis stained for SOX9. (Right) Quantification of the number of SOX9 positive seminiferous tubules in testis of vehicle or IA treated *WT* or *Car^{-/-}* males at 5 day-postnatal.

(D) (Left) Representative micrographs of vehicle or IA treated *WT* or *Car^{-/-}* testis stained for ID4 and showing ectopic cells. (Right) Quantification of the number of ID4 ectopic positive cells per seminiferous tubule in testis of vehicle or IA treated *WT* or *Car^{-/-}* males at 5 day-postnatal.

In all panels, n=8 to 20. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: ***, p<0.001; vs respective vehicle group for each genotype. ###, p<0.001; vs respective vehicle group for each genotype.

Figure-6

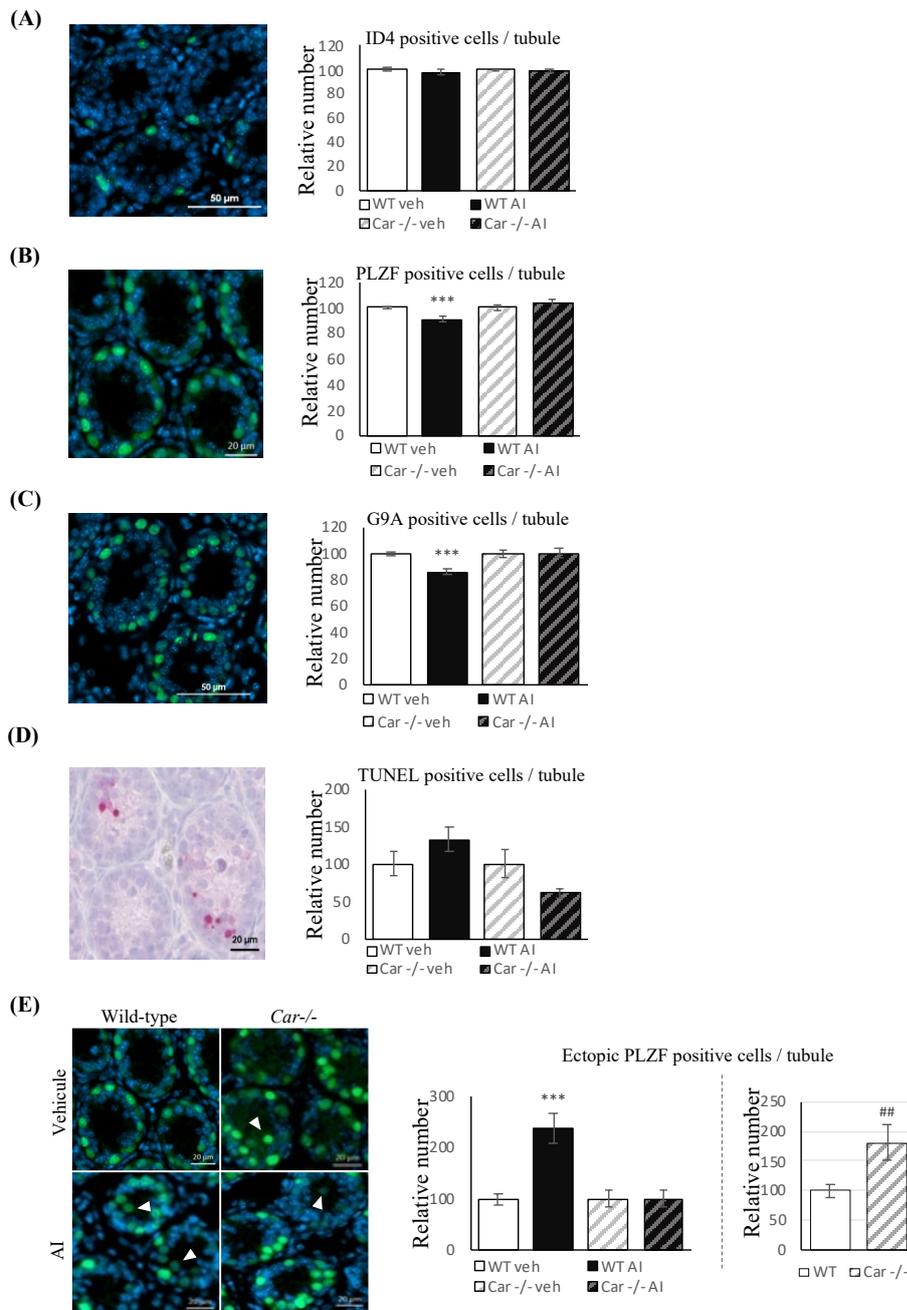


Figure-6 Inhibition of CAR using inverse agonist alters neonatal testicular histology at 10 days.

(A) (Left) Representative micrographs of vehicle or IA treated WT or Car^{-/-} testis stained for ID4. (Right) Quantification of the number of ID4 positive seminiferous tubules in testis of vehicle or IA treated WT or Car^{-/-} males at 10 day-postnatal.

(B) (Left) Representative micrograph of testis stained for PLZF. (Right) Quantification of the number of PLZF positive seminiferous tubules in testis of vehicle or IA treated WT males at 10 day-postnatal.

(C) (Left) Representative micrograph of vehicle testis stained for G9A. (Right) Quantification of the number of G9A positive seminiferous tubules in testis of vehicle or IA treated WT or Car^{-/-} males at 10 day-postnatal.

(D) (Left) Representative micrograph of testis stained for TUNEL. (Right) Quantification of the relative number of TUNEL positive cells for 100 seminiferous tubules of WT or Car^{-/-} males treated with the vehicle or IA treatment at 10 day-postnatal.

(E) (Left) Representative micrographs of vehicle or IA treated WT or Car^{-/-} testis stained for PLZF and showing ectopic cells. (Right) Quantification of the number of PLZF ectopic positive cells per seminiferous tubule in testis of vehicle or IA treated WT or Car^{-/-} males at 10 day-postnatal.

In all panels, n=8 to 20. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: ***, p<0.001 vs respective vehicle group for each genotype. ##, p<0.01 vs respective vehicle group for each genotype.

Figure-7

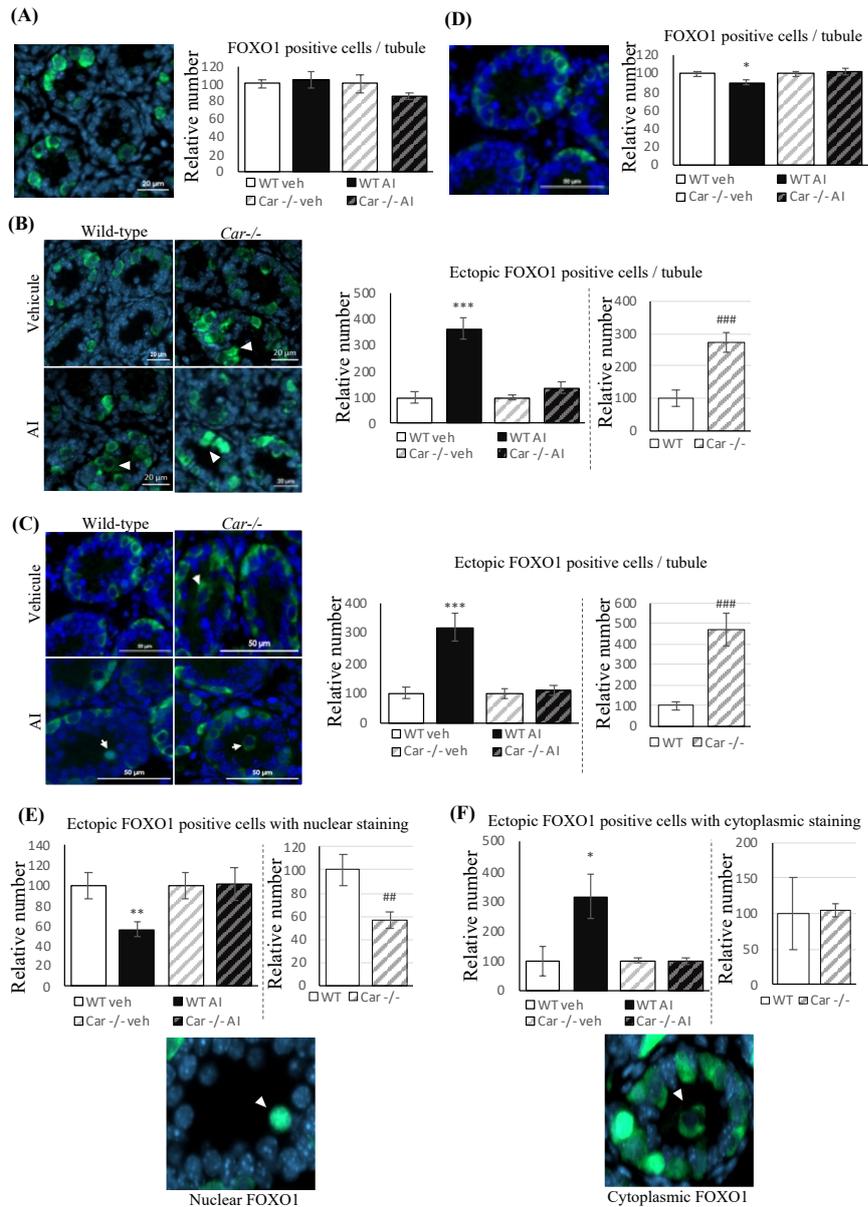


Figure-7 Inhibition of CAR using inverse agonist alters neonatal testicular FOXO1.

(A) (Left) Representative micrograph of testis stained for FOXO1. (Right) Quantification of the number of FOXO1 positive cells per seminiferous tubule in testis of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} males at 5 day-postnatal.

(B) (Left) Representative micrograph of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} testis stained for FOXO1 and showing ectopic cells. (Right) Quantification of the number of FOXO1 ectopic positive cells per seminiferous tubule in testis of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} males at 5 day-postnatal.

(C) (Left) Representative micrographs of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} testis stained for FOXO1 and showing ectopic cells. (Right) Quantification of the number of FOXO1 ectopic positive cells per seminiferous tubule in testis of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} males at 10 day-postnatal.

(D) (Left) Representative micrographs of testis stained for FOXO1. (Right) Quantification of the number of FOXO1 positive cells per seminiferous tubule in testis of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} males at 10 day-postnatal.

(E) (Bottom panel) Representative micrographs of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} testis stained for FOXO1 showing its nuclear localization. (Upper panel) Quantification of the nuclear ratio of FOXO1 in ectopic spermatogonia of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} males at 10 day-postnatal.

(F) (Bottom panel) Representative micrographs of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} testis stained for FOXO1 showing its cytoplasmic localization. (Upper panel) Quantification of the cytoplasmic ratio of FOXO1 in ectopic spermatogonia of vehicle or IA treated *WT* or *Car*^{-/-} males at 10 day-postnatal.

In all panels, n=6 to 15. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01, ***, p<0.001 vs WT veh.

respective vehicle group for each genotype. ##, $p < 0.01$, ###, $p < 0.001$ vs respective vehicle group for each genotype.

Figure-8

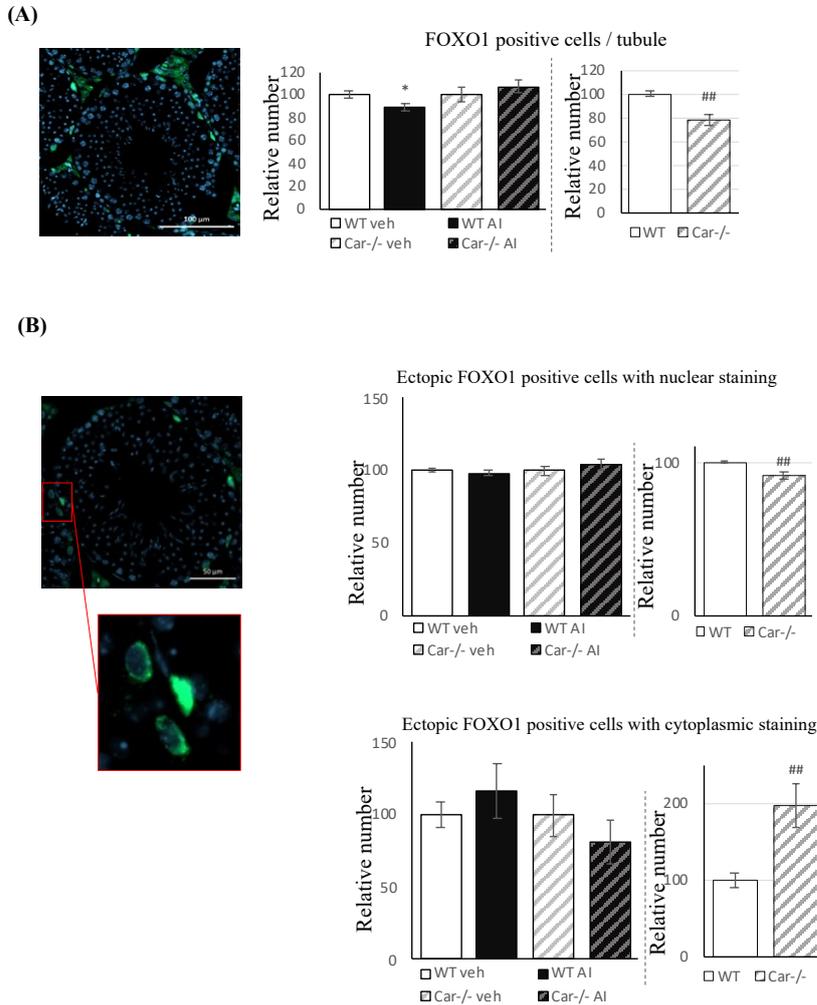


Figure-8 Inhibition of CAR using inverse agonist alters adult testicular FOXO1.

(A) (Left) Representative micrograph of adult testis stained for FOXO1. (Right) Quantification of the number of FOXO1^{ectopic} positive seminiferous tubules in testis of *WT* or *Car*^{-/-} males 8 months after treatment.

(B) (Left) Representative micrographs of adult testis stained for FOXO1 showing its nuclear and/or cytoplasmic localization. (Right) Quantification of the cytoplasmic/nuclear ratio of FOXO1 in spermatogonia of *WT* or *Car*^{-/-} males 8 months after treatment. In all panels, $n=8$ to 20. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, $p < 0.05$ vs respective vehicle group for each genotype. ##, $p < 0.01$ vs respective vehicle group for each genotype.

Figure-9

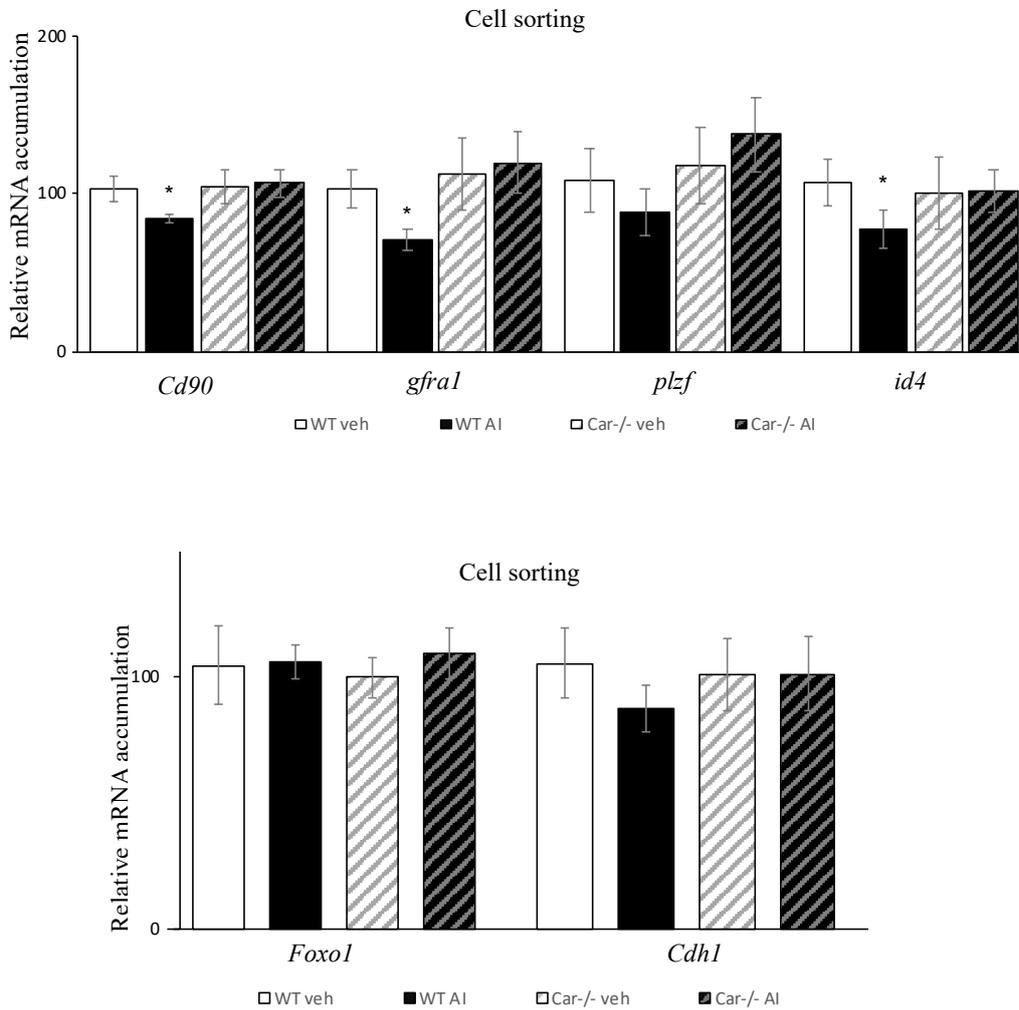
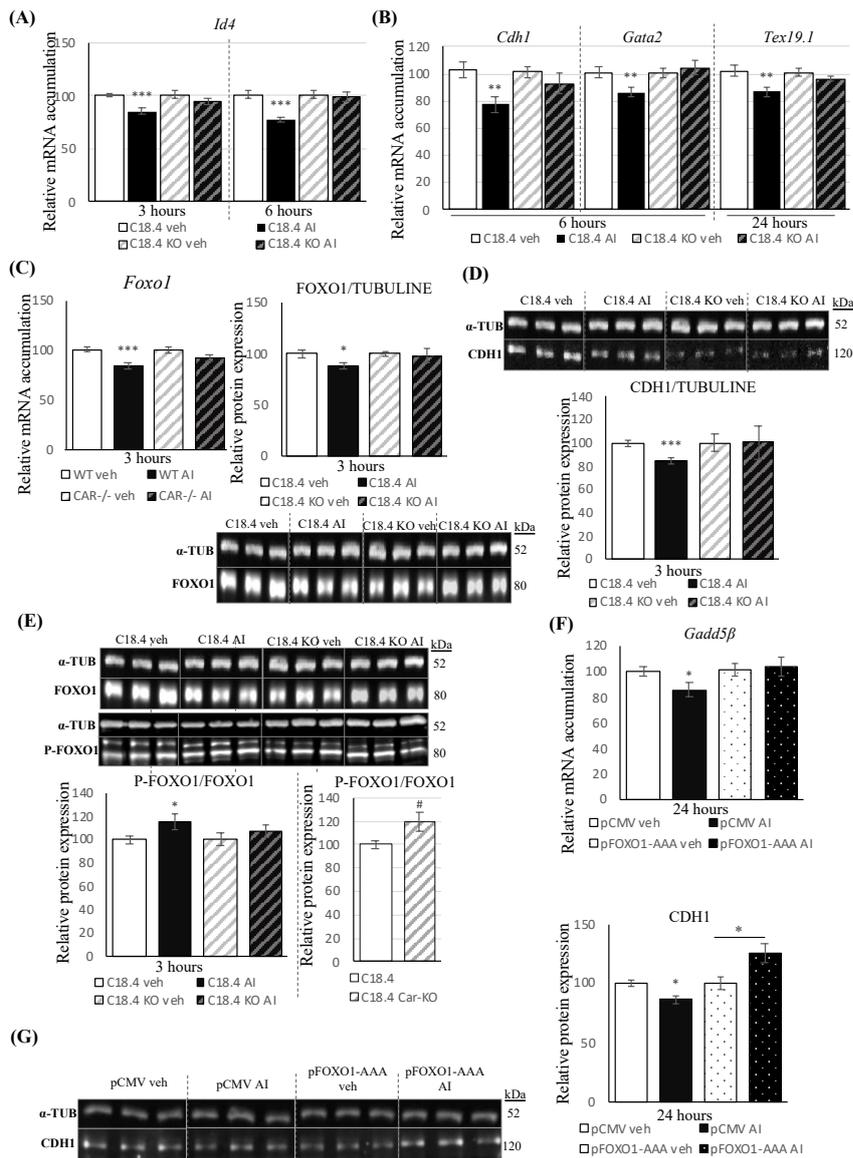


Figure-9 Inhibition of CAR using inverse agonist alters the homeostasis of spermatogonia.

CD90, *Gfra1*, *Plzf*, *Id4*, *Foxo1*, *Cdh1* mRNA accumulations normalized to β -actin in CD90+ isolated spermatogonia 10 days after the treatment with vehicle or IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100. In all panels, n=6. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, p<0.05.

Figure-10

Figure-10 Inhibition of CAR using inverse agonist alters the homeostasis of spermatogonia in C18-4 cell line.

(A) *Id4* mRNA accumulation normalized to β -actin in WT or *Car*^{-/-} C18-4 cell line 3 or 6 hours after the treatment with vehicle or IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(B) *Cdh1*, *Gata2*, and *Tex19.1* mRNA accumulations normalized to β -actin WT or *Car*^{-/-} C18-4 cell line 6 or 24 hours after the treatment with vehicle or IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(C) *Foxo1* mRNA accumulation normalized to β -actin and FOXO1 protein accumulation normalized to α -Tubulin (α -TUB) in WT or *Car*^{-/-} C18-4 cell line 3h after the treatment with vehicle or IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(D) CDH1 protein accumulations normalized to α -Tubulin (α -TUB) in WT or *Car*^{-/-} C18-4 cell line 24 hours after the treatment with vehicle or IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(E) Phospho-FOXO1 and FOXO1 protein accumulations normalized to α -Tubulin (α -TUB) in WT or *Car*^{-/-} C18-4 cell line 3 hours after the treatment. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(F) *Gadd45* mRNA accumulations normalized to β -actin on cells transfected with empty vector or FOXO1-AAA and treated 24 hours with vehicle or with IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(G) CDH1 protein accumulations normalized to α -Tubulin (α -TUB) on C18-4WT cells transfected with empty vector or FOXO1-AAA and treated 24 hours with vehicle or with IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

In all panels, n=6 to 12. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01, ***, p<0.001 vs respective vehicle group for each genotype. #, p<0.05 vs respective vehicle group for each genotype.

Figure-11

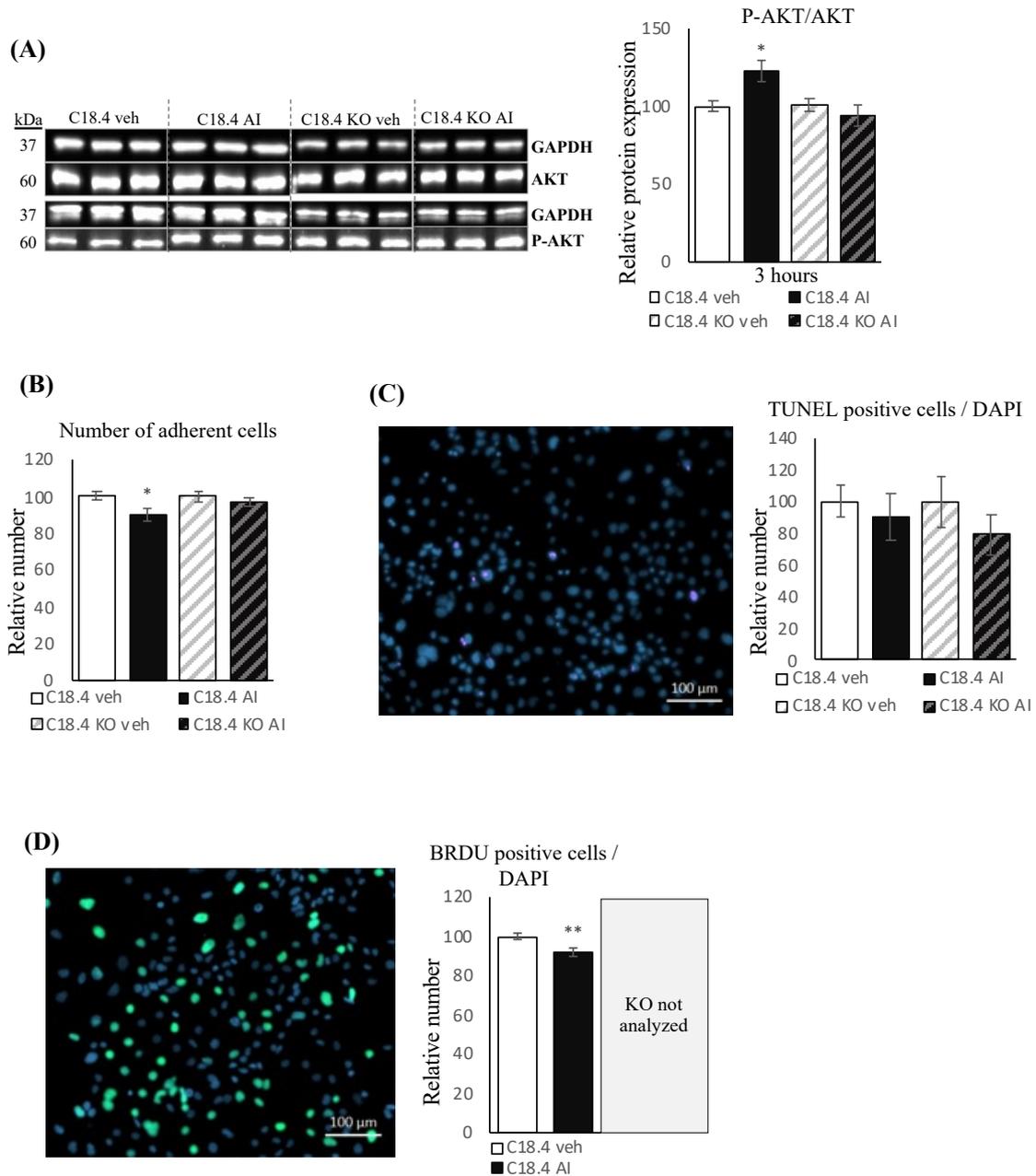


Figure-11 Inhibition of CAR using inverse agonist alters P-AKT-FOXO1 pathway in C18-4 cell line.

(A) P-AKT and AKT protein accumulations normalized to GAPDH in WT or *Car^{-/-}* C18-4 cell line 3 hours after the treatment with vehicle or IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(B) Relative number of adherent cells after 24 h of treatment with vehicle or IA in WT and *Car^{-/-}* cells.

(C) (Left) Representative micrograph of WT or *Car^{-/-}* cells treated with vehicle or IA for 24 h and stained for TUNEL. (Right) Quantification of the relative number of TUNEL positive WT and *Car^{-/-}* cells treated with vehicle or IA for 24 h. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(D) (Left) Representative micrograph of WT cells treated with vehicle or IA for 24 h and stained for BrdU. (Right) Quantification of the relative number of BrdU positive WT cells treated with vehicle or IA for 24 h. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100

In all panels, n=6 to 12. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01.

Figure-12

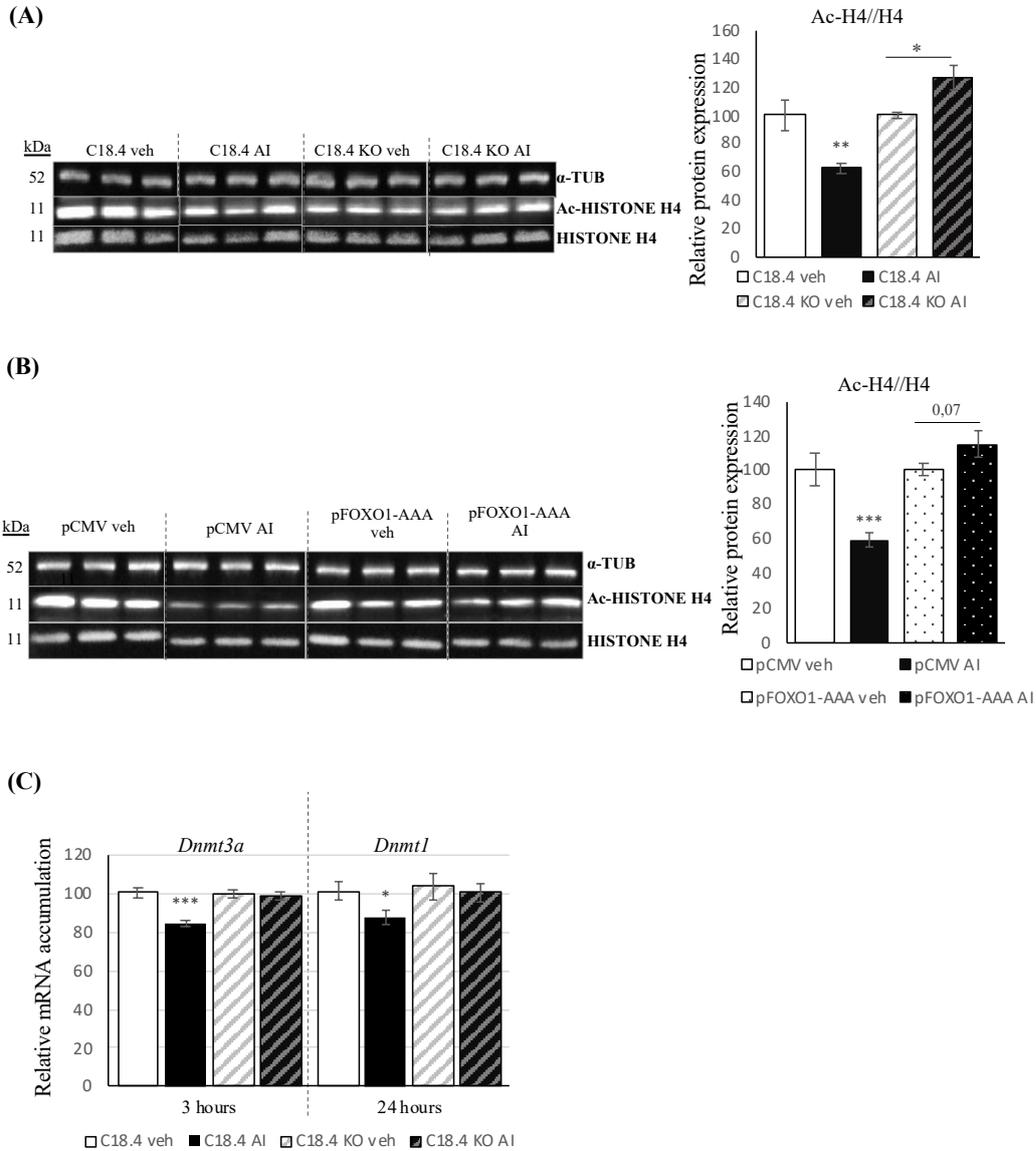


Figure-12. Inhibition of CAR using inverse agonist alters acetylation of H4 in C18-4 cell line.

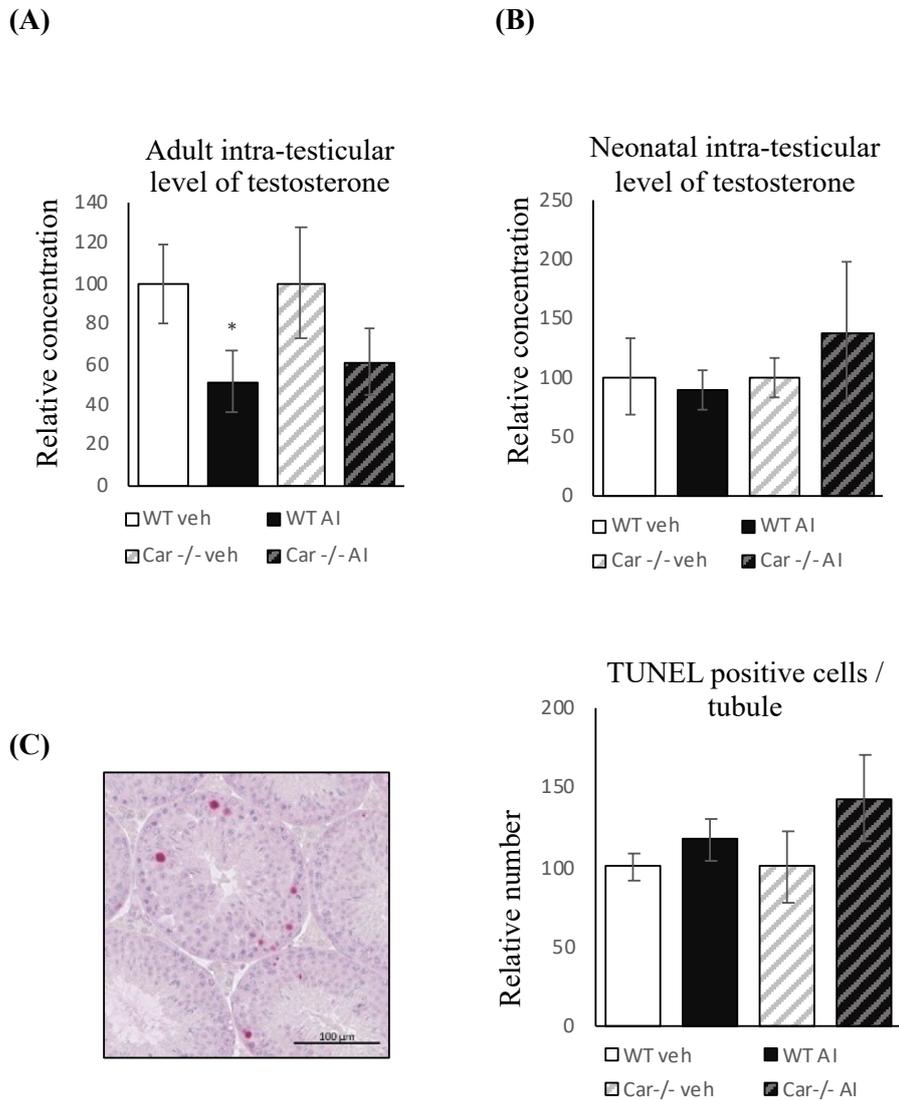
(A) Ac-H4 and H4 protein accumulations normalized to α -Tubuline (α -TUB) in *WT* or *Car^{-/-}* C18-4 cell line 3 hours after the treatment with vehicle or IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(B) Ac-H4 and H4 protein accumulations normalized to α -Tubuline (α -TUB) on cells transfected with empty vector or FOXO1-AAA and treated 3 hours with vehicle or with IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

(C) *Dnmt1* and *Dnmt3a* mRNA accumulations normalized to β -actin of *WT* or *Car^{-/-}* C18-4 cell line 3 or 24 hours after the treatment with vehicle or IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

In all panels, n=6 to 12. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01, ***, p<0.001 vs respective vehicle group for each genotype.

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure S1

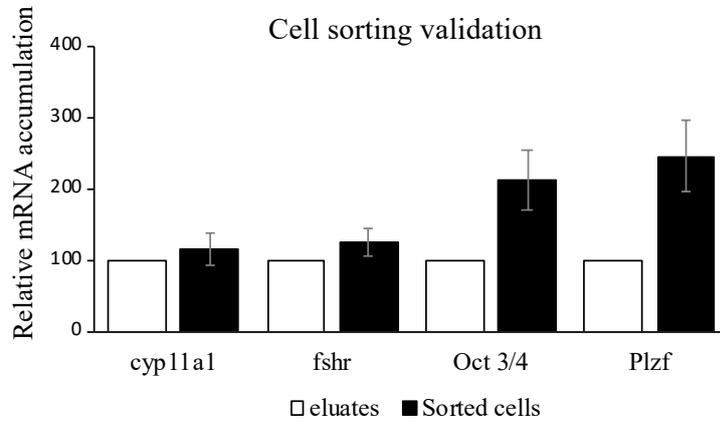
(A) Relative levels of intra-testicular testosterone in WT or *Car^{-/-}* males at 8 months of age months after treatment with vehicle or IA.

(B) Relative levels of intra-testicular testosterone in WT or *Car^{-/-}* males at P10 after treatment with vehicle or IA.

(C) (Left) Representative micrographs of testis stained for TUNEL; (Right) Quantification of the relative number of TUNEL positive cells for 100 seminiferous tubules of WT or *Car^{-/-}* males treated with the vehicle or IA treatment at adulthood.

In all panels, n=6. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05 vs respective vehicle group for each genotype.

Supplemental Figure 2

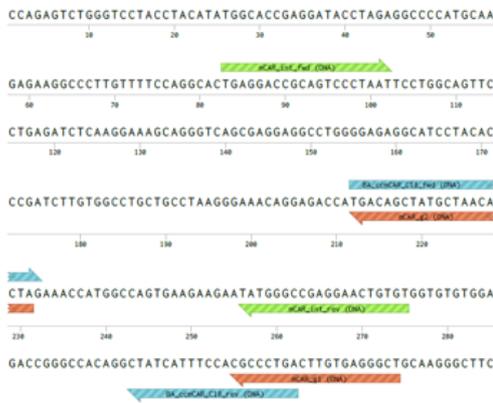


Supplemental Figure S2

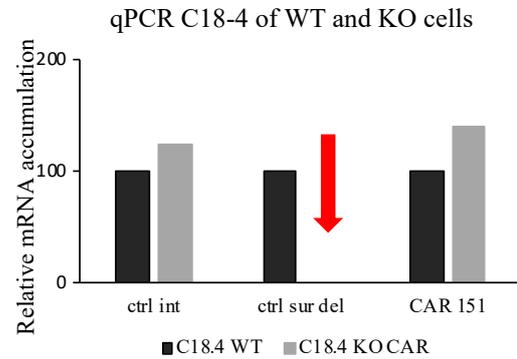
Cyp11a1, *Fshr*, *Oct3/4* and *Plzf* mRNA accumulations normalized to β -actin in CD90+ isolated spermatogonia 10 days after the treatment with vehicle or IA. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.

Supplemental Figure 3

(A) Positions of the RNA guides and of the primers used
mCAR (1428 bp)



(C)



(B) Alignment of the WT and KO DNA

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

C18_WT_CAR TGGCCAGTGCCTGATTCTCAACTCCTCCACATTCAGGAGACCATGACAGCTATGCTAAC
C18_KO_CAR TGGCCAGTGCCTGATTCTCAACTCCTCCACATTCAGGAGACCATGACAGCTATGCTAAC
*****
C18_WT_CAR ACTAGAAACCATGGCCAGTGAAGAAGAATATGGCCGAGGAAGTGTGGTGTGGTGGAGA
C18_KO_CAR ACTAGAAACCATGGCCAGTGAAGAAGAATATGGCCGAGGAAGTGTGGTGTGGTGGAGA
*****
C18_WT_CAR CCGGGCCACAGGCTATCATTCCACGCCCTGACTTGTGAGGGCTGCAAGGGCTTCTTCAG
C18_KO_CAR CCGGGCCACAGGCTATCATTCCAC-----TTGTGAGGGCTGCAAGGGCTTCTTCAG
*****
C18_WT_CAR GTGAATGCTTCCTCCCAACAGAAACACCCCGACATTTCTATCAGTCCACCTTTAAACA
C18_KO_CAR GTGAATGCTTCCTCCCAACAGAAACACCCCGACATTTCTATCAGTCCACCTTTAAACA
*****
C18_WT_CAR CTGGTACACCT
C18_KO_CAR CTGGTACACCT
*****
    
```

(E) Alignment Of WT and KO proteins

```

mcar_transcritl_prot MTAMLTLETMASEEEYGPRNCVCGDRATGYHFEHALTCEGCKGFRRRTVSKTIGPICPFPA 60
mcar_KO_prot -----MITLETMASEEEYGPRNCVCGDRATGYHFL----- 32
*
mcar_transcritl_prot GRCEVSKAQRHRCFACRLQKCLNVGRKIMLSAEALALRFAQAQRAEKASLQINQQQ 120
mcar_KO_prot ----- 32
mcar_transcritl_prot KELVQILLOAHTRHVQFMFDQFVQFKFPAYLFMHRHFPQPRGPVLPLLTHFADINTFMVQ 180
mcar_KO_prot ----- 32
mcar_transcritl_prot QIIFTKDLPFRSLTMEQDQISLLKGAAVEILHISLNTTFCIQTENFFCQPLCYKMEDAV 240
mcar_KO_prot ----- 32
mcar_transcritl_prot HAGFYEFLESILHFHKNLKLHLQPEYVLM AATALFSPDRPGVTQREEIDQLQEMAL 300
mcar_KO_prot ----- 32
mcar_transcritl_prot IIMNHIMEQQSRQLQSRFLYAKLMGLLADLRSINNAYSVELQRLEELSAMTPLLGEIC 358
mcar_KO_prot ----- 32
    
```

(D)



Supplemental Figure S3

- (A) Schematic representation of the experimental design (primers) of Crispr/CAS9 experiment for the deletion of *Car*.
- (B) Alignment of DNA sequences from WT and *Car*-KO C18-4 cells.
- (C) *Car* mRNA accumulation observed in WT and Crispr/Cas9 *Car* knockout C18-4 cells as observed by RT-qPCR. Vehicle treated GC1spg cells were arbitrarily set at 100.
- (D) Sequences of *Car* and of the expected protein following Crispr/CAS9.
- (E) Alignment between wild type *CAR* protein and the truncated protein obtained following Crispr/CAS9 protocol.

Table S1 Antibodies used in immuno-histochemistry experiments.

PLZF, G9A, SOX9, were previously used³⁹

CAR (Perseus), FOXO1 (Cell Signaling, 2880S) and ID4 (Santa Cruz, Sc-491)

Table S2 Primers used for the generation and genotyping of CRISPR/Cas9 *Car*-KO cells.

séquence guide 1 exon 2	mCAR_guide1	AGCCCTCACAAGTCAGGGCG
séquence guide 2 exon 2 sur l'initiation du transcrit	mCAR_guide2	TAGTGTTAGCATAGCTGTCA
primers contrôle genotypage dans intron 1	BA_ccmCARctrl_fwd	gggcagtcttgggaagagat
primers contrôle genotypage dans intron 2	BA_ccmCARctrl_rev	gctgcaagaggattataacttgg
primers contrôle interne autour délétion exon 2	BA_ccmCARctrl_int_fwd	TGAGGACCGCAGTCCCTAAT
primers contrôle interne dans délétion exon 2	BA_ccmCARctrl_int_rev	ACACAGTTCCTCGGCCATA
primers contrôle interne sur deletion du guide 2	BA_ccmCAR_C18_fwd	TGACAGCTATGCTAACACTAG
primers contrôle interne sur deletion du guide 1	BA_ccmCAR_C18_rev	TCAGGGCGTGGAATGATAG
primers au dela de la délétion exon 6	BA_mCAR_151_fwd	GGAGGACCAGATCTCCCTTC
primers au dela de la délétion exon 7	BA_mCAR_151_rev	CTGGAGATGCAGTCCTTTCAG

Table S3 Sequences of primers used in this study.

Id4, *b-actin*, *Gfra1*, *Lhcgr* were used previously³⁹.

Gene name	Forward	Reverse
Tex19.1	CCTCCCTGGTGTTCAGTGCTT	ACTTGCTCGATGGACTGAGG
Gata2	CGATACCCACCTATCCCTCCT	GTGGCACCACAGTTGACACA
Gadd45b	AACGCGGTTCAGAAGATGCAG	TTCATCAGTTTGGCCGCCTC
FOXO1	CAGCAAATCAAGTTATGGAGGA	TATCATTGTGGGGAGGAGAGTC

Table S4. Antibodies used in western blot experiments

Ac-H4, PLZF, SOX9, ACTIN and G9A were previously described³⁹.

FOXO1 (Cell Signaling, 2880S); CDH1 (BD transduction lab, 610182) and Phospho-FOXO Ser 256 (cell Signaling 9461S).

B. Discussion

L'objectif de ce travail était d'identifier les rôles de CAR dans la physiologie et les physiopathologies testiculaires notamment dans un contexte d'expositions environnementales aux xénobiotiques.

L'ensemble des données présentées dans cette étude démontre que le récepteur CAR, exprimé notamment au sein de la lignée germinale de la naissance à l'âge adulte, joue un rôle dans la régulation de la physiologie testiculaire, puisque l'inhibition néonatale de sa signalisation impacte la fertilité des animaux à l'âge adulte. En effet, le traitement postnatal de P1 à P10 à l'androstanol (AI), un agoniste inverse spécifique de la forme murine de CAR (mCAR), entraîne une augmentation de l'incidence de la stérilité chez les mâles âgés de 8 mois, comparé aux animaux du groupe contrôle. Les mâles exposés à l'AI de CAR qui restent fertiles présentent néanmoins une diminution du nombre de petits par portée, associée à une augmentation de la mortalité *in utero*. Le nombre de spermatozoïdes n'étant pas impacté par l'inhibition de la signalisation CAR, ces résultats suggèrent que les troubles de la fertilité observés résulteraient d'une altération de la qualité spermatique provoquée par l'exposition néonatale à l'AI. En effet, nos données confirment notamment à l'âge adulte une augmentation de la rétention de l'histone H3 dans les spermatozoïdes des individus traités avec l'AI, suggérant des défauts de spermiogenèse ; comme le révèle également la modification des ratios H4ac/H4 associée à une modulation des pourcentages respectifs des tubes séminifères présentant des spermatides rondes et des spermatides allongées. Pour mieux comprendre l'origine des altérations observées, nous avons étudié à P5 et à P10 les impacts précoces du traitement à l'AI sur la physiologie testiculaire. Nos résultats suggèrent que l'inhibition de la signalisation CAR altère l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées en affectant leur différenciation, lors de la transition gonocytes-spermatogonies, notamment *via* le dérèglement de la signalisation AKT-FOXO1. L'altération de cette signalisation semble corrélée à de nombreux défauts testiculaires, notamment des modifications épigénétiques au sein des spermatogonies, ce qui pourrait permettre d'expliquer en partie l'impact à long terme du traitement néonatal. Cependant des questions subsistent pour mieux comprendre les rôles de CAR dans la physiologie et les physiopathologies testiculaires.

1. Les effets délétères de l'inhibition de la signalisation CAR observés sur la fonction de reproduction ont-ils une origine testiculaire et spécifique à la lignée germinale ?

L'inhibition de la signalisation CAR par le traitement AI a été réalisée pendant les 10 premiers jours de la vie des souris mâles ; ainsi l'altération des capacités de reproduction observée à l'âge adulte se met nécessairement en place pendant cette fenêtre de développement néonatale, en accord avec le concept d'hypersensibilité de ce stade développemental. D'après les résultats obtenus *in vivo*, en période néonatale le récepteur CAR est majoritairement exprimé dans le compartiment tubulaire du testicule, au sein de la lignée germinale indifférenciée. De plus, nous avons démontré l'expression du gène *Car* *in vitro* dans la lignée cellulaire immortalisée de spermatogonies de souris (C18.4). Les études réalisées au sein de la lignée cellulaire C18.4 (cf. 2.), nous ont également permis d'identifier une signalisation CAR active au sein de ce type cellulaire, même si celle-ci est complexe et inattendue comme le reflète l'analyse des niveaux d'expression d'un de ses gènes cibles (*Cyp2b10*) (cf. 2.). Ces données soutiennent l'hypothèse d'un impact direct du traitement AI sur les spermatogonies indifférenciées, médié spécifiquement par CAR comme démontré par l'utilisation de souris invalidées pour le gène *Car* (*Car* *-/-*), et par l'utilisation de cellules rendues déficientes pour le gène *Car* grâce à l'approche CRISPR/Cas9.

Cependant, la possibilité que les altérations testiculaires observées résultent d'effets systémiques provoqués par l'inhibition de la signalisation CAR ne peut pas être exclue dans l'état d'avancement actuel de notre projet. En effet, d'après la littérature, le récepteur CAR est fortement exprimé dans le foie, où il régule notamment la détoxification des xénobiotiques ainsi que les métabolismes glucidique et lipidique, comme présenté dans l'introduction. Les rôles de CAR sont multiples et des études ont démontré qu'il intervient également dans le métabolisme de molécules endobiotiques tels que les acides biliaires, *via* la régulation de l'expression de gènes codant des enzymes de détoxification et de transporteurs d'efflux (Saini et al. 2004), (Jun Zhang et al. 2004), (Lickteig et al. 2019). Or, notre équipe a démontré en 2014 des liens entre pathologies hépatiques (cholestases) et atteintes testiculaires (Baptissart et al. 2014). En effet, les souris mâles nourries avec un régime riche en acide cholique présentent une augmentation plasmatique des niveaux d'acides biliaires, corrélée à des atteintes testiculaires conduisant à une baisse de la fertilité. En passant par la circulation sanguine, les acides biliaires peuvent atteindre le testicule et altérer la spermatogenèse. Ces effets sont médiés par le récepteur membranaire des acides biliaires TGR5/GPBAR1 (*G protein-coupled bile acid receptor 1*),

exprimé au sein de la lignée germinale. L'activation de la signalisation TGR5 module l'expression de protéines responsables d'interaction cellules-cellules, entraînant ainsi, une rupture de la barrière hémato-testiculaire, une apoptose des cellules germinales post-méiotiques, une diminution du nombre de spermatozoïdes produits et *in fine* une baisse de la fertilité masculine. En 2017, nous avons également démontré que l'invalidation du gène codant le récepteur nucléaire des acides biliaires FXR/ NR1H4 (*Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4*), chez les souris nourries avec un régime riche en acide cholique, conduit à des altérations de la physiologie testiculaire et à une baisse de la fertilité. Ces données ont été corrélées à des modifications de la composition du pool d'acides biliaires hépatiques et testiculaires (Martinot et al. 2017). Cette étude suggère également que le testicule est capable de synthétiser des acides biliaires, puisque les enzymes nécessaires à leur synthèse y sont exprimées. L'invalidation du gène *Fxr* altère l'expression de gènes codant ces enzymes, ce qui conduit à l'accumulation testiculaire de métabolites intermédiaires de la synthèse d'acides biliaires, notamment inhibiteurs de la signalisation CAR. Le traitement de souris sauvages adultes avec l'agoniste inverse de CAR androstanol a permis de reproduire le phénotype d'hypofertilité observé dans cette étude, suggérant des rôles de CAR dans la physiopathologie testiculaire à l'âge adulte. Il est intéressant de noter que ce phénotype est indépendant d'une altération de la synthèse de testostérone. Cela est en accord avec les résultats de notre étude qui montre que les impacts de l'inhibition néonatale de la signalisation *Car* sur la fertilité sont également indépendant des modulations des taux de stéroïdes sexuels.

Ce lien entre la signalisation CAR et l'homéostasie des acides biliaires est bien établi au niveau hépatique. En effet, une étude a démontré que l'invalidation du gène *Car* chez la souris sensibilise les animaux aux dommages hépatiques causés par les acides biliaires (Stedman et al. 2005). De plus, si les souris invalidées pour le gène *Car* présentent une diminution globale de la concentration plasmatique d'acides biliaires, l'augmentation spécifique de la concentration plasmatique de certains acides biliaires tels que les acides désoxycholique et muricholique a été identifiée (Lickteig et al. 2019). Cependant, l'impact de l'inhibition de la signalisation CAR sur la physiologie hépatique n'a pas clairement été identifié dans la littérature. Une étude a cependant démontré que l'utilisation de l'androstanol permet de protéger de l'hépatotoxicité induite par le paracétamol *via* la diminution des niveaux d'enzymes permettant de métaboliser la molécule (Jun Zhang et al. 2002). Ainsi, il ne peut pas être exclu que l'inhibition de la signalisation CAR pourrait impacter la production, notamment hépatique, d'enzymes de détoxication des acides biliaires, entraînant par exemple l'accumulation de ces

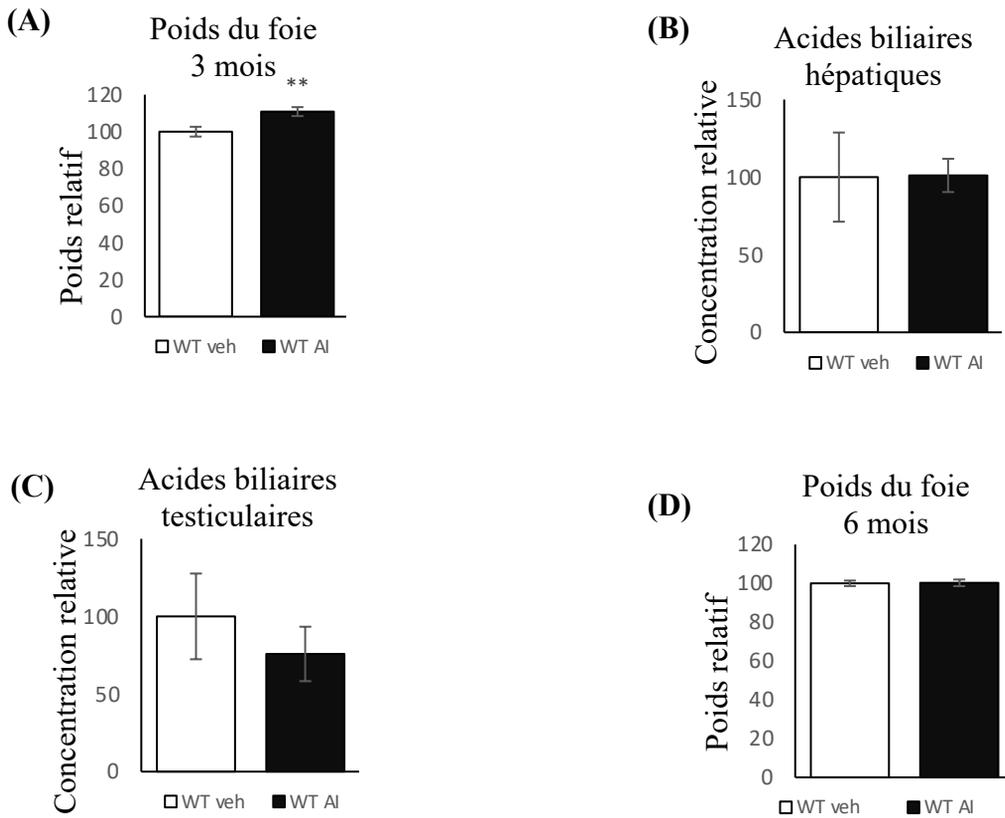


Figure 26 : Analyse de la physiologie hépatique à l'âge adulte

(A) Masse relative hépatique à 3 mois. Le traitement avec l'AI entraîne une augmentation de la masse relative du foie à 3 mois, suggérant une altération de la physiologie hépatique.

(B) Dosage hépatique des acides biliaries.

(C) Dosage testiculaire des acides biliaries.

(D) Masse relative hépatique à 6 mois.

Les données du groupe contrôle (veh) ont été fixées arbitrairement à 100.

derniers ou bien la modification de la composition de leur pool au niveau testiculaire. Ces modifications de la physiologie hépatique pourraient ainsi induire des atteintes testiculaires.

Nous avons abordé une partie de ce lien potentiel entre une altération hépatique et les atteintes testiculaires. Ainsi, dans mon projet de thèse, les données obtenues chez les souris traitées de manière néonatale avec l'AI révèlent à 3 mois une augmentation de la masse relative du foie, suggérant une altération de la physiologie hépatique (**Figure 26 A**). Cependant, le dosage des niveaux d'acides biliaires hépatiques et testiculaires sur une cohorte d'animaux âgés de 3 mois n'a pas révélé de différence significative entre les groupes contrôle et traité avec l'AI (**Figure 26 B et C**). De plus, la fertilité des animaux n'est pas altérée à ce stade. Par ailleurs, l'augmentation de la masse hépatique semble réversible puisqu'elle n'est pas retrouvée à 8 mois, au moment où les animaux sauvages traités avec l'AI de CAR présentent une baisse de fertilité (**Figure 26 D**). De plus, comme rapporté précédemment, l'inactivation totale du gène *Car* chez la souris entraîne une altération de la physiologie hépatique (Lukowicz et al. 2019). De manière cohérente avec l'altération de la fertilité et des atteintes testiculaires, cette atteinte hépatique chez les animaux *Car*^{-/-}, pourrait être présente comme le reflète la diminution du poids du testicule dans notre étude.

Ainsi, l'analyse de l'homéostasie des acides biliaires au niveau hépatique, plasmatique et testiculaire chez les souris de 10 jours et de 8 mois permettrait de définir leur potentielle implication dans les atteintes testiculaires observées en réponse au traitement AI. Les dérégulations du métabolisme des acides biliaires pourraient être identifiées par des méthodes de dosage d'immuno-absorption enzymatique (ELISA), par spectrométrie de masse et par l'analyse en qPCR des niveaux de transcrits de gènes codant les enzymes clés de leur biosynthèse. En effet, outre la quantité d'acides biliaires, il serait fondamental d'analyser les altérations qualitatives du pool d'acides biliaires, puisque les différents acides biliaires n'ont pas les mêmes propriétés physico-chimiques ni de signalisations, et que tous ne sont pas forcément associés à l'apparition de défauts testiculaires (Baptissart et al. 2014). En parallèle, l'utilisation d'animaux invalidés spécifiquement pour le gène *Car* dans certains types cellulaires en utilisant le système de recombinaison Cre-Lox, afin d'exprimer la recombinase CRE sous le contrôle d'un promoteur spécifique, notamment dans la lignée germinale (Vasa-Cre, (Gallardo et al. 2007)) ou dans les hépatocytes (albumine-CRE, (Weisend et al. 2009)), est fondamentale pour répondre à cette question.

Il est connu dans la littérature que les souris invalidées pour le gène *Car* présentent une augmentation des taux de testostérone plasmatique (Lukowicz et al. 2019). De plus nous avons identifié l'expression de *Car* dans l'espace interstitiel et dans la lignée de cellules Leydig MLTC1, ce qui suggère que les modulations de la signalisation CAR pourraient impacter la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig. Nous avons donc analysé l'impact de l'utilisation néonatale de l'AI sur la production de testostérone intra-testiculaire. De manière surprenante, nous avons observé une diminution de taux de testostérone intra-testiculaire en réponse à l'AI chez les souris sauvages ainsi que chez les souris invalidées pour le gène *Car*. Cet impact sur la stéroïdogénèse montre un effet non spécifique de l'AI, indépendant donc de la signalisation CAR. Cependant, ces résultats apportent des informations intéressantes qui suggèrent que la diminution des niveaux de testostérone intra-testiculaire à la suite du traitement néonatal avec l'AI ne contribue pas aux atteintes de la fertilité des animaux. En effet, la fertilité des animaux invalidés pour *Car* n'est pas plus altérée bien qu'ils présentent également une altération de la stéroïdogénèse en réponse à l'AI.

2. L'inhibition de la signalisation CAR et l'invalidation du gène *Car* altèrent la physiologie testiculaire avec des intensités différentes.

Les résultats obtenus démontrent que l'inhibition néonatale de la signalisation CAR entraîne une hypofertilité à 8 mois chez la souris associée à des atteintes testiculaires. L'invalidation génique de *Car* a des impacts similaires sur la physiologie testiculaire, avec des intensités parfois différentes en fonction des paramètres étudiés, qui conduit *in fine* à une altération de la fertilité plus modérée comparé aux animaux traités avec l'AI. Ces données suggèrent que l'absence totale de la protéine CAR serait moins délétère au niveau testiculaire que l'inhibition de son activité. Il est intéressant de noter que l'invalidation génique du gène *Car* au niveau hépatique semble au contraire plus délétère que l'inhibition de la signalisation CAR (Lukowicz et al. 2019). Ces données soulignent les différences entre les impacts moléculaires causés par l'absence de la protéine CAR et entre les impacts moléculaires causés par l'inhibition de la signalisation CAR. Ce constat nous interroge donc sur la mécanistique de la protéine CAR dans les cellules germinales et plus précisément sur sa localisation subcellulaire, ses interactions avec ses co-facteurs et sur les modulations transcriptomiques associées, en condition basale et en réponse à l'AI.

Si la mécanistique de CAR en réponse aux agonistes est bien établie, cela n'est pas le cas dans le contexte d'un traitement par un AI. Une étude a démontré que le traitement à l'AI

de cellules rénales *in vitro* n'a pas d'impact sur la liaison à l'ADN de l'hétérodimère mCAR-RXR (Forman et al. 1998). Cependant, il faut noter que les lignées cellulaires immortalisées présentent de manière générale une fixation constitutive de la protéine CAR au niveau de la chromatine (comme décrit dans l'introduction page 45), expliquant pourquoi le traitement avec un AI n'affecterait pas la fixation de la protéine CAR à l'ADN, ni sa localisation subcellulaire *in vitro*. L'AI agirait en revanche dans ces lignées sur la régulation de l'expression des gènes cibles de CAR, notamment *via* le recrutement de corépresseurs. Toutefois, la localisation subcellulaire de CAR en réponse à l'AI reste peu documentée. Une étude a démontré que la protéine hCAR s'accumule dans le cytoplasme des hépatocytes murins après transfection et que le traitement avec un AI spécifique de hCAR entraîne à la fois la translocation nucléaire de la protéine ainsi que la réduction de l'activité transcriptionnelle du récepteur *via* le recrutement de corépresseurs (L. Li et al. 2008). Les résultats obtenus dans notre étude sur la lignée C18.4 exposée à l'AI démontrent une signalisation CAR rapide, notamment avec une modification du ratio H4ac/H4. Cela suggère qu'une partie des impacts médiés par l'AI impliquerait la modulation de voies de signalisations intracellulaires cytoplasmiques. Cette hypothèse est appuyée par les résultats d'une étude qui montre que la protéine mCAR est capable de se lier *in vivo* à la membrane plasmique cellulaire dans le foie, évoquant ainsi des modes d'actions cytoplasmiques de CAR (Koike, Moore, et Negishi 2005). Cela nous amène en ce sens à concevoir des expériences, notamment pour identifier la localisation subcellulaire de la protéine CAR de manière basale dans la lignée C18.4 mais également en réponse à l'AI par des méthodes de fractionnements cellulaires.

De plus, nos données suggèrent que l'inhibition de CAR par l'AI dans la lignée de spermatogonies indifférenciées C18.4 résulte en une signalisation complexe et inattendue. Dans les cellules HePG2 (lignée d'hépatocytes humains) ou même dans les cellules GC1-spg (lignée de spermatogonies différenciées murines) l'AI entraîne une diminution de l'accumulation des transcrits du gène *Cyp2b10*, ayant donc l'effet attendu d'une molécule exerçant une activité d'agoniste inverse (P. Honkakoski et al. 1998), (Martinot et al. 2017). De manière surprenante, nous avons observé une légère augmentation de l'accumulation des transcrits du gène *Cyp2b10* dans les C18.4 en réponse à l'AI. De plus, il est intéressant de noter que les analyses en qPCR réalisées sur les C18.4 invalidées pour le gène *Car* et traitées avec le véhicule révèlent également une augmentation de l'accumulation des transcrits du gène *Cyp2b10* par rapport aux cellules sauvages. Ces données suggèrent que la protéine CAR pourrait exercer une régulation basale négative au niveau du promoteur du gène *Cyp2b10* dans les C18.4, évoquant une

signalisation particulière de CAR dans la lignée germinale. Ces résultats valident toutefois que la signalisation CAR est active dans les C18.4 (bien qu'inattendue), mais soulèvent de nombreuses questions concernant l'activité de la protéine CAR au niveau de ses gènes cibles, et concernant l'impact de l'androstanoil sur l'activité transcriptionnelle du récepteur. Il serait intéressant d'utiliser le gène rapporteur luciférase sous le contrôle de promoteurs de plusieurs gènes cibles de CAR dans les C18.4, et de réaliser des expériences de gels retards et d'immunoprécipitations de la chromatine (ChIPs) pour étudier la localisation de CAR et ainsi mieux comprendre son activité basale et l'impact de l'androstanoil sur sa signalisation.

L'ensemble de ces données suggère une mécanistique complexe de CAR dépendante du ligand utilisé, de l'isoforme et du type cellulaire étudiés. Des expériences de transfection de CAR, de fractionnement cellulaire, et des analyses transcriptomiques dans la lignée C18.4 sont donc fondamentales pour étudier la signalisation CAR ainsi que l'impact de l'AI. Il sera également intéressant de comparer les résultats obtenus avec d'autres lignées cellulaires dans lesquelles l'expression de *Car* a été identifiée par notre équipe comme les GC1-spg (spermatogonies différenciées murines) et les TCAM2 (cellules tumorales de type séminome humain).

3. Quels sont les rôles de CAR dans l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées ?

Les résultats obtenus démontrent que l'inhibition de la signalisation CAR par l'utilisation de l'AI altère l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées. En effet, chez les souris en période néonatale, le traitement avec l'AI entraîne une diminution transitoire du nombre de cellules germinales indifférenciées, associée à une altération de leur localisation au sein des tubes séminifères. *In vitro*, nous avons démontré dans les C18.4 la diminution de l'expression du gène *Id4* (essentiel au maintien de l'état de pluripotence) en réponse à l'AI. Nos données montrent également *in vitro* et *in vivo* des modulations de la signalisation FOXO1. En effet, le traitement avec l'AI entraîne une diminution de l'expression du gène *Foxo1* ainsi que des changements de la localisation subcellulaire de la protéine FOXO1. De plus, nos données indiquent une diminution de l'expression de certains gènes cibles de FOXO1, suggérant une réduction de l'activité transcriptionnelle de la protéine FOXO1.

Ce lien entre l'inhibition de la signalisation CAR et FOXO1 est intéressant dans l'analyse des phénotypes observés car plusieurs études ont démontré que la protéine FOXO1 est impliquée dans la régulation de la différenciation des gonocytes en spermatogonies (Goertz

et al. 2011), (Pui et Saga 2017) et de manière générale dans le contrôle de multiples étapes de la spermatogenèse. En effet, à l'âge adulte, la plupart des tubes séminifères des souris invalidées pour le gène *Foxo1* présentent des cellules germinales à tous les stades de différenciation, mais en nombre réduit. Cependant, aucun spermatozoïde n'est retrouvé dans l'épididyme, malgré la présence de spermatides rondes et allongées (Goertz et al. 2011). Ainsi, nos travaux suggèrent que chez la souris, la modulation néonatale de la signalisation CAR pourrait impacter la transition des gonocytes en spermatogonies, expliquant notamment la présence ectopique de cellules germinales indifférenciées ID4+, PLZF+ ou FOXO1+ au centre des tubes séminifères.

De manière intéressante, de nombreuses relations ont été identifiées entre les protéines CAR et FOXO1, mettant en avant des interactions complexes entre leurs signalisations. En effet, il a été démontré dans les hépatocytes que la protéine mCAR peut se lier directement à la protéine FOXO1 murine (mFOXO1). Seule la forme active de mCAR permettrait cette interaction (Kodama et al. 2004). En effet d'autres études confirment que les protéines CAR et FOXO1 peuvent interagir entre elles uniquement lorsqu'elles se trouvent dans le noyau. Dans ce cas de figure, l'interaction de CAR avec FOXO1 peut notamment inhiber la fixation de FOXO1 au niveau des régions régulatrices de ses gènes cibles, inhibant son activité transcriptionnelle (Kodama et Negishi 2006), (Pustyl'nyak, Gulyaeva, et Pustyl'nyak 2020). De plus, une étude a montré que mCAR agirait également comme un corépresseur de mFOXO1, réduisant ainsi son activité transcriptionnelle. Dans cette étude, l'utilisation d'un agoniste inverse de mCAR n'affecte pas l'activité transcriptionnelle de mFOXO1, suggérant que le récepteur CAR doit se trouver sous forme active pour exercer son activité de corépresseur de FOXO1 (Kazantseva, Yarushkin, et Pustyl'nyak 2014). A l'inverse, mFOXO1 agirait comme un coactivateur de mCAR. L'exposition des cellules à un agoniste inverse de mCAR réprime cependant cette coactivation, suggérant que mFOXO1 peut exercer son activité de coactivateur uniquement quand mCAR est sous forme active.

L'ensemble de ces données évoque la possibilité que CAR pourrait altérer la localisation et l'activité de la protéine FOXO1 dans les cellules germinales indifférenciées, toutefois les mécanismes impliqués restent à identifier. Il est fondamental d'étudier, notamment au sein de la lignée germinale C18.4, l'impact de l'AI sur les localisations subcellulaires des protéines CAR et FOXO1 et sur leur potentielle interaction par des techniques transfections, de fractionnements cellulaires et de co-immunoprécipitations.

Les données générées *in vitro* dans la lignée germinale C18.4 indiquent une diminution de la signalisation FOXO1, associée à une augmentation de sa phosphorylation au niveau de la sérine 256. De manière intéressante, nous avons également identifié une augmentation de la phosphorylation de la kinase AKT dans les spermatogonies indifférenciées C18.4 à la suite du traitement AI. Or, il est connu que l'activité de la protéine FOXO1 est en partie régulée par la kinase AKT, qui permet sa phosphorylation et donc sa rétention cytoplasmique. De plus, des études ont montré que l'activation de la signalisation CAR conduit à l'activation de la signalisation AKT (Yarushkin et al. 2020) réduisant l'expression, la localisation nucléaire et l'activité transcriptionnelle de FOXO1 (Kazantseva, Yarushkin, et Pustylnyak 2014).

Pour expliquer l'impact de l'inhibition de la signalisation CAR par l'AI sur la localisation de la protéine FOXO1 dans les cellules germinales indifférenciées, nous avons formulé plusieurs hypothèses parfois en contradiction avec les données de la littérature générées à partir de lignées cellulaires différentes :

1. L'exposition à l'AI pourrait entraîner la translocation nucléaire de CAR. Cette translocation pourrait avoir plusieurs conséquences, notamment l'interaction dans le compartiment nucléaire de CAR avec FOXO1. Dans ce cas, l'activité transcriptionnelle de la protéine FOXO1 pourrait être réduite. Cependant, si l'AI entraîne la translocation nucléaire de CAR, cela n'entraîne pas nécessairement son interaction avec FOXO1. En effet, CAR pourrait tout aussi bien s'hétérodimériser avec RXR et entrer en compétition au niveau des éléments de réponse de FOXO1, ou encore interagir avec d'autres protéines (telles que CULLIN1 et PGC1 (*PPARG coactivator 1 alpha*)) formant ainsi un complexe nucléaire protéique, comme décrit dans la littérature (Kodama et al. 2004), (Pustylnyak, Gulyaeva, et Pustylnyak 2020). Cependant, cette hypothèse ne permettrait pas directement d'expliquer la diminution de la localisation nucléaire de la protéine FOXO1 à la suite du traitement AI. En effet, la littérature ne décrit pas le devenir du complexe protéique CAR-FOXO1 qui se serait formé dans le noyau. De plus, les résultats obtenus après la transfection dans la lignée C18.4 d'un plasmide codant une protéine FOXO1 non phosphorylable et constitutivement nucléaire (FOXO1 3A) montrent que les effets médiés par l'AI sont dépendants de la localisation cytoplasmique de la protéine FOXO1. Des expériences de cotransfections, de fractionnement cellulaire et de co-immunoprécipitations de CAR et FOXO1 dans les C18.4 permettraient d'approfondir cette hypothèse.

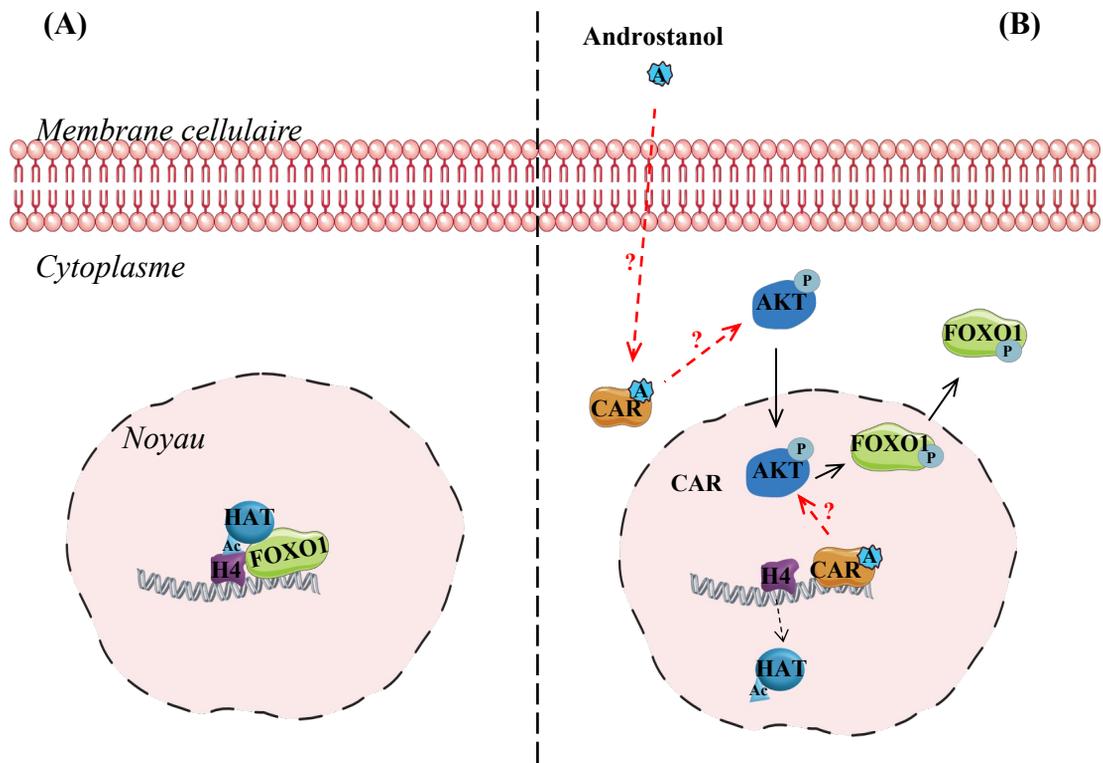


Figure 27 : Hypothèse 1 d'un lien entre CAR, FOXO1 et l'acétylation de l'histone H4.

(A) L'histone H4 se trouve dans le compartiment nucléaire et la protéine FOXO1 interagit avec elle dans le compartiment nucléaire pour permettre son acétylation via le recrutement de HATs. (B) L'exposition à l'androstanol permet à CAR d'activer la signalisation AKT et de phosphoryler FOXO1 entraînant son exclusion nucléaire. Les protéines HATs ne sont plus recrutées sur H4, inhibant ainsi son acétylation. Cependant, les conséquences de l'androstanol sur la localisation de CAR demeurent inconnues ainsi que son impact sur la signalisation AKT.

H4 : Histone H4 ; A : Androstanol ; HAT : Histone acétylase ; Ac : Acétylation ; P : Phosphorylation

2. L'exposition à l'AI activerait la signalisation AKT, ce qui pourrait réprimer la signalisation FOXO1 *via* sa phosphorylation. En effet, l'activation de la voie AKT conduit à la phosphorylation de la protéine FOXO1 et à son inactivation. Nos données appuient cette hypothèse puisque l'utilisation de l'AI entraîne dans la lignée C18.4 une augmentation de la phosphorylation de AKT et de celle de FOXO1. Cependant, il nous reste à confirmer que la phosphorylation de FOXO1 est spécifiquement dépendante de la phosphorylation de AKT. Plusieurs approches nous permettraient de répondre à cette question ; notamment l'utilisation dans la lignée C18.4 du LY294002, un inhibiteur synthétique de la protéine PI3K (*Phosphoinositide-3-Kinase*) (médiateur de la signalisation AKT) ou d'un mutant dominant négatif de AKT.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent également un impact rapide de l'exposition à l'AI sur l'acétylation de l'histone H4, certainement par la mobilisation de voies de signalisation intracellulaires cytoplasmiques. Les mécanismes par lesquels l'inhibition de la signalisation CAR régulerait l'acétylation de l'histone H4 demeurent à ce jour inconnus. Cependant, notre étude suggère que la diminution de l'acétylation de l'histone H4 à la suite de l'exposition à l'AI est dépendante de la signalisation FOXO1. En effet, la surexpression dans la lignée C18.4 du mutant FOXO1-3A nucléaire et non phosphorylable permet de contrecarrer les effets de l'AI sur l'acétylation de l'histone H4. Ces données suggèrent plusieurs mécanismes :

- Si l'histone H4 se trouve dans le compartiment nucléaire, il est possible que dans les conditions physiologiques basales dans les C18.4, la protéine FOXO1 se trouve majoritairement non phosphorylée dans le compartiment nucléaire. Elle interagirait alors avec la protéine H4, entraînant des modifications post-traductionnelles comme suggéré dans la littérature (Qiu et al. 2015), (Hatta et Cirillo 2007), (Arai, Kano, et Murata 2015), notamment via le recrutement d'histones acétylases (HATs) permettant l'acétylation de l'histone H4. Dans le cas d'une exposition des C18.4 à l'AI, la signalisation AKT serait alors mobilisée ce qui entrainerait la phosphorylation de la protéine FOXO1 et son exclusion nucléaire. La protéine FOXO1 phosphorylée présente alors dans le compartiment cytoplasmique serait alors incapable de recruter les HATs (*Histone acetyltransferases*) impliquées dans l'acétylation de l'histone H4 (**Figure 27**).

- Cependant, une étude suggère que l'acétylation de l'histone H4 est nécessaire pour sa translocation nucléaire (Ejlassi-Lassalette et al. 2011). Dans ce cas, si l'histone H4 se trouve initialement dans le compartiment cytoplasmique, l'exposition des C18.4 à l'AI mobiliserait la

signalisation AKT ce qui entrainerait la phosphorylation de la protéine FOXO1 et donc sa localisation cytoplasmique. Ceci pourrait permettre l'interaction de FOXO1 avec H4 dans le cytoplasme et le recrutement d'histones désacétylases (HDACs) inhibant ainsi l'acétylation de l'histone H4 (**Figure 28**).

Certaines données publiées dans la littérature nous ont permis de formuler ces hypothèses. En effet, une étude a démontré que la protéine FOXO1 peut se lier à la protéine H4, suggérant que cette interaction directe peut altérer les interactions H4-H4 et H4-ADN, ce qui conduirait à un état de compaction plus relâché de la chromatine. Cet état plus relâché de la chromatine pourrait faciliter le recrutement de protéines impliquées dans l'acétylation ou la désacétylation des histones (Hatta et Cirillo 2007). De plus, il a déjà été démontré que FOXO1, notamment *via* l'interaction avec des facteurs de transcription, peut recruter des HATs ou des HDACs au niveau de certains promoteurs de gènes, affectant ainsi leur transcription (van der Vos et Coffey 2008). Il a également été démontré que la surexpression de FOXO1 ou l'activation de la signalisation FOXO1 entraîne des modifications post-traductionnelles de l'histone H3 (Qiu et al. 2015), (Arai, Kano, et Murata 2015), ce qui suggère que FOXO1 pourrait bien être impliqué dans l'altération de l'acétylation de l'histone H4, phénotype observé *in vivo* et *in vitro*.

Il est également important de noter que 36 heures après la transfection de la forme constitutivement nucléaire de FOXO1 dans les C18.4, une réduction de l'acétylation de l'histone H4 est également observée, ce qui suggère que FOXO1 pourrait aussi réguler de manière transcriptionnelle l'acétylation de l'histone H4, potentiellement *via* la régulation de l'expression de HATs ou de HDACs. Une étude a notamment montré que FOXO1 régule l'expression de la désacétylase SIRT1 (*Sirtuine 1*), (S. Xiong et al. 2011).

L'identification des protéines impliquées dans l'acétylation de l'histone H4 ainsi que des expériences de cotransfections, de fractionnements cellulaires et de coimmunoprécipitations de FOXO1 et de H4 dans les C18.4 pourraient permettre de mieux comprendre l'impact de l'inhibition de la signalisation CAR sur l'acétylation de l'histone H4.

Les rôles de l'acétylation de l'histone H4 dans les spermatogonies indifférenciées sont aujourd'hui peu identifiés. Cependant, des données obtenues chez la souris montrent que les spermatogonies présentent une acétylation de l'histone H4 au niveau des lysines 5, 8 et 12 (Shirakata et al. 2014). De plus, une étude a montré que les hommes présentant une azoospermie ont un pourcentage réduit de l'hyperacétylation de l'histone H4 et de l'acétylation de la lysine

12 de l'histone H4 dans les spermatogonies (Kleiman et al. 2008). Ces données suggèrent que l'acétylation de l'histone H4 dans les spermatogonies est importante pour le déroulement normal de la spermatogenèse.

4. Comment la modulation néonatale et transitoire de la signalisation CAR peut-elle entraîner une infertilité à l'âge adulte ?

Nos données montrent que le traitement néonatal avec un agoniste inverse de CAR chez la souris entraîne à l'âge adulte une altération de la fertilité. La période de développement néonatale est considérée comme une fenêtre particulièrement sensible à l'exposition des xénobiotiques, en lien avec l'immaturation de l'organisme. Nos données suggèrent que l'inhibition de la signalisation CAR impacte initialement l'homéostasie des spermatogonies indifférenciées. Puis à l'âge adulte, les souris présentent une altération de la qualité spermatique suggérée par une hypofertilité indépendante d'un effet sur le nombre de spermatozoïdes épидидymaires. Cette hypothèse est confirmée par l'augmentation de la rétention de l'histone H3 dans les spermatozoïdes des souris exposées à l'AI, ce qui suggère des défauts de spermiogenèse. En effet, nos données préliminaires suggèrent une diminution générale de l'hyperacétylation de l'histone H4 au niveau testiculaire chez les souris de 8 mois (données non présentées), associée à l'augmentation du nombre de tubes présentant des spermatides rondes hyperacétylées et à la diminution du nombre de tubes présentant des spermatides allongées hyperacétylées. L'ensemble de ces données appuie l'hypothèse d'une altération de la spermatogenèse puisque l'acétylation de l'histone H4 est une étape clé du remplacement des histones par les protamines. Or, l'altération de la transition histone protamine est décrite pour être associée à l'hypofertilité (Oliva et Ballescà 2012), (Yuen et al. 2014).

Nos résultats montrent que les altérations de la signalisation FOXO1 observées dans le testicule néonatal à P10, à la suite de l'exposition à l'AI, sont conservées à l'âge adulte dans le testicule. De plus, la signalisation FOXO1 semble également altérée dans la lignée immortalisée de spermatogonies indifférenciées C18.4 après traitement avec l'AI, ce qui indique un impact direct de l'inhibition de la signalisation CAR sur les cellules germinales indifférenciées. En effet, les données obtenues *in vitro* suggèrent que l'inhibition de la signalisation CAR dérégule la signalisation FOXO1, ce qui pourrait altérer les niveaux d'acétylation de l'histone H4. Le traitement AI pourrait ainsi altérer de manière permanente l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées. Les impacts initiaux de l'inhibition de la signalisation CAR sur les spermatogonies indifférenciées seraient alors transmis à travers les différents stades de la

spermatogenèse et impacteraient *in fine* la qualité des spermatozoïdes. En effet, bien que Goertz et ses collaborateurs ont montré en 2011 que l'expression de *Foxo1* est restreinte aux spermatogonies indifférenciées, leur étude suggère qu'au-delà des rôles de FOXO1 dans l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées, la protéine serait également initiatrice d'une cascade d'évènements qui influence les étapes plus tardives de la spermatogenèse, notamment la spermiogenèse (Goertz et al. 2011). Une étude plus récente a cependant détecté la protéine FOXO1 par marquage immunohistochimique dans le cytoplasme des cellules germinales dans les phases tardives de la spermatogenèse (spermatocytes et spermatides) chez le rat (P. Huang et al. 2016), appuyant toutefois l'hypothèse précédente.

Cependant, il nous faut encore comprendre comment ces altérations peuvent être maintenues et transmises.

En 1993, une étude montre que l'exposition néonatale à des xénobiotiques entraîne chez le rat une altération à long terme des niveaux d'expressions de certains cytochromes (Zangar, Springer, et Buhler 1993). Nos résultats montrent que l'exposition à l'AI conduit à des modifications des marques histones au sein des spermatogonies *in vitro*, et au sein du testicule adulte *in vivo* après une exposition néonatale. Une altération de l'acétylation de l'histone H4 a notamment été observée, ce qui peut potentiellement impacter le transcriptome des cellules germinales et altérer ainsi leur qualité.

L'ensemble de ces données suggère que les modulations de la signalisation CAR peuvent impacter de manière permanente l'expression des gènes. Si les mécanismes impliqués restent à identifier, il est possible que cela implique la mise en place d'empruntes épigénétiques, telles que la méthylation d'ADN ou la méthylation des histones, notamment au niveau des régions régulatrices de l'expression des gènes, conduisant à une modulation permanente des niveaux d'ARNm, comme cela a été suggéré par de nombreuses études sur les impacts des expositions *in utero*/néonatales aux perturbateurs endocriniens (Predieri, Alves, et Iughetti 2022). En ce sens, nos données montrent que l'inhibition de la signalisation CAR est associée au sein du testicule mais aussi dans la lignée C18.4 à une modulation de l'expression d'acteurs clefs des processus épigénétiques tels que l'expression de certaines DNA méthyltransférases ou d'histones méthyltransférases.

Finalement, notre étude a montré que l'inhibition néonatale de la signalisation CAR chez la souris peut altérer la qualité des cellules germinales et conduire à l'infertilité à l'âge adulte. Ces résultats novateurs démontrent les rôles de CAR dans la physiologie et les

pathophysiologies testiculaires. D'autres questions persistent, il serait en effet intéressant de comparer les effets d'une exposition à l'AI au cours de différentes périodes (néonatale versus adulte) et/ou de différentes durées (aigue versus chronique) sur la fonction testiculaire et sur les paramètres dérégulés dans notre étude.

De nombreuses études ont déjà rapporté les effets délétères de l'exposition à des molécules chimiques sur la fertilité. Ces données sont donc pertinentes notamment dans un contexte d'expositions environnementales, puisqu'un grand nombre de xénobiotiques sont modulateurs de la signalisation CAR. Nos résultats doivent donc alerter les organismes décisionnaires tels que l'agence européenne des médicaments (EMA) ou l'alliance pour la santé et l'environnement (HEAL) qui contrôlent et autorisent la mise sur le marché de nouveaux xénobiotiques. En effet, si certaines classes de molécules chimiques telles que les perturbateurs endocriniens sont déjà surveillées, il est important de réaliser que de nombreuses voies de signalisation peuvent être impactées par les molécules chimiques environnementales, telle que la voie de signalisation CAR comme présenté dans notre étude, et que l'exposition à ces molécules peut avoir des impacts sur les organismes vivants et notamment altérer la fertilité.

Article 2

Neonatal co-exposure to Pregnane-X Receptor and Constitutive Androstane Receptor agonists synergistically impairs testicular functions and male fertility. En préparation.

Monrose Mélusine, Holota Hélène, Martinot Emmanuelle, Thirouard Laura, de Haze Angélique, Damon-Soubeyrand Christelle, Saru Jean-Paul, Caira Françoise, Lakhali Laila, Beaudoin Claude, Volle David H.

A. Introduction

Les troubles de la fertilité sont en augmentation constante depuis plusieurs décennies dans les régions du monde les plus développées, où il est notamment observé une diminution de la quantité et de la qualité spermatique (Rolland et al. 2013). De nombreuses études suggèrent aujourd'hui l'implication des polluants environnementaux, notamment des perturbateurs endocriniens (PEs), dans l'étiologie de l'infertilité. Les êtres vivants dont l'Homme sont tous concernés par l'exposition aux xénobiotiques, qui s'accumulent de plus en plus au sein de l'environnement et atteignent les écosystèmes. Il est établi que pendant la période périnatale, l'organisme est particulièrement sensible à l'exposition aux xénobiotiques qui peut entraîner des conséquences à long terme sur la santé, et notamment sur la fertilité à l'âge adulte. En effet, des études épidémiologiques ont démontré l'impact délétère de l'exposition aux molécules environnementales sur la fertilité (Russ Hauser et al. 2006), (Meeker et al. 2010); et d'autres utilisant des modèles animaux ont montré les conséquences irréversibles d'une exposition précoce et transitoire, notamment aux PEs, sur les capacités de reproduction (Ding et al. 2017), (Lessard et al. 2019). De plus, en raison de la diversité des molécules chimiques produites par l'Homme et relarguées dans l'environnement, il est essentiel de considérer les conséquences sur la santé d'une exposition combinée à plusieurs xénobiotiques, également appelée effet cocktail. En effet, les xénobiotiques qui pénètrent dans l'organisme peuvent moduler la signalisation d'un grand nombre de récepteurs et notamment celles des récepteurs CAR et PXR, tous deux exprimés dans le testicule au sein de types cellulaires différents (Martinot et al. 2017). La dérégulation d'une ou de plusieurs voies de signalisation testiculaire peut altérer la physiologie du testicule. Les fonctions testiculaires sont finement régulées grâce aux dialogues entre les différents types cellulaires du testicule qui permettent notamment la mise en place et le maintien des fonctions de reproduction.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse qu'une double activation néonatale des voies de signalisation CAR et PXR avec des molécules synthétiques qui exercent une activité agoniste, mimant les effets d'une modulation précoce par des xénobiotiques, pourrait impacter la physiologie testiculaire. Pour étudier cette hypothèse nous avons traité des souris sauvages ou invalidées pour le gène *Car*, chaque jour pendant les 10 premiers jours de leur vie, avec l'agoniste spécifique de CAR, le TCPOBOP (*1,4-Bis-[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene*), une molécule retrouvée dans la composition de certains pesticides (Tzameli et al. 2000) et/ou avec l'agoniste spécifique de PXR, le PCN (*Pregnenolone-16alpha-carbonitrile*), un stéroïde synthétique qui peut avoir une activité de PE (Kliwer et al. 1998). La fertilité des animaux a été analysée à 8 mois, et des paramètres physiologiques, histologiques et moléculaires ont été étudiés à 10 jours et à 8 mois pour comprendre l'impact des traitements sur la physiologie du testicule. Pour compléter ces données, des analyses *in vitro* ont également été réalisées sur une lignée murine de spermatogonies indifférenciées (C18.4) et sur une lignée murine de cellules de Leydig (MLTC1).

Nos résultats indiquent une interaction entre les voies de signalisation CAR et PXR, démontrée par les effets délétères et additifs sur la fertilité de la co-exposition avec le TCPOBOP et le PCN. En effet, si l'exposition unique au TCPOBOP ou au PCN n'altère pas les capacités de reproduction des souris, le groupe ayant reçu la double exposition (TCPOBOP et PCN) présente une augmentation du nombre de mâles stériles, une diminution du nombre de petits par portée chez les mâles toujours fertiles associée à une diminution du nombre de spermatozoïdes, ainsi qu'une augmentation de la mort *in utero*. Ces données suggèrent que l'activation combinée des voies de signalisation CAR et PXR entraîne des altérations quantitatives et qualitatives de la spermatogenèse, associées à une diminution de la synthèse de testostérone intra-testiculaire, permettant d'expliquer en partie l'impact additif des molécules sur la fertilité. De plus, les résultats obtenus montrent que le traitement néonatal avec le PCN seul entraîne également une altération de la synthèse de testostérone à l'âge adulte, qui ne semble toutefois pas suffisante pour altérer la fertilité des souris. Nos données ont également montré que l'ensemble des traitements entraînent initialement (10 jours postnataux) une diminution du nombre de spermatogonies associée à une augmentation de l'apoptose, suggérant une altération précoce du développement des cellules germinales indifférenciées. De manière surprenante, à 10 jours postnataux, les souris traitées avec le PCN mais pas celles doublement exposées au PCN et au TCPOBOP présentent initialement une tendance à l'augmentation des taux de testostérone.

Nous avons également étudié les conséquences des traitements *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires, exprimant le récepteur CAR (C18.4, MLTC1) ou le récepteur PXR (MLTC1) pour identifier les impacts directs des expositions et mieux comprendre leurs conséquences sur la physiologie testiculaire. Les résultats obtenus suggèrent que PXR serait impliqué dans la régulation de la synthèse de testostérone au sein des cellules de Leydig. Cependant, même s'il n'est pas exprimé dans les spermatogonies, la modulation de la signalisation PXR aboutie à l'altération de l'homéostasie des spermatogonies. La signalisation CAR quant à elle joue un rôle dans l'homéostasie des spermatogonies indifférenciées, potentiellement dans le contrôle de la mort cellulaire programmée.

Enfin, puisque les impacts des traitements reposent *in fine* sur des altérations de la lignée germinale pour induire les troubles de la fertilité, et que seul le gène *Car* semble exprimé dans les cellules germinales indifférenciées, nous nous sommes interrogés sur la possibilité que CAR puisse médier les impacts de la double exposition au TCPOBOP et au PCN. De manière intéressante, nos résultats montrent que l'inactivation totale du gène *Car* est suffisante pour contrecarrer les effets de la double exposition néonatale, sur le nombre de spermatozoïdes, sur le nombre de petits par portée et sur la mort *in utero*, sur le nombre de mâles stériles et *in fine* sur la fertilité. De plus, l'inactivation du gène *Car* permet également de contrer les impacts du traitement avec le TCPOBOP mais aussi ceux observés avec le PCN sur l'apoptose des cellules germinales à 10 jours. Nos données montrent également que les souris invalidées pour le gène *Car* et traitées en période néonatale avec le PCN ne présentent plus d'altérations des taux de testostérone intra-testiculaire. Ces données suggèrent que l'activation de la voie de signalisation PXR par le traitement PCN nécessite la signalisation CAR pour médier ces effets délétères sur les cellules germinales et la fonction de reproduction.

Neonatal co-exposure to Pregnane-X Receptor and Constitutive Androstane Receptor agonists synergistically impairs testicular functions and male fertility.

Monrose Mélusine^{1*}, Martinot Emmanuelle^{1*}, Holota Hélène¹, Thirouard Laura¹, de Haze Angélique¹, Damon-Soubeyrand Christelle¹, Saru Jean-Paul¹, Caira Françoise¹, Lakhal Laila², Beaudoin Claude^{1#} and Volle David H^{1#}.

¹ INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD Institute, Team-Volle, F-63001 Clermont–Ferrand, France.

² INRA UMR1331, ToxAlim, Université de Toulouse, Toulouse, France.

*: These authors contributed to this work.

#: Correspondence. C. Beaudoin, D.H. VOLLE. INSERM U1103, CNRS UMR-6293, UCA, GReD Institute, 28 place Henri Dunant, TSA 50400, 63037 Clermont-Ferrand, France. Email addresses: claude.beaudoin@uca.fr, david.volle@inserm.fr or david.volle@uca.fr

Running title: CAR and PXR mediates repro-toxicities of xenobiotics.

Key words: xenobiotic, CAR, PXR, repro-toxicity, spermatogonia, endocrinology.

Disclosure. The authors declare to have no conflict of interests.

Grant supports. The study was funded by Inserm; CNRS; Université Clermont Auvergne. Team Volle also received supports from *Ligue contre le cancer* (Comité Puy de Dôme); Mélusine Monrose received support from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (ARCDOC42021020003357); Laura Thirouard and Manon Garcia received support from the *Fondation Recherche Médicale* (FDT202001010780 and R17089CC). Volle's team received support by the Cancer-Inserm (C20010CS) and by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

Abstract

PXR (Pregnane-X-Receptor) and CAR (Constitutive Androstane Receptor) are described as xenobiotic nuclear receptors. They have been identified as being involved in environmentally induced pathologies such as diabetes or non-alcoholic fatty liver disease. Over the last decades, many studies have reported the impacts of environmental molecules (EM) on male fertility. However, the roles of PXR and CAR in environmentally induced fertility disorders have not been described so far. Here, using rodent experimental models of exposure, we define the mechanisms involved explaining how neonatal exposure to EM impairs male sexual function through PXR and CAR. Neonatal co-exposure to agonists of these two nuclear receptors synergistically impairs fertility in wild-type adult males, which is associated with a lower sperm production. Furthermore, the interaction between PXR and CAR is confirmed by the lower impact of PXR agonist in mice genetically deficient for *Car* gene.

This work makes an important contribution to the literature as it demonstrates that PXR and CAR play critical synergistic roles in xenobiotic-induced pathophysiological changes in the mouse testis. This highlights that these signaling pathways may now need to be studied to better identify the adverse impacts of environmental molecules on male fertility.

Introduction

The incidence of reproductive disorders is steadily increasing and affects 15% of couples¹. Male abnormalities are diagnosed in half of all cases¹. In the same line of evidence, the incidence of various male reproductive disorders such as cryptorchidism, testicular cancer, and low sperm count has been progressively increasing in some regions of the world^{2,3}. This suggests that exposures to environmental molecules (EM) might be in part responsible of these increases.

The concept of developmental origins of health and disease (DoHaD) suggests that chronic diseases at adulthood have, at least in part, an early developmental origin^{4,5}. There is now considerable scientific evidence to suggest that certain environmental exposures and lifestyle behaviors during the perinatal period contribute to the spread of certain chronic diseases from generation to generation. Among the environmental molecules, endocrine disruptors (EDs) have been demonstrated to have major impacts on health and particularly on reproductive capacities. At the molecular level, the mechanisms of action of these molecules have been mainly studied through their potential interactions with several members of the nuclear receptor superfamily such as ER (estrogen receptors), AR (androgen receptors), TR (thyroid receptors) and PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors)⁶⁻¹⁰. However, the number of EM is still growing, and these molecules are rarely pure agonists or antagonists and can induce multiple signaling pathways. This suggest that other mediators must be involved. In that line, in the last decades, other members of the nuclear receptor superfamily have been described as key mediators of xenobiotics, namely PXR (Pregnane-X-Receptor, NR1I2) and CAR (Constitutive Androstane Receptor, NR1I3)¹¹. However, even if both receptors are expressed within testis¹², their respective roles in the impacts of environmental molecules on testicular physiology and male fertility disorders have not been fully studied and established so far.

We therefore hypothesized that interactions might exist between PXR and CAR signaling pathways in the context of exposures to environmental molecules. This study aimed to decipher the role of CAR and PXR on the germ cell response to EM and subsequent impacts on fertility. A combination of *in vivo*, *in vitro*, and pharmacological approaches was used an to decipher the interactions within the testis between the CAR and PXR signaling pathways and their potential additive effects on testicular pathophysiology and on male fertility.

Results

Neonatal co-exposure to PXR and CAR agonists leads to male infertility.

To analyze the potential interactions of xenobiotic signaling pathways through PXR and CAR during neonatal exposures on adult male fertility, wild-type (*WT*) and *Car*-deficient (*Car*^{-/-}) mice were exposed from post-partum day 1 (dpp1) and until post-partum day 10 (dpp10). To target CAR and PXR pathways; TCPOBOP 1,4-bis-[2-(3,5,-dichloropyridyloxy)] benzene as a mouse

CAR selective agonist, which was initially isolated as a pesticide contaminant^{13,14}; and 5-Pregnen-3 β -ol-20-one-16 α -carbonitrile (PCN), as a PXR agonist^{15,16}, which is a synthetic steroid that could act as an endocrine disruptor, were used.

To analyze the impact of neonatal exposures to TCPOBOP and PCN (T-P) on male fertility, reproductive tests were performed at 8 months of age (**Figure 1**). The data showed that single exposures had no significant impact on the number of vaginal plugs (data not shown). In addition, there was no negative effect of the single exposures on the delay to obtain plugs or in the efficiency of the plugs demonstrating that all males were capable of mating (**Figure 1A**). However, a higher percentage of T-P-exposed males were sterile compared with vehicle-treated males, as revealed by the absence of pregnancy, whereas no effect was observed for single-molecule exposures (**Figure 1B**).

Interestingly, in T-P exposed males that remained fertile, there was a tendency for lower number of pups per litter revealed by number of fecundations per litter (**Figure 1C**). In addition, litters obtained from T-P-exposed males also had fewer alive pups than the other groups, which was associated with an increased rate of *in utero* death in litters from T-P-exposed males (**Figure 1C**).

Analyses performed did not showed major impact of neonatal exposure on adult body weight, neither on liver, testis, epididymis (**Supplemental Figure S1**). However, results showed a more significant effects of the PCN in *Car*^{-/-} males as highlighted by a higher liver weight and a lower testicular weight compared to *Car*^{-/-} males treated with vehicle (**Supplemental Figure S1**). Combined, these data suggested that co-exposure to T-P affects fertility at multiple levels. First, on the achievement of gestation after mating; but also, on the survival of the pups. These data suggested that the observed defects may be due to major gamete defects reflected by alterations in sperm production potentially at quantitative and qualitative levels. In that line, a lower sperm cell count was obtained in exposed males even though no additive effect were observed between molecules (**Figure 1D**). These lacks additive impacts suggested that both CAR and PXR pathway could act in a common mechanism to alter germ cell production, whereas they might also act in an additive manner in other parameters, such as sperm quality, leading to synergistic impact on male fertility.

The use of *Car*^{-/-} mice revealed that the lack of CAR was sufficient to counteract the impact of co-exposure on male fertility parameters analyzed. Indeed, the present data showed that in *Car*^{-/-} males no effect of the treatments were observed on the number of vaginal plugs, on the percentage of fertile males, on the number of live or dead pups compared to the other groups (**Figures 1A to 1C**). Moreover, the exposure to molecules had no impact on the number of spermatozoa in the epididymis tail in *Car*^{-/-} male mice (**Figure 1D**).

Results showed that the effect on pup's viability might be related to the effect of PCN (**Figure 1C**), whereas the impact on the number of sperm cells seemed to be more related to the TCOPBOP (Figure 1D).

CAR et PXR differentially affect adult testicular histology.

We decided to analyze the testicular histology to decipher whether reproductive alterations could be due to abnormal gonads. No major alteration was observed on global testicular histology has observed by H&E staining (**Figure 2A**). Interestingly, the present data demonstrate that spermatogenesis was affected by exposures. Indeed, the number of spermatogonia, identified as PLZF-positive cells, was lower in mice treated with the CAR agonist and in mice co-exposed to T-P (**Figure 2B**). Similar patterns with lower cell numbers in T and T-P groups were observed for spermatocytes (SYCP3 staining) (**Figure 2C**) and for spermatids revealed by staining with acetylated-histone H4 (**Figure 2D**). There is still a need to validate these data on either *Car* or *Pxr* knock-out mice.

In addition, these lower numbers of germ cells could be associated with an increase in apoptosis as a higher rate of TUNEL positive cells were noticed in T-P groups compared to controls (**Figure 2E**). This effect corresponded to the impact of PCN on germ cell survival as sustained by data obtained with PCN alone (**Figure 2E**). However, the decrease of germ cell number in TCPOBOP exposure was not related to germ cell apoptosis (**Figure 2E**). This suggested that CAR signaling might alter germ cell differentiation and/or proliferation while PXR controls germ cell survival. The present data show that the absence of *Car* counteracts the impact of neonatal exposure to TCPOBOP but also to PCN with respect to impact on germ cell survival (**Figure 2**). These data suggest that the impact of the PCN-activated PXR pathway act on germ cells in a CAR-dependent manner.

Co-exposures to PXR and CAR agonists alters neonatal testicular histology.

The above data highlight the impact of co-exposure on germ cells. We thus decided to decipher the initial impacts of the molecules at the end of the treatments at 10 days postnatal.

Immuno-histological analyses showed an impact of molecules on the number of ID4+ and PLZF+ spermatogonia with any additive or synergic impacts of double exposure (**Figures 3A & 3B**). This clearly shows that during the early stages of exposure, the two signaling pathways interact to alter early germ cell development. There is still a need to validate these data on either *Car* or *Pxr* knock-out mice.

Data showed that exposure to single molecules led to the increase of the rate of apoptotic germ cells as revealed using TUNEL immunostaining. However, there was no additive effect in the mice co-exposed with both molecules (**Figures 3C**).

CAR acts of germ cells.

We have previously demonstrated that CAR is mainly expressed in spermatogonia and in Leydig cells (1st paper of this thesis manuscript). To define the roles of CAR on germ cells, we decided to use the immortalized cell line C18 either Wt or deficient for *Car* gene. After 24hours, treatment with the CAR agonist led to a lower number of cells compared to vehicle treated group specifically in Wt cells (**Figure 4A**). This did not seem to be correlated with impact on proliferation or on apoptotic rates (**Figure 4B & 4C**). These results suggested that CAR could lead to lower number of cells through the modulation of other processes such as autophagy, necrosis for examples.

PXR regulates testosterone synthesis.

To better decipher the combined impact of CAR and PXR pathways, we next analyzed PXR as it has also been demonstrated to be expressed in the testis¹². The present data show that PXR is expressed in neonatal and adult mouse testis (**Figure 5A**). In neonatal mice, PXR mRNA was mainly detected CD9- cell sorted cells analysis compared to eluate parts (**Figure 5B**). Consistently, data show that in adult mice PXR mRNA is detected in both tubular and interstitial compartments of the testis (**Figure 5C**); but PXR mRNA was enriched in CD9- cells (**Figure 5C**). These data suggested that PXR is expressed in interstitial cells and in somatic tubular cells (**Figure 5D**). The expression of PXR in many cell types of the testis was confirmed using immortalized cell line showing PXR mRNA in Leydig MLTC1 cell (Cycle of quantification Cq=25) but not in germ cells (C18 and GC1spg).

Consistently with this expression pattern of PXR within the testis, our data showed that neonatal exposure using PCN led to an alteration of the testosterone levels at adulthood (**Figure 5E**). In contrast almost no effect was observed with the exposure to the CAR agonist (**Figure 5E**), highlighting the main impact of PXR pathways on androgen homeostasis within the testis. Consistently, in adult, similar impact that the one observed with PCN was identified in the T-P exposed mice (**Figure 5E**).

These data suggest that part of the effect of PXR activation using PCN on germ cell lineage must be through the modulation of testosterone, which is required for processes that are critical for spermatogenesis including maintenance of the BTB, support of the completion of meiosis, adhesion of elongated spermatids to Sertoli cells and the release of sperm.

To better decipher the role of PXR on steroidogenesis, we analyzed the impact of PCN in 10 days old mice at the end of the treatment. Data showed that exposure to PCN alone leads to an increase of testosterone levels (**Figure 5F**). Consistently, the exposure of mouse Leydig cell line (MLTC1) to PCN led to an increase of testosterone production (**Supplemental Figure S2A**). The effect was very rapid for 2 hours after treatment and sustained over time up to 24 hours. Analysis showed that PCN has initially no impact on the expression of steroidogenic

genes as illustrated with *Star* mRNA accumulation (**Supplemental Figure 2B**), this suggested that the effect of PCN might rely on the mobilization of cholesterol substrate for steroid synthesis.

Interestingly, in long term *in vitro* experiments, it appears that the expression of some steroidogenic genes was decreased in PCN treated cells; what might suggest classical feedback on the expression of *steroidogenic genes*, as illustrated with *Star* mRNA accumulation (**Supplemental Figure 2B**), in response to elevated testosterone levels. Combined these data suggest that *in vivo* the long-term impact of PCN on testicular steroidogenesis might be through other processes than those observed *in vitro*. It could be hypothesized that in long-term timing as done *in vivo* (several months), a permanent inhibition of the expression of steroidogenic genes could lead to lower testosterone production. Such observation have been made in many context of *in utero*/neonatal exposure to endocrine disrupters that lead to adulthood at decrease steroidogenic pathways and lower hormones levels⁶.

Lower testosterone levels were observed in 10-dpn old and adult co-exposed mice. These data clearly suggest that from neonatal exposure to adulthood, co-exposure to CAR and PXR agonists led to a decrease of testosterone concentrations. The mechanisms of the interaction between these two pathways to regulate the testicular endocrine function needs to be further studies.

Discussion

Using *in vivo* and pharmacological approaches, the present study demonstrates the involvement of CAR and PXR in the deleterious impact of xenobiotics on testicular physiology and in turn on male fertility. Furthermore, this work clearly demonstrates for the first time that the signaling pathways of these two nuclear receptors act in concert to mediate the deleterious effects of xenobiotics on fertility.

We demonstrate here that, in mice, neonatal co-exposures to TCPOBOP and PCN, respective agonists of CAR and PXR, induced enhanced abnormalities in male reproductive function compared with the single administration of either TCPOBOP or PCN. This co-exposure led to a decreased fertility in adult male mice. This might be the results of altered spermatogenesis and lower sperm production compared with controls. Most interestingly, these indicators were almost unaffected in male mice deficient for the *Car* gene. This suggests that CAR plays an important role in testicular pathophysiology induced by co-exposure to TCPOBOP and PCN. Moreover, it is important to note that both receptors are not expressed in the same cell types within the testis. This highlights the major role of cell-cell interactions and dialog in the response to xenobiotic exposures leading to abnormal testicular physiology.

The present data show that CAR signaling pathways must be efficient in germ cells, where it controls the neonatal physiology of undifferentiated germ cells sustained by lower number of spermatogonia (PLZF+ cells). This initial alteration was propagated at adulthood as revealed by lower number of spermatogonia, spermatocytes and spermatids in TCPOBOP and T-P treated mice.

Interestingly, PCN had effect on germ cells (fertility and TUNEL), they were counteracted by the lack of CAR. As PXR is not expressed in germ cells, this clearly highlight the importance of communications between cell types, which is thus essential for establishing and maintaining testicular structure and functions¹⁷. It is now well established that many local intra-testicular factors are essential to ensure establishment and maintenance of germ cell lineage.

As far as PXR is concerned, PXR-induced signaling impacts the endocrine testicular function leading to lower testosterone levels at adulthood. This suggest that the impacts of PXR activation on germ cell homeostasis must be driven by its long-term effects on testosterone levels. This highlights the critical need to work with integrative approaches to define the adverse effects of substances. It is interesting to note that some effects of PXR on Leydig steroidogenesis can be reproduced in culture cell experiments. Moreover, even if PCN increases testosterone in neonatal mouse testis, it was surprising that co-exposure led to a completely different phenotype with a decrease of testosterone levels. These data highlight that prediction of the effect of environmental molecules cannot be extrapolated for alternative experimental procedure and that *in vivo* experimental models are still needed to consider the temporal and spatial impacts of EM. This conclusion is even more valuable for the endpoint impact of EM that is fertility, which relies on the multi-cellular or multiorgan interactions. Indeed, it appears that the alteration of Leydig cells concomitantly to alteration of germ cells are mandatorious to lead to deleterious impacts at adulthood.

Considering the problem of time scale for the development of the disease following EM exposures, it is now well established that different life stages are associated with different sensitivity to environmental exposures. Thus, the embryonic and neonatal life periods are the most sensitive to external stresses. In this line, our work demonstrates that nuclear receptors CAR and PXR are novel mediators of these precocious effects of EM and result in a long-term effect on fertility.

The present data open clear perspectives on the studies of repro-toxic environmental exposures as we defined new mediators that can be associated with the effects of endocrine disruptors. This clearly suggests that next to classical pathways (ER, AR, TR, PPAR), the authorities will have now to consider PXR and CAR for regular testing of molecules to define whether these molecules must be considered as ED.

This work provides proof of concept that these two nuclear receptors act synergistically to influence male fertility by targeting different mechanisms and testicular functions. The issue of

multiple exposure is a critical point in deciphering the health impacts of EM. Indeed, although the impacts of exposure to a single EM have been extensively studied, the consequences of simultaneous uncontrolled exposure to multiple EMs still require further investigation. This is especially true since, as this study suggests, we do not yet know all the mediators of the deleterious effects of EMs.

In conclusion, this work gives original and innovative results regarding the public health issue of pathologies induced by exposure to environmental pollutants. The present research has scientific impact by providing an integrated understanding of the contribution of the nuclear receptors CAR and PXR to fundamental biological processes involved in male reproduction. Our research should have direct impacts on public health and on the field of toxicology for the definition of toxicological reference values by risk assessment agencies on compounds that are currently the subject of great debate.

Materials and Methods

Experimental procedures

Animals

C57Bl/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) mice were acclimated at least 2 weeks before experiments. The *Car*^{-/-} mice used have been previously described¹⁸. The mice used in this study were maintained in a C57BL/6J background.

Mice were housed in temperature-controlled rooms with 12 hours light/dark cycles. Mice had *ad libitum* access to food and water. The refinement is based on the housing and monitoring of the animals as well as the development of protocols that consider the animal welfare. This has been achieved by enriching the cages (cardboard tunnel and mouse houses). The mice were housed in social groups with cage sizes that complied with the legislation according to the number of mice. Mice were exposed from 1 day-old to 10 days old to TCPOBOP (5mg/kg), PCN (5mg/kg) or both molecules (total of 5mg/kg). Organs were harvested at several time points after from 1 day up to 20 weeks after busulfan exposure. The number of animals per group was defined on independent experiments to validate the reproducibility of results.

To minimize the confounders, several independent experiments were done, and groups of animals were not sacrifice in the same order from one experiment to another. These protocols have already been performed in adult mice where no suffering was reported in the time frame of our experiment. However, we have performed daily monitoring of the animals in the first few days following the injections. We have checked for signs of suffering activity disorders or physiological changes such as altered feces, increased weight loss in response to bile acids.

The signs observed will be abnormal weight loss or activity disorders (hypoactivity), hunched back, sunken eyes. No case suffering signs were reported.

This study was conducted in accordance with current regulations and standards approved by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Animal Care Committee and by the animal care committee (APAFIS#16680-2020072216408245 v1).

Fertility Test

Each male was mated at night with a female C57Bl6J (Charles River) for 10 days. Mating was monitored daily for vaginal plugging to determine if mating had occurred. After 17 days, the mating efficiency was inspected and the number of pups per litter was counted.

Histology

The testes were collected, fixed in 4% PFA and embedded in paraffin, and 5µm-thick sections were prepared and stained with H&E.

In vivo TUNEL Analysis.

TUNEL experiments were performed, as previously described¹⁹ on 5µm of testis fixed in paraformaldehyde 4%. The results are expressed as the relative number of TUNEL positive cells per seminiferous tubules. Vehicle groups of each genotype have been arbitrarily set at 100.

Immunohistochemistry

5µm sections were mounted on positively charged glass slides (Superfrost plus), deparaffinized, rehydrated, treated for 20 min at 93°–98°C in 0.01 M citric buffer-tween 0.1% (pH 6), rinsed in osmosed water (2 × 5 min), and washed (2 × 5 min) in Phosphate-buffered saline (PBS). Immunohistochemical studies were conducted according to the manufacturer's recommendations. Slides were then counterstained with Hoechst medium (1 mg/mL) and then mounted on PBS/glycerol (50/50). Antibodies used for Ac-H4, PLZF were previously described²⁰ and ID4 (Santa Cruz, Sc-491).

The vehicle groups of each genotypes have been arbitrarily set at 100.

Cell line approaches.

Spermatogonial cell line C18 as used as previously described¹⁹. Cells, cells were plated in 6 well plates. 24 hours after plating, cells were treated for with vehicle (DMSO, 1/1,000), TCPOBOP (1 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Then, cells were harvested at different time points later, and messenger RNA (mRNA) or protein extractions were performed.

*** BrdU incorporation.** To define proliferation rate, cells were treated with TCPOBOP

or DMSO for 24 hours. Cells were then incubated with BrdU (10 μ M) for the one last hour. Then cells were washed with PBS1X and then fixed with methanol. The detection of BrdU was performed using primary antibody anti-Bromodeoxyuridine (11170376001, Merck) revealed with specific Alexa488-coupled secondary antibody.

* **TUNEL.** For TUNEL experiments, cells were fixed with PFA 1% on 6 well plates and then the experiments were performed as described above in the immunohistochemistry section. The revelation of the staining was visualized by immunofluorescence.

Real-time RT-PCR

RNA from MITC1 samples was isolated using RNAzol. cDNA was synthesized from total RNA with the MMLV and random hexamer primers (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The real-time PCR measurement of individual cDNA was performed using SYBR green dye (Master mix Plus for SYBR Assay, *Takara Bio*) to measure duplex DNA formation with the Eppendorf-Realplex system. For each experiment, standard curves were generated with pools of cDNA from cells with different genotypes and/or treatments. The results were analyzed using the $\Delta\Delta$ ct method. Primers sequences for *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Cyp17a1* were used previously^{6,21,22}

Statistical Analyses

All numerical data are represented as mean \pm SEM. Differences between groups were determined by ANOVA or two-way ANOVA. Multiple comparisons were made with by Dunnett or Holm-Sidak's test respectively for ANOVA1 and ANOVA2. Spearman correlation test was used for analysis.

References

1. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A. & Chyatte, M. R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* **13**, (2015).
2. Serrano, T., Chevrier, C., Multigner, L., Cordier, S. & Jégou, B. International geographic correlation study of the prevalence of disorders of male reproductive health. *Hum. Reprod.* **28**, 1974–1986 (2013).
3. Skakkebaek, N. E. A Brief Review of the Link between Environment and Male Reproductive Health: Lessons from Studies of Testicular Germ Cell Cancer. *Horm Res Paediatr* **86**, 240–246 (2016).
4. Ho, S.-M. *et al.* Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reprod. Toxicol.* **68**, 85–104 (2017).
5. Treviño, L. S. & Katz, T. A. Endocrine Disruptors and Developmental Origins of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocrinology* **159**, 20–31 (2018).
6. Volle, D. H. *et al.* The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3752–3764 (2009).
7. Amir, S. *et al.* Endocrine Disruptors Acting on Estrogen and Androgen Pathways Cause Reproductive Disorders through Multiple Mechanisms: A Review. *Int J Environ Res*

Public Health **18**, 1464 (2021).

8. Omezzine, A. *et al.* Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. *Endocrinology* **144**, 648–661 (2003).
9. Diamanti-Kandarakis, E. *et al.* Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* **30**, 293–342 (2009).
10. Begum, T. F. & Carpenter, D. Health effects associated with phthalate activity on nuclear receptors. *Rev Environ Health* (2021) doi:10.1515/reveh-2020-0162.
11. Du, Z.-H. *et al.* A novel nuclear xenobiotic receptors (AhR/PXR/CAR)-mediated mechanism of DEHP-induced cerebellar toxicity in quails (*Coturnix japonica*) via disrupting CYP enzyme system homeostasis. *Environ. Pollut.* **226**, 435–443 (2017).
12. Martinot, E. *et al.* Bile acid homeostasis controls CAR signaling pathways in mouse testis through FXRalpha. *Sci Rep* **7**, 42182 (2017).
13. Smith, G. *et al.* 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, an extremely potent modulator of mouse hepatic cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J* **289 (Pt 3)**, 807–813 (1993).
14. Poland, A. *et al.* 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity. *Mol Pharmacol* **18**, 571–580 (1980).
15. Chen, C., Staudinger, J. L. & Klaassen, C. D. Nuclear receptor, pregnane X receptor, is required for induction of UDP-glucuronosyltransferases in mouse liver by pregnenolone-16 alpha-carbonitrile. *Drug Metab Dispos* **31**, 908–915 (2003).
16. Guo, G. L., Johnson, D. R. & Klaassen, C. D. Postnatal expression and induction by pregnenolone-16alpha-carbonitrile of the organic anion-transporting polypeptide 2 in rat liver. *Drug Metab Dispos* **30**, 283–288 (2002).
17. Smith, L. B., O'Shaughnessy, P. J. & Rebourcet, D. Cell-specific ablation in the testis: what have we learned? *Andrology* **3**, 1035–1049 (2015).
18. Lukowicz, C. *et al.* Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environ. Health Perspect.* **126**, 067007 (2018).
19. Baptissart, M. *et al.* Bile acids alter male fertility through TGR5 signaling pathways. *Hepatology* (2014) doi:10.1002/hep.27204.
20. Thirouard, L. *et al.* Identification of a Crosstalk among TGR5, GLIS2, and TP53 Signaling Pathways in the Control of Undifferentiated Germ Cell Homeostasis and Chemoresistance. *Adv Sci (Weinh)* e2200626 (2022) doi:10.1002/adv.202200626.
21. Holota, H. *et al.* Fxralpha gene is a target gene of hCG signaling pathway and represses hCG induced steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **194**, 105460 (2019).
22. Vega, A. *et al.* Identification of the link between the hypothalamo-pituitary axis and the testicular orphan nuclear receptor NROB2 in adult male mice. *Endocrinology* en20141418 (2014) doi:10.1210/en.2014-1418.

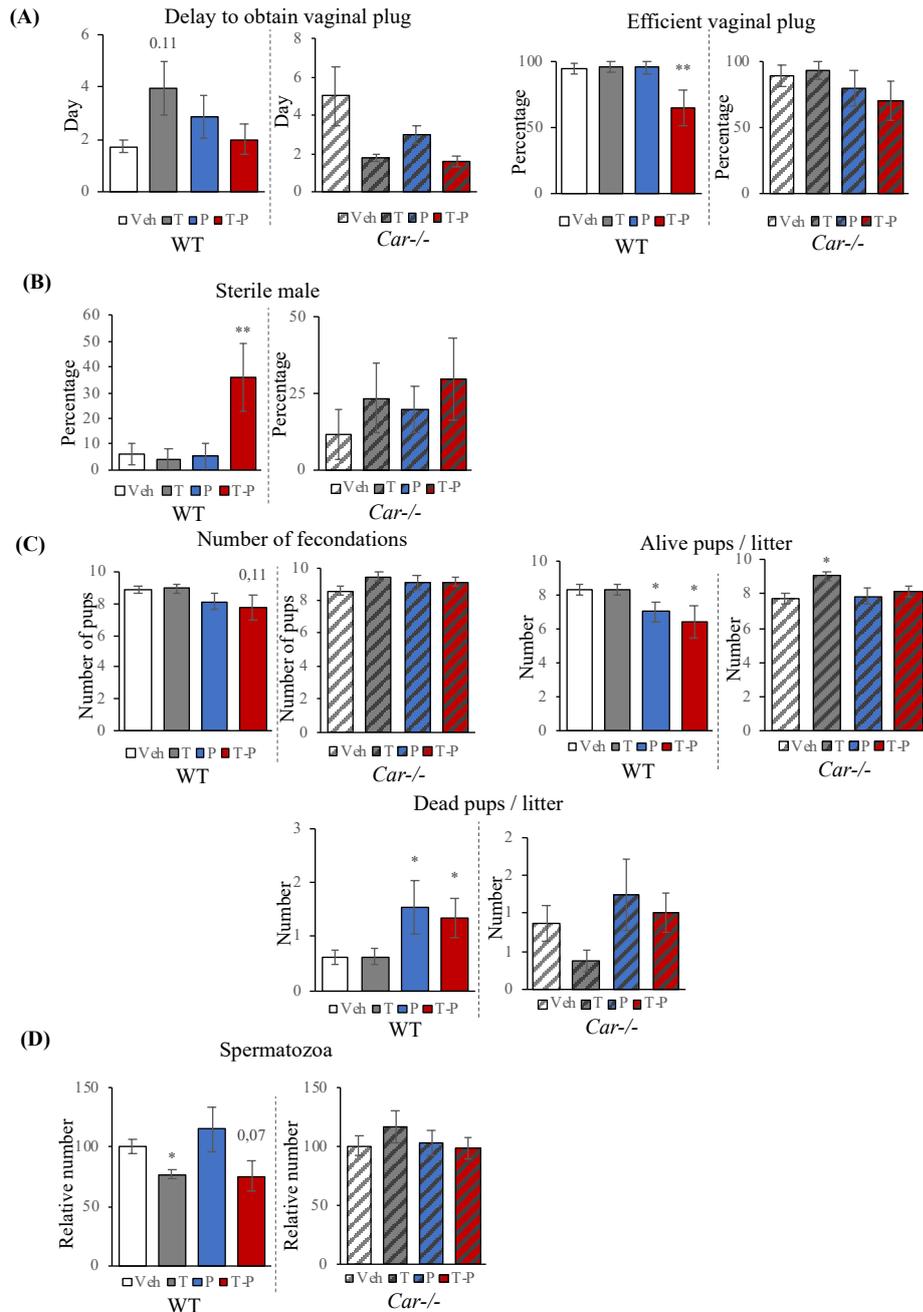


Figure-1. Neonatal CAR and PXR activations synergistically impacts male fertility.

(A) Delay to obtain vaginal plugs and percentage of efficient vaginal plugs in *WT* or *Car*^{-/-} males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age bred with C57Bl6J females.

(B) Percentage of sterile *WT* or *Car*^{-/-} males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

(C) Number of fecundations, as well as the number of alive and dead pups per litter obtained from fertile *WT* or *Car*^{-/-} males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

(D) Number of sperm count in the epididymis head of *WT* or *Car*^{-/-} males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

In all panels, n=10 to 34 from 3 to 5 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis:*, p<0.05; **, p<0.01

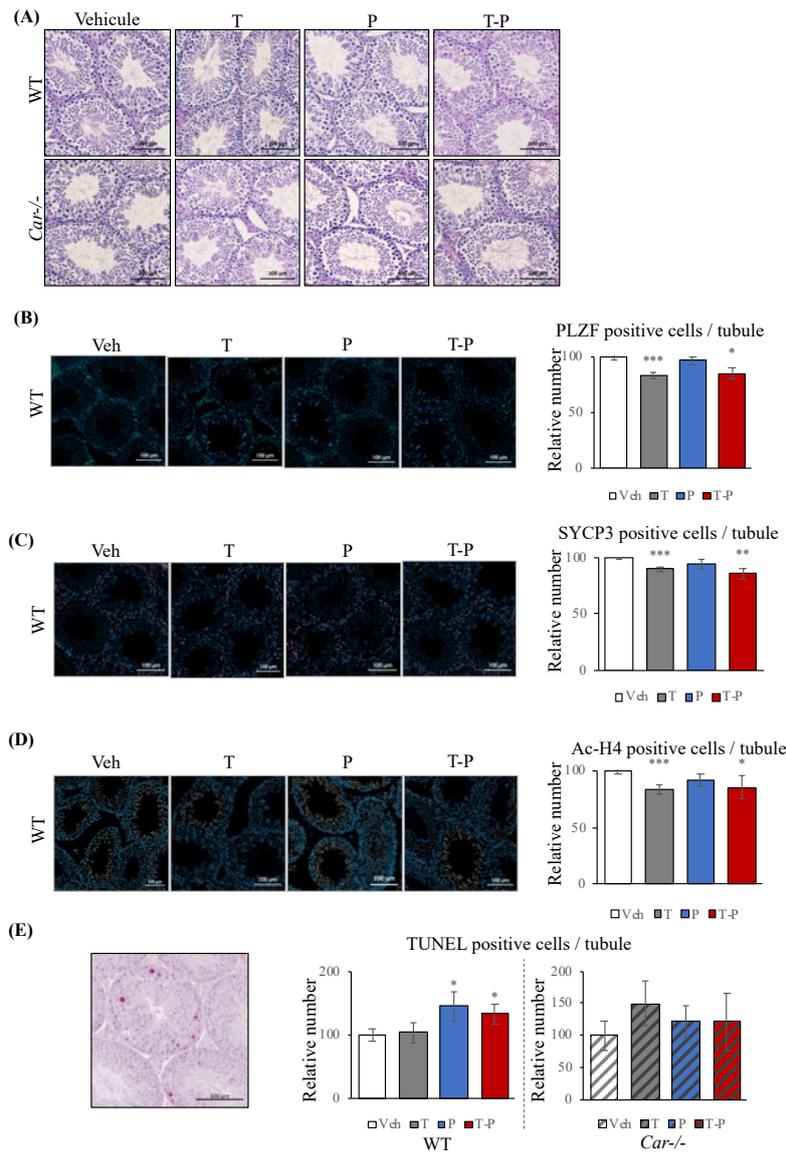


Figure-2. Neonatal CAR and PXR activations alter adult testicular histology.

(A) Representative micrographs of hematoxylin/eosin-stained testes of *WT* or *Car^{-/-}* males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

(B) (Left) Representative micrographs of testis stained for PLZF. (Right) Quantification of the number of PLZF positive cells per seminiferous tubules in testis of *WT* males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

(C) (Left) Representative micrographs of testis stained for SYCP3. (Right) Quantification of the number of SYCP3 positive seminiferous tubules in testis *WT* males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

(D) (Left) Representative micrographs of testis stained for acetylated histone H4 (ac-H4). (Right) Quantification of the number of ac-H4 positive seminiferous tubules in testis *WT* males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

(E) (Left) Representative micrographs of testis stained for TUNEL; (Right) Quantification of the relative number of TUNEL positive cells for 100 seminiferous tubules of *WT* or *Car^{-/-}* males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

In all panels, n=6. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01, ***, p<0.001.

Figure-3

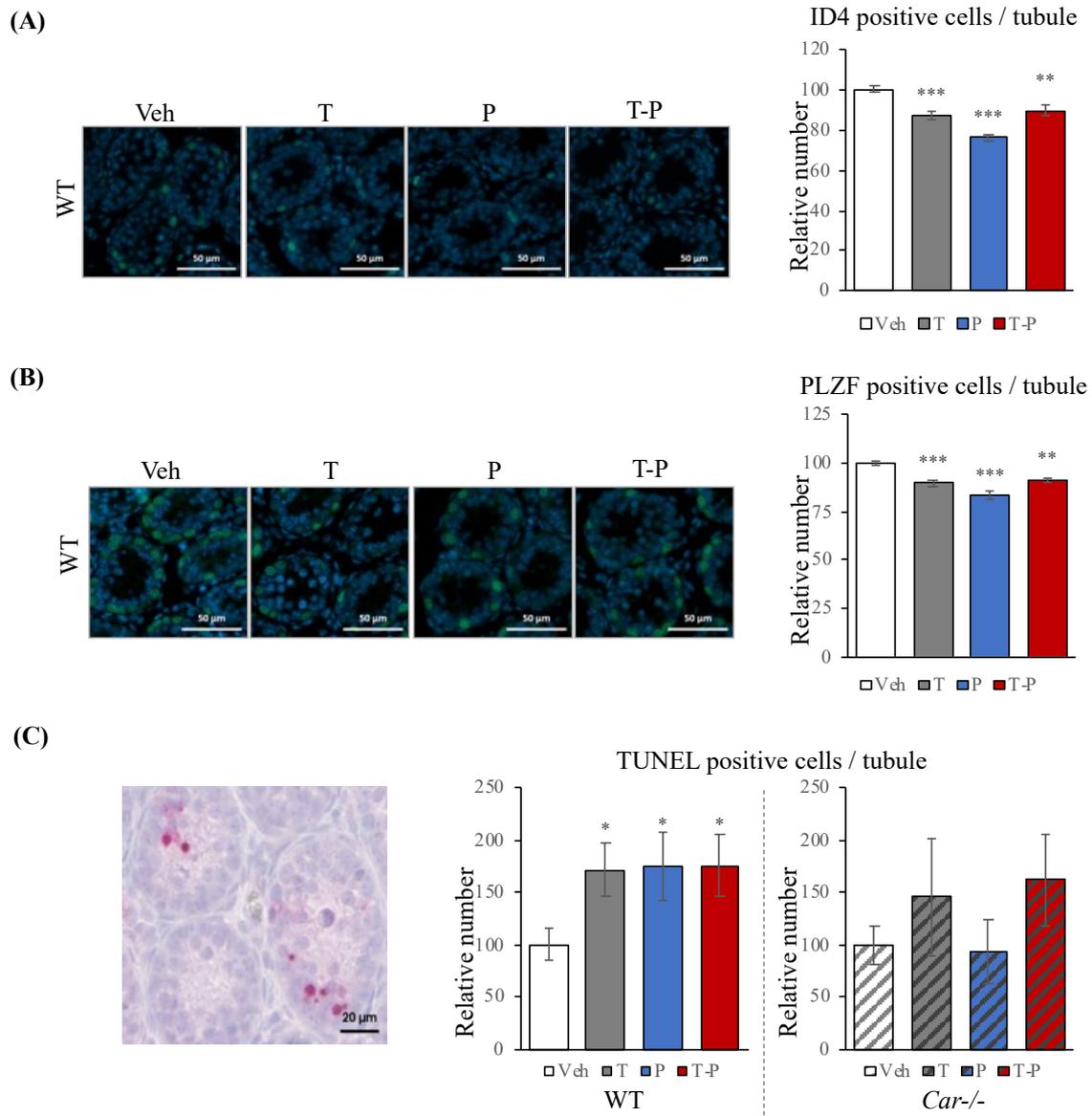


Figure-3. Neonatal CAR and PXR activations alter neonatal testicular histology.

(A) Representative micrographs of testis stained for ID4. (Right) Quantification of the number of ID4 positive cells per seminiferous tubules in testis WT males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 10day-postnatal.

(B) Representative micrographs of testis stained for PLZF. (Right) Quantification of the number of PLZF positive cells per seminiferous tubules in testis WT males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 10day-postnatal.

(C) (Left) Representative micrographs of testis stained for TUNEL; (Right) Quantification of the relative number of TUNEL positive cells for 100 seminiferous tubules of WT or *Car*^{-/-} males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 10day-postnatal.

In all panels, n=6. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01, ***, p<0.001.

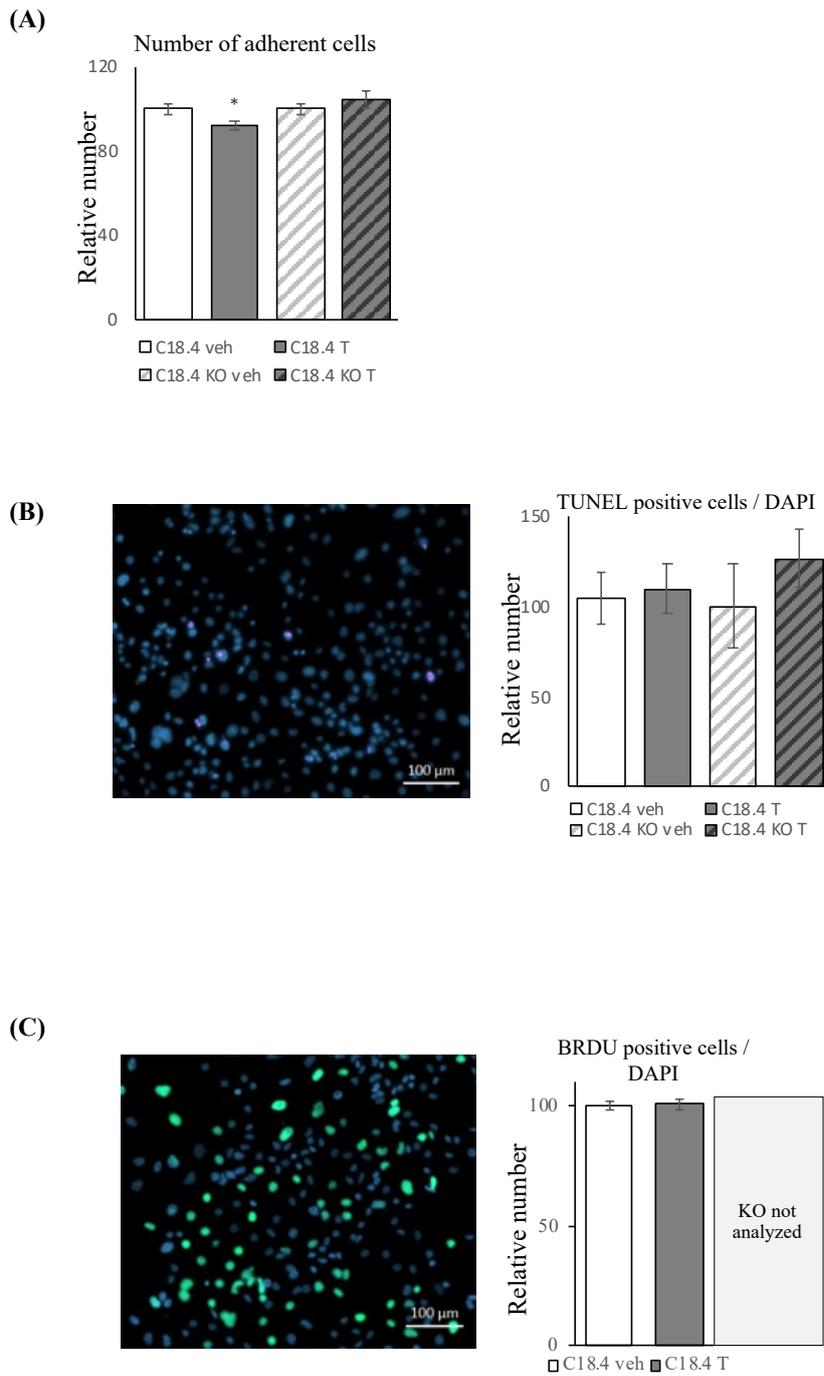


Figure-4. Neonatal CAR and PXR activations alter spermatogonia homeostasis.

- (A) Relative number of adherent WT or *Car*^{-/-} (KO) cells treated with vehicle or T (10⁻⁶M) for 24h. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.
- (B) Representative image of cells stained for TUNEL. Quantification of the relative number of the number of TUNEL positive WT or *Car*^{-/-} cells treated with vehicle or T (10⁻⁶M) for 24 hours. Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 100.
- (C) Representative image of cells stained for BrdU. Quantification of the relative number of the number of BrdU positive WT cells treated with vehicle or IA (10⁻⁶M) for 24 hours. Vehicle group was arbitrarily set at 100.

In all panels, n=5-26 from 2 to 5 independent experiments. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, p<0.05

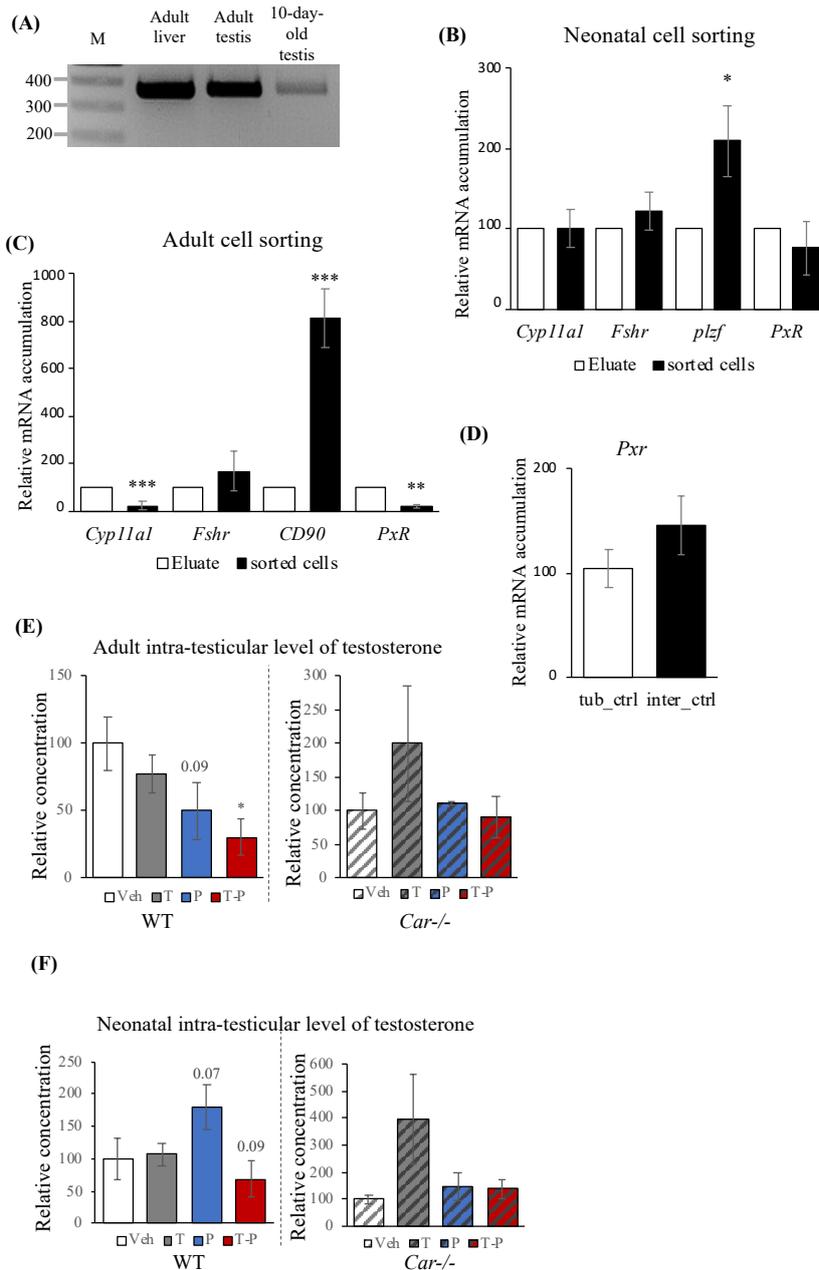


Figure-5. *Pxr* is expressed in mouse testis and regulates testosterone homeostasis.

(A) Representative image of RT-PCR analysis of the expression of *Pxr* mRNA in adult liver, adult testis and 10-day-old testis.

(B) *Pxr* mRNA accumulations normalized to β -actin in CD90+ cells isolated from 6 to 7 days or adult of males. n=5. The CD90- unsorted cell group was arbitrary set at 100.

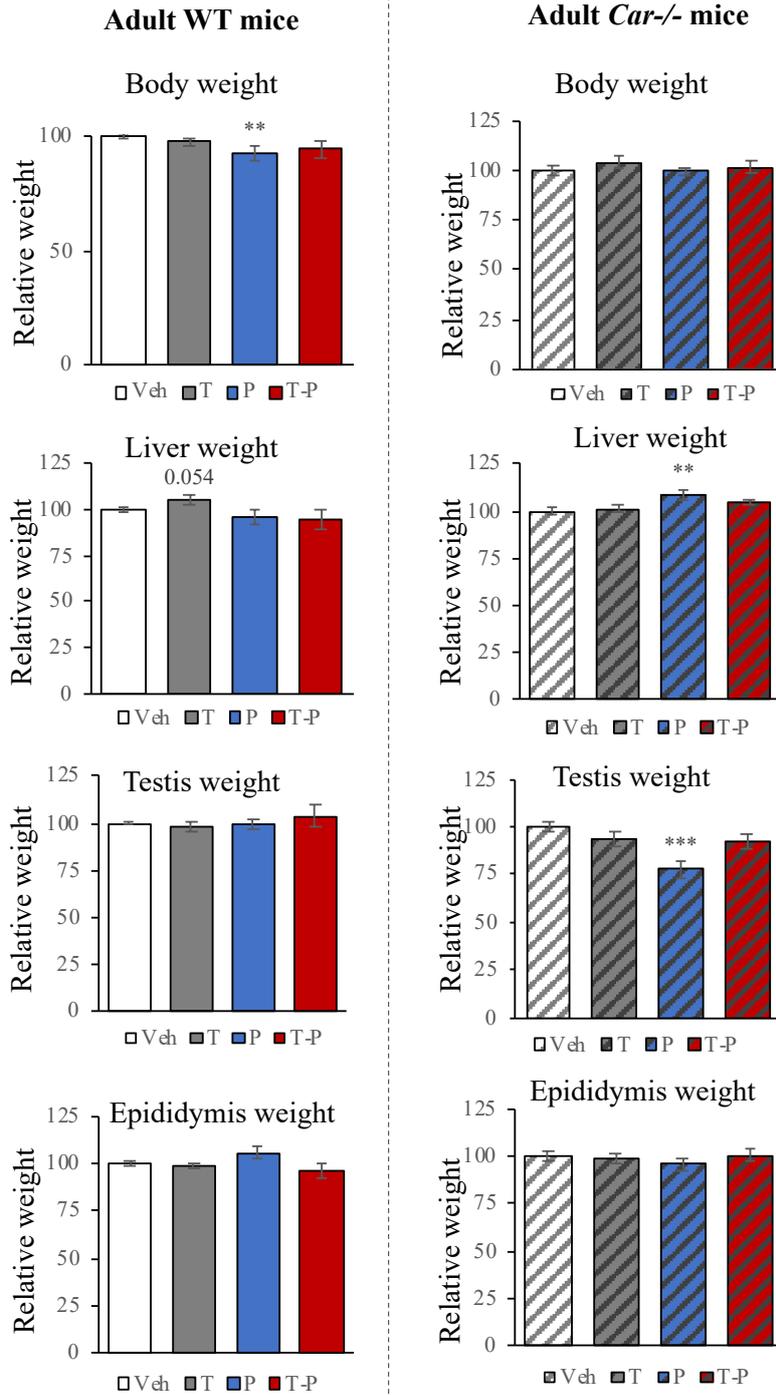
(C) *Pxr* mRNA accumulations normalized to β -actin in tubular and interstitial cells isolated from adult mouse testis. The tubular cells were arbitrary set at 100.

(D) *Pxr* mRNA accumulations normalized to β -actin in CD90+ cells isolated from adult days of males. n=5. The CD90- unsorted cell group was arbitrary set at 100.

(E) Relative levels of intra-testicular and plasma testosterone in WT or *Car*^{-/-} males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

(F) Relative levels of intra-testicular and plasma testosterone in WT or *Car*^{-/-} males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 10dpn

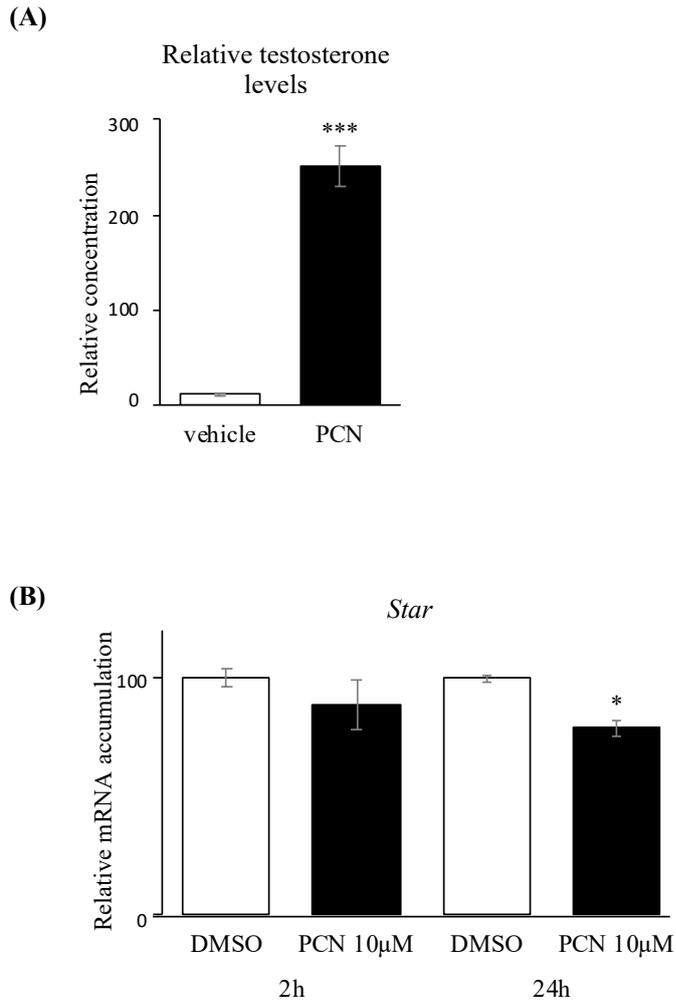
In all panels, n=6. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis:*, p<0.05; **, p<0.01, ***, p<0.001.



Supplemental figure 1

Adult body, liver, testis, epididymis and seminal weights of *WT* or *Car*^{-/-} males neonatally exposed to vehicle, TCPOBOP (T), PCN (P) or TCPOBOP+PCN (T-P) at 8-month-old of age.

n=10 to 34 from 3 to 5 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: **, p<0.01, ***, p<0.001.



Supplemental figure 2

(A) Relative levels of medium testosterone levels in *mLTC1* cells treated for 2h with vehicle or PCN (10mM).

(B) *Star* mRNA accumulation normalized to β -actin i in *mLTC1* cells treated for 24h with vehicle or PCN (10mM).

In all panels, n=6. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis:*, p<0.05; ***, p<0.001.

B. Discussion

L'objectif de ce travail était d'identifier l'impact sur la physiologie testiculaire et sur la fertilité d'une double exposition néonatale à des molécules types xénobiotiques activant les voies de signalisation CAR et PXR.

Nos résultats indiquent que l'exposition néonatale au PCN (agoniste de PXR) seul n'impacte que de manière transitoire la spermatogenèse, malgré une altération à long terme de la production de testostérone. En revanche, l'exposition néonatale au TCPOBOP (agoniste de CAR) entraîne des altérations à long terme de la spermatogenèse, toutefois sans impact majeur sur la fertilité des animaux à l'âge adulte. De manière intéressante, les données montrent un impact à long terme de la double exposition au TCPOBOP et au PCN sur la fertilité des souris, associé à la fois à des altérations quantitative et qualitatives des cellules germinales. Ces données suggèrent des effets délétères des molécules agonistes au niveau des cellules germinales, conduisant à des altérations à long terme des capacités de reproduction. Notre étude a permis de montrer que l'inactivation du gène *Car* contrecarre les effets délétères de la double exposition et des simples traitements avec le TCPOBOP ou avec le PCN sur certains paramètres testiculaires, suggérant que les conséquences de l'activation de PXR sur la lignée germinale puissent être médiés en partie par la signalisation CAR. Cependant, de nombreuses questions subsistent pour comprendre les impacts de l'activation néonatale des voies de signalisation CAR et/ou PXR sur la physiologie testiculaire, et notamment pour identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les activités et les interactions de ces voies au niveau testiculaire.

1. Les effets délétères des traitements observés sur la physiologie testiculaire ont-ils une origine testiculaire ou systémique ?

Nous avons identifié l'expression des récepteurs CAR et PXR au niveau testiculaire. D'après nos résultats, CAR est exprimé majoritairement dans la lignée germinale indifférenciée, avec une plus faible expression dans le compartiment interstitiel. PXR semble quant à lui exprimé dans l'espace interstitiel et dans le compartiment tubulaire, mais son expression n'a pas été détectée au sein des cellules germinales indifférenciées. Ces données sont soutenues par l'identification de l'expression de ces récepteurs *in vitro* dans les lignées cellulaires MLTC1 de cellules de Leydig murines (PXR et CAR), et C18.4 de spermatogonies indifférenciées murines (CAR). Les résultats obtenus *in vitro* suggèrent un impact direct de :

- l'activation de la signalisation CAR sur les spermatogonies indifférenciées notamment mis en avant par une diminution du nombre de cellules C18.4 adhérentes après le traitement avec l'agoniste TCPOBOP toutefois sans impact sur l'apoptose ou la prolifération des cellules.
- l'activation de la signalisation PXR sur les cellules de Leydig, suggérée par une augmentation de la production de testostérone par les cellules MLTC1.

Cependant, d'après la littérature, CAR et PXR sont également exprimés dans d'autres organes et notamment au niveau hépatique. Nous ne pouvons donc pas exclure que les effets délétères des traitements observés *in vivo* proviennent d'altérations systémiques conduisant *in fine* à des atteintes testiculaires. En effet, il est connu que de nombreux paramètres contrôlés de manière systémique peuvent altérer la physiologie testiculaire. Pour ne citer que cela, de nombreux liens ont été identifiés entre les pathologies hépatiques, telle que les cholestases, et les atteintes testiculaires (Durazzo et al. 2006), (Hofny et al. 2011). En effet, notre équipe a notamment montré qu'à la suite d'une atteinte hépatique, les acides biliaires peuvent atteindre le testicule, s'y accumuler et altérer la spermatogenèse (Baptissart et al. 2014). Or, les récepteurs CAR et PXR sont tous deux impliqués dans le contrôle du métabolisme des acides biliaires *via* la régulation de gènes codants des enzymes de détoxification tels que les cytochromes et les transporteurs d'efflux (Wagner et al. 2005). De plus, il a également été montré que certains métabolites intermédiaires de la synthèse des acides biliaires sont des modulateurs des voies de signalisation CAR et PXR (Martinot et al. 2017).

Toutefois il faut noter que plusieurs études ont montré que l'activation des voies de signalisation CAR et PXR ont majoritairement des effets protecteurs contre les dommages hépatiques (Dong et al. 2009), (Wang, Damjanov, et Wan 2010), minimisant la possibilité d'un impact hépatique sur la fonction testiculaire dans notre étude. Dans notre étude, aucune altération majeure de la masse relative hépatique à l'âge adulte n'a été observée à la suite des traitements néonataux avec le TCPOBOP et/ou le PCN (*cf. papier 2*). Cependant, l'analyse de l'homéostasie des acides biliaires à 10 jours et à 8 mois, notamment au niveau testiculaire, permettrait de définir leur implication dans les atteintes testiculaires observées en réponse aux traitements. En effet, outre la quantité d'acides biliaires, il serait fondamental d'analyser les altérations qualitatives du pool d'acides biliaires, puisque certains acides biliaires sont associés à l'apparition de défauts testiculaires (Baptissart et al. 2014). Les potentielles dérégulations du métabolisme des acides biliaires pourraient être identifiées par des méthodes de dosage

d'immuno-absorption enzymatique (ELISA), par spectrométrie de masse et par l'analyse en qPCR des niveaux de transcrits de gènes codant les enzymes clés de leur biosynthèse.

En parallèle, travailler avec des animaux invalidés spécifiquement pour les gènes *Car* et/ou *Pxr* dans certains types cellulaires en utilisant le système de recombinaison Cre-Lox (afin d'exprimer la recombinase CRE sous le contrôle d'un promoteur spécifique), dans la lignée germinale (Vasa-Cre, (Gallardo et al. 2007)), dans les cellules de Leydig (Cyp11a1-Cre, (Buaas et al. 2012)), ou dans les hépatocytes (albumine-CRE, (Weisend et al. 2009)), est fondamental pour répondre à cette question.

Notre étude montre également une diminution des niveaux de testostérone intratesticulaire à l'âge adulte chez les souris traitées avec le PCN (et avec la combinaison des molécules agonistes). Cette altération est associée à une augmentation de l'apoptose des cellules germinales, qui n'a cependant pas d'impact majeur sur la production spermatique puisque nous n'avons pas observé de diminution du nombre de spermatozoïdes dans le groupe PCN. Il reste cependant intéressant d'établir les mécanismes par lesquels la signalisation PXR contrôle les taux de testostérone. L'analyse de l'impact du PCN chez les animaux spécifiquement invalidés pour le gène *Pxr* dans les cellules de Leydig (Cyp11a1-Cre), couplés à des approches approfondies sur des lignées cellulaires telle que les MLTC1 et sur des cultures primaires de cellules Leydig permettrait de mieux comprendre les rôles de PXR dans le contrôle de la stéroïdogénèse.

L'analyse de l'ensemble des modèles décrits est nécessaire afin de définir si les altérations observées sont médiées spécifiquement au niveau testiculaire par les modulations néonatales des voies de signalisation CAR et/ou PXR.

2. Par quel(s) mécanisme(s) les modulations des voies de signalisation CAR et PXR peuvent-elles agir sur l'homéostasie de la lignée germinale et avoir pour certains paramètres des effets délétères additifs ou synergiques ?

De manière intéressante, notre étude montre que les effets les plus délétères observés sont causés par la double exposition aux molécules TCPOBOP et PCN, qui entraîne une augmentation du nombre de mâles stériles, une diminution du nombre de spermatozoïdes et une augmentation de la mort *in utero* des petits. Ces données suggèrent que la co-exposition pourrait altérer de manière additive la production quantitative et qualitative de la lignée germinale. De

plus, ces résultats indiquent également une potentielle interaction entre les voies de signalisation CAR et PXR, bien que les gènes codant les récepteurs semblent exprimés dans des types cellulaires différents.

Le récepteur PXR, exprimé notamment dans les cellules de Leydig, serait majoritairement impliqué dans le contrôle du processus de la stéroïdogénèse puisqu'une tendance à l'augmentation des niveaux de testostérone est rapidement observée à la suite de son activation par le PCN, 10 jours après le traitement, puis une inhibition de la stéroïdogénèse est observée chez les souris de 8 mois. De manière intéressante, une augmentation des taux de testostérone est également observée, en culture cellulaire, en réponse au traitement PCN dans la lignée murine de Leydig MLTC1. Il faut noter que cette tendance à l'augmentation des niveaux de testostérone n'est pas associée à un impact sur l'expression des gènes codant les enzymes de la stéroïdogénèse, ce qui pourrait suggérer une augmentation de la mobilisation du cholestérol, précurseur des hormones stéroïdes. De plus, lors de traitements plus longs des MLTC1 au PCN, une diminution de l'expression de certains gènes codant des enzymes de la stéroïdogénèse a été observée, suggérant une boucle classique de rétrocontrôle négatif sur ces gènes, en réponse à l'augmentation des niveaux de testostérone. Cette hypothèse est appuyée par les données obtenus *in vivo* puisque l'analyse des niveaux de testostérone à 10 jours postnataux révèle une augmentation chez les souris traitées avec le PCN ; tendance qui n'est cependant pas retrouvée chez les souris de 10 jours traitées avec le TCPOBOP et le PCN. En effet, la co-activation des voies de signalisation CAR et PXR entraîne de manière surprenante une tendance à la diminution des taux de testostérone intra-testiculaire. Ces différences révèlent que le récepteur CAR, également exprimé dans les cellules de Leydig, pourrait aussi être impliqué dans la régulation de la synthèse de testostérone, même si le traitement néonatal au TCPOBOP seul n'a pas d'impact majeur sur les taux de testostérone. Il semble que l'activation de la voie CAR inhibe complètement l'impact initial du PCN sur la stéroïdogénèse, et que l'activation combinée des voies CAR et PXR conduit à un impact délétère synergique sur la production de testostérone. Nous envisageons pour expliquer ces données que l'interaction entre les voies de signalisation CAR et PXR modifie la disponibilité des co-activateurs de PXR (notamment de SRC1 qui est un coactivateur commun de CAR et de PXR), ou bien la disponibilité de leur partenaire commun d'hétérodimérisation le récepteur RXR, ou encore que l'activation de la voie CAR antagonise l'activité de PXR. Une étude récente appuie cette dernière hypothèse puisqu'il a été montré *in vitro* dans des cellules rénales que CAR et PXR interagissent directement entre eux, entraînant une inhibition mutuelle de leur signalisation (Bwayi et al.

2022). Ces données rendent toutefois plus complexe la compréhension de l'impact de la co-activation des voies de signalisation CAR et PXR sur la production de testostérone testiculaire.

De plus, à l'âge adulte, les souris traitées de manière néonatale avec le PCN ou avec les 2 molécules agonistes présentent une diminution des taux de testostérone intra-testiculaire. Ces données suggèrent que dans le contexte de l'activation de la voie de signalisation PXR seule, celle-ci pourrait entraîner initialement une augmentation de la synthèse de testostérone (potentiellement par la mobilisation accrue du cholestérol) dans les cellules de Leydig. L'augmentation initiale des niveaux de testostérone à la suite du traitement PCN pourrait entraîner un rétrocontrôle négatif au niveau hypothalamique/hypophysaire ou localement *via* la signalisation AR, conduisant *in fine* à une diminution du taux de testostérone intra-testiculaire. Les mécanismes sont sans doute différents dans le contexte de la double exposition. En effet, la co-activation des voies CAR et PXR conduit à 10 jours postnataux à une diminution de la stéroïdogénèse qui est maintenue à l'âge adulte ; il est donc possible que les traitements combinés entraînent une inhibition permanente de l'expression de gènes de la stéroïdogénèse. De telles observations ont déjà été faites dans un contexte d'exposition périnatale aux PEs, réduisant la stéroïdogénèse et les niveaux hormonaux (Carbone et al. 2013). Cela soulève la question de l'importance de cette diminution des taux de testostérone dans le contexte de la double exposition, puisque comme présenté dans l'introduction, le niveau de testostérone intra-testiculaire est un facteur critique au développement des cellules germinales puisqu'elle est impliquée notamment dans le maintien de la barrière hémato-testiculaire, la méiose, l'adhésion des spermatides avec les cellules de Sertoli et le relargage des spermatozoïdes.

D'après nos données, CAR qui est aussi exprimé dans les spermatogonies indifférenciées, régulerait en partie leur homéostasie. Nos résultats générés *in vivo* montrent en effet une diminution du nombre de cellules germinales sur le long terme conduisant *in fine* à une diminution de la production spermatique (sans impact sur la fertilité) en réponse au traitement par le TCPOBOP. Ces altérations de la spermatogenèse sont associées à une augmentation transitoire (à 10 jours) de l'apoptose des cellules germinales. Toutefois, si les analyses *in vitro* réalisées au sein de la lignée germinale C18.4 révèlent une diminution du nombre de cellules adhérentes en réponse au TCPOBOP, nos données n'indiquent pas d'impact du TCPOBOP sur le processus apoptotique, ou encore sur la prolifération cellulaire. Il est donc possible que l'activation de la signalisation CAR active un autre programme de mort cellulaire programmée tel que l'autophagie. Les rôles de CAR dans l'autophagie n'ont pas encore été beaucoup étudiés, cependant une étude a démontré que le traitement avec le TCPOBOP chez la souris entraîne

une augmentation de l'autophagie au niveau hépatique (H. Yang et al. 2016). Il serait donc intéressant d'analyser *in vivo* et *in vitro*, l'abondance de la protéine LC3/ MAP1BLC3 (*Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha*), témoin souvent utilisé pour détecter la formation des autophagosomes. Cependant, l'augmentation du nombre de cellules germinales apoptotiques observées *in vivo* à 10 jours restent inexplicables. Il est possible que l'activation de CAR entraîne d'une part la mort cellulaire par autophagie de certaines cellules germinales indifférenciées, et d'autre part l'altération de leur homéostasie qui serait délétère pour certaines dans des stades plus tardifs de la spermatogenèse. Il faut noter que visuellement, la localisation des cellules apoptotiques observées dans les tubes séminifères des souris de 10 jours pourraient correspondre à des spermatogonies différenciées et/ou à des spermatocytes.

Nos résultats indiquent également que PXR pourrait être impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire, puisque 10 jours et 8 mois après le traitement PCN seul, les souris présentent un plus grand nombre de cellules germinales apoptotiques. L'augmentation de la mort des cellules germinales a également été identifiée à la suite de la co-activation de CAR et de PXR chez les souris de 10 jours et de 8 mois, appuyant l'hypothèse de leur implication dans les processus de mort cellulaire. Il faut noter que si une augmentation du nombre de cellules germinales apoptotiques est observée *in vivo* après la co-activation des voies CAR et PXR, nous n'avons pas observé d'additivité de l'effet des molécules PCN et TCPOBOP. Ces données suggèrent une potentielle convergence des voies CAR et PXR concernant le processus apoptotique des cellules germinales.

Seuls, les traitements TCPOBOP ou PCN n'ont pas d'impact à long terme sur la fertilité des animaux. Cependant si l'activation néonatale de PXR n'altère pas la production spermatique, une diminution d'environ 20% du nombre de spermatozoïdes est observée à la suite de l'activation néonatale de CAR. Une des hypothèses envisageables pour expliquer l'impact additif de l'exposition combinée sur la fertilité serait que la co-activation entraîne, d'une part l'augmentation de l'autophagie des spermatogonies indifférenciées ainsi que l'apoptose des cellules germinales plus différenciées (qui serait principalement médiée par l'activation de CAR par le TCPOBOP) ; et d'autre part une diminution permanente de la synthèse de testostérone, altérant l'homéostasie des cellules germinales et *in fine* la qualité des spermatozoïdes. Les données obtenues *in vivo* suggèrent que les deux récepteurs participeraient à la régulation de la synthèse de testostérone et au contrôle de la mort programmée des cellules germinales. La combinaison des altérations provoquées par l'activation des 2 voies impacterait

donc de manière irréversible l'homéostasie des cellules germinales et expliquerait l'altération à long terme de la fertilité des animaux doublement exposés.

Les traitements TCPOBOP ou PCN entraîneraient des conséquences minimales sur la physiologie testiculaire, alors que la combinaison de leurs altérations aurait un impact à long terme sur la production quantitative et qualitative des spermatozoïdes et donc sur la fertilité, témoignant de l'effet cocktail des molécules. Des études ont déjà démontré des différences dans les conséquences d'une exposition simple à un xénobiotique comparée à une exposition combinée à des xénobiotiques (Gaudriault et al. 2017), (Buñay et al. 2018), (Sèdes et al. 2018), affectant de manière différentielle les taux de testostérone, l'apoptose des cellules germinales et la fertilité des animaux. De manière intéressante, il a été démontré chez la souris que le TCPOBOP entraîne une augmentation de la prolifération des hépatocytes alors que le PCN n'a pas d'effet à ce niveau. Cependant, la double exposition au TCPOBOP et au PCN accentue fortement la prolifération des hépatocytes. Si les mécanismes moléculaires impliqués n'ont pas été identifiés, cette étude renforce l'hypothèse d'une potentielle additivité des impacts des activations des voies de signalisation CAR et PXR (Shizu et al. 2013). De plus, une autre étude a montré que l'expression du gène *Collagen 3A* est augmentée chez les souris invalidés pour le gène *Car* ou pour le gène *Pxr* ayant subi une ligation du canal biliaire, alors que chez les animaux doublement invalidés pour les gènes *Car* et *Pxr*, l'expression de ce même gène est diminuée (Stedman et al. 2005). L'ensemble de ces études suggère donc une interaction et une régulation complexe intervenant à travers les voies de signalisation CAR et PXR.

Dans l'état actuel d'avancement de nos recherches, nous ne pouvons cependant pas exclure que les traitements TCPOBOP et/ou PCN altèrent d'autres paramètres. En effet, les récepteurs CAR et PXR tous deux exprimés dans les cellules de Leydig, pourraient par exemple impacter la production, dans ces cellules, des protéines IGF1 et CSF1 qui sont essentielles à l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées, comme présenté dans l'introduction. De même, comme présenté dans la partie 1 de cette discussion, l'activation des voies CAR et/ou PXR pourraient altérer des paramètres systémiques altérant *in fine* la physiologie du testicule.

Pour mieux comprendre les impacts des traitements au TCPOBOP et/ou au PCN, il est essentiel de poursuivre les expérimentations sur les cellules de Leydig et sur les spermatogonies, afin de comprendre les conséquences moléculaires des expositions. Pour cela, il faudrait *in vitro* réaliser des analyses en qPCR des niveaux de transcrits de gènes, et en western blot des niveaux de protéines essentielles à l'homéostasie des spermatogonies (tels que

ID4 ou GDNF par exemple, cf. introduction page 18). De plus, il est fondamental de poursuivre les analyses des conséquences du traitement PCN seul et de la co-exposition chez les souris invalidées pour le gène *Car*, afin d'identifier l'ensemble des paramètres qui seraient médiés par la signalisation CAR en réponse à la molécule PCN. Etant donné l'apparente complexité des interactions entre les voies de signalisation CAR et PXR, il faudrait également réaliser *in vivo* des analyses de *single-cell RNAseq*, en réponse aux différents traitements. De plus, il serait intéressant de réaliser des expériences de co-culture, dans lesquelles les cellules germinales indifférenciées ou les cellules de Leydig seraient exposées aux molécules seules ou aux co-traitements. Ces expériences nous permettraient notamment de mieux comprendre l'impact de l'activation de la voie de signalisation PXR dans les cellules de Leydig sur l'homéostasie des cellules germinales.

Enfin, il faut également noter que les effets délétères de cette double exposition ont été observés à la suite de la co-activation néonatale des voies de signalisation CAR et PXR. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la co-activation de ces voies à l'âge adulte chez la souris.

3. Comment la signalisation CAR pourrait-elle médier certains effets délétères de la signalisation PXR ?

Nos résultats ont montré que l'invalidation du gène *Car* suffit à contrecarrer l'ensemble des effets délétères observés de la double exposition au PCN et au TCPOBOP sur la fertilité des souris. L'invalidation du gène *Car* permet également d'inhiber les impacts néonataux du TCPOBOP ainsi que ceux du PCN sur l'apoptose des cellules germinales.

À la suite de ces observations surprenantes, une des premières interrogations concerne la spécificité des ligands. Si d'après la littérature, PCN est un ligand spécifique de PXR dans les hépatocytes (Kliwer et al. 1998), les protéines CAR et PXR sont également présentées comme des récepteurs ayant une grande plasticité pour leurs ligands. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la molécule PCN sur la signalisation CAR dans d'autres lignées cellulaires que les hépatocytes, telles que les C18.4 et les MLTC1. Pour cela, il est possible d'utiliser un gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de gènes cibles de CAR tels que *Cyp2b10*, et/ou de réaliser des expériences de gels retards et d'immunoprécipitations de la chromatine (ChIPs) afin d'étudier l'activité et la localisation de la protéine CAR en réponse au PCN.

Cependant si l'on considère la spécificité de nos ligands, démontrée depuis plusieurs décennies, nos données suggèrent une interaction entre les voies de signalisation CAR et PXR. En effet, il semble que l'activation néonatale de la voie de signalisation PXR par le traitement PCN nécessite la signalisation CAR pour médier ces effets délétères sur les cellules germinales et sur la fonction de reproduction. Nous ne pouvons pas exclure que PXR pourrait contrôler l'expression du gène *Car*, même si de telles données n'ont pas été démontrées à l'heure actuelle dans la littérature. Dans ce cas de figure, l'activation de la voie de signalisation PXR par le PCN chez les souris sauvages, modulerait indirectement la signalisation CAR, dans les cellules de Leydig ou *via* des dialogues entre types cellulaires testiculaires (puisque PXR n'est pas exprimé dans la lignée germinale), ce qui aurait un impact sur l'homéostasie des spermatogonies. En absence du gène *Car*, la molécule PCN activerait la signalisation PXR, ce qui n'aurait cependant plus ou peu d'impact au niveau testiculaire. Cette hypothèse inclut des interactions potentielles entre les protéines CAR et PXR, des modifications de l'équilibre de partage des co-facteurs de CAR et de PXR, ainsi que l'interaction avec leur partenaire commun d'hétérodimérisation RXR, comme décrit dans la partie précédente. Il faut noter cependant, que l'augmentation de la masse du foie observée à 10 jours chez les souris sauvages traitées avec le PCN est également retrouvée chez les animaux invalidés pour *Car* ayant subi le même traitement, validant l'efficacité de la molécule PCN. La signalisation CAR médierait donc les effets du traitement PCN uniquement au niveau testiculaire.

Là encore, l'exposition de co-culture de cellules germinales et de cellules de Leydig aux différents traitements, combinée à l'inactivation spécifique du gène *Car* ou de *Pxr* dans l'un ou l'autre des types cellulaires est fondamentale pour comprendre comment CAR peut médier les impacts de l'activation de PXR sur la lignée germinale. De plus, des expériences de co-immunoprécipitations notamment dans la lignée cellulaire MLTC1 en réponse au traitement nous permettrait d'étudier une potentielle interaction directe de CAR et de PXR, mais également d'étudier les interactions des co-facteurs avec les récepteurs. De plus, l'inactivation pharmacologique de la voie CAR chez les souris par l'utilisation de l'agoniste inverse androstanol, en parallèle du traitement PCN, permettrait d'étudier si les effets délétères du PCN nécessite réellement l'activation de la signalisation CAR.

4. Comment expliquer le maintien à long terme d'altérations causées par un co-traitement transitoire et néonatale ?

Nos données montrent que la co-activation néonatale des voies de signalisation CAR et PXR chez la souris entraîne à l'âge adulte une altération de la fertilité. Il est connu que la période néonatale est une fenêtre développementale particulièrement sensible à l'exposition des xénobiotiques. Nos données suggèrent que l'activation néonatale de la signalisation CAR impacte initialement l'homéostasie des spermatogonies indifférenciées, et que l'activation néonatale de la signalisation PXR altère notamment la production de testostérone dans les cellules de Leydig. A l'âge adulte, les souris exposées aux 2 traitements présentent une altération de la quantité et de la qualité spermatique, associée à une altération à long terme de la synthèse de testostérone et de la mort cellulaire des cellules germinales.

Il a été démontré chez la souris, que les expositions néonatales au TCPOBOP ou au PCN entraînent des altérations à long terme. Cela pose la question de l'implication des modulations de marques épigénétiques comme discuter dans la partie DISCUSSION GENERALE.

Pour explorer cette hypothèse, il est fondamental d'étudier l'impact des traitements sur la mise en place des marques épigénétiques dans les régions régulatrices impliquées dans l'expression de gènes de la stéroïdogénèse, ou encore de gènes impliqués dans le contrôle de la mort programmée des cellules germinales. Il est également essentiel d'identifier les causes des altérations de la qualité spermatique (suggérée par l'augmentation de la mort *in utero* des petits à la suite de la double exposition et du traitement avec le PCN chez les souris mâles).

5. Données extrapolables à l'homme ?

Finalement, notre étude a montré que la double activation néonatale des signalisations CAR et PXR chez la souris peut altérer la production quantitative et qualitative des cellules germinales et conduire à l'infertilité à l'âge adulte. Ces résultats novateurs démontrent les rôles de CAR et de PXR dans la physiologie et les pathophysiologies testiculaires. De plus, il serait intéressant de comparer les effets des expositions au cours de différentes périodes (néonatale versus adulte) et/ou de différentes durées (aigüe versus chronique) sur la fonction testiculaire et sur les paramètres dérégulés dans notre étude.

Cependant, d'autres questions persistent, et notamment la possibilité d'extrapoler ces résultats à l'Homme. Les récepteurs CAR et PXR sont tous deux exprimés dans le testicule humain, suggérant que la double activation de leurs voies de signalisation, notamment pendant

la période néonatale, pourrait également avoir des impacts délétères sur les fonctions de reproduction chez l'homme. Il serait donc intéressant d'étudier les impacts moléculaires des traitements PCN et/ou TCPOBOP sur des lignées cellulaires humaines de spermatogonies, de cellules de Leydig, de coculture de ces lignées, voire sur des cultures d'explants testiculaires humains (Gaudriault et al. 2017), (Sèdes et al. 2018). Il est également possible grâce à la transgénèse de travailler avec des animaux invalidés pour les gènes murins *Car* et *Pxr* et d'exprimer à la place les formes humaines de ces gènes. Ces données permettraient d'approfondir l'étude de l'impact de l'activation des voies de signalisation CAR et PXR sur la physiologie testiculaire.

Nos résultats sont donc pertinents notamment dans un contexte d'expositions environnementales, puisque des études ont rapporté les effets délétères de l'exposition à des xénobiotiques sur la fertilité et qu'un grand nombre de ces molécules sont activatrices des voies de signalisation CAR et PXR. Par ailleurs, nos résultats devraient alerter les organismes décisionnaires qui contrôlent la mise sur le marché de nouveaux xénobiotiques. En effet, si les impacts délétères sur la santé de certaines classes de molécules chimiques telles que les PE sont souvent étudiés, il est nécessaire de prendre conscience que de nombreuses autres voies de signalisation peuvent être altérées par les molécules chimiques environnementales. Comme présenté dans notre étude, l'exposition néonatale à des molécules type xénobiotique (telle que le TCPOBOP et le PCN) altère les signalisations des voies CAR et PXR, altérant *in fine* la fertilité des animaux.

Discussion générale

Discussion générale

L'objectif général de notre étude était d'étudier l'impact testiculaire d'une exposition néonatale à un ou plusieurs modulateurs des signalisations CAR et/ou PXR, mimant les effets de perturbateurs environnementaux. Les récepteurs CAR et PXR sont des récepteurs de xénobiotiques dont les activités sont déjà bien décrites dans le foie mais leurs rôles dans la physiologie et les physiopathologies testiculaires restent à identifier.

Pour étudier les rôles de ces récepteurs au niveau du testicule nous avons exposé des souris sauvages ou invalidées pour le gène *Car* (*Car*^{-/-}) chaque jour pendant les 10 premiers jours de leur vie à l'un des traitements suivants :

- l'agoniste spécifique de la forme murine de CAR (mCAR), le TCPOBOP (*1,4-Bis-[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene*), une molécule retrouvée dans la composition de certains pesticides (Tzamei et al. 2000).

- l'agoniste spécifique de la forme murine de PXR (mPXR), le PCN (*Pregnenolone-16alpha-carbonitrile*), un stéroïde synthétique qui peut avoir une activité de perturbateur endocrinien (Kliewer et al. 1998).

- la combinaison des agonistes de mCAR et de mPXR (TCPOBOP et PCN).

- l'agoniste inverse spécifique de mCAR, l'androstanol (*5alpha-Androstan-3beta-ol*), un stéroïde naturel ayant une activité inhibitrice sur la signalisation CAR.

Nous avons analysé la fertilité des animaux à l'âge de 8 mois, et étudié l'impact des traitements sur des paramètres physiologiques, histologiques et moléculaires à 5 jours, 10 jours et à 8 mois pour appréhender les rôles de CAR et de PXR dans la physiologie testiculaire. Pour compléter ces résultats, des données *in vitro* ont également été générées sur une lignée murine de spermatogonies indifférenciées (C18.4) ou sur une lignée murine de cellules de Leydig (MLTC1).

Notre étude apporte des données novatrices quant à l'implication de CAR et de PXR dans les physiopathologies testiculaires, mais soulève également de nombreuses questions dont les plus importantes seront discutées dans cette dernière partie.

A. Quelle(s) implication(s) de la signalisation systémique dans notre étude ?

C'est une question majeure dans notre étude, puisque l'expression des gènes *Car* et *Pxr* a été détectée chez le rongeur dans de nombreux organes tels que le foie, l'intestin, les reins, les poumons et le cerveau.

D'après nos données, au niveau testiculaire le récepteur CAR est majoritairement exprimé dans la lignée germinale indifférenciée (les spermatogonies), mais nous avons également détecté son expression au sein de l'espace interstitiel, suggérant un rôle potentiel dans les cellules de Leydig. *In vitro*, nous avons détecté l'expression du gène *Car* dans la lignée germinale C18.4 ainsi que dans la lignée MLTC1 de cellules de Leydig, appuyant les données obtenues *in vivo*. De plus, des expériences de tri cellulaire de spermatogonies ont permis de confirmer l'enrichissement du récepteur CAR au sein des cellules germinales indifférenciées. Le récepteur PXR est également exprimé au niveau testiculaire dans l'espace interstitiel ainsi que dans le compartiment tubulaire, mais son expression n'a pas été détectée dans la lignée germinale indifférenciée. *In vitro*, nous avons détecté son expression uniquement dans les MLTC1.

Les résultats obtenus *in vivo* suggèrent des dérégulations de l'homéostasie des spermatogonies à la suite des traitements avec l'androstanol, le TCPOBOP et/ou le PCN (dont certaines sont médiées spécifiquement par CAR comme démontré par l'utilisation de souris invalidées pour le gène *Car*). De plus, les résultats obtenus *in vitro* montrent des impacts directs des modulations de la signalisation CAR sur les C18.4 (médiés spécifiquement par CAR comme démontré par l'utilisation de cellules rendues déficientes pour le gène *Car* grâce à l'approche CRISPR/Cas9), ainsi que des impacts directs de l'activation de la signalisation PXR sur les MLTC1. Cependant, nous ne pouvons pas exclure dans l'état actuel d'avancement de nos recherches que les conséquences testiculaires observées chez les animaux puissent être médiées par des altérations systémiques. En effet, *Car* et *Pxr* sont exprimés dans de nombreux organes, et leurs rôles sont multiples ; ils interviennent notamment dans le métabolisme de molécules endobiotiques (tels que les acides biliaires) et de molécules xénobiotiques (tels que certains pesticides, médicaments...), ainsi que dans la régulation des métabolismes lipidiques et glucidiques. Or, il est connu que des modifications physiologiques au niveau de certains organes, outre le testicule, peuvent altérer la physiologie testiculaire.

6. L'impact hépatique des acides biliaires sur la physiologie testiculaire

Notre équipe a identifié en 2014 des liens entre pathologies hépatiques (cholestases) et atteintes testiculaires (Baptissart et al. 2014). L'augmentation des niveaux d'acides biliaires provoquée chez les souris mâles par un régime riche en acide cholique conduit à des atteintes testiculaires et à une hypofertilité, médiées par le récepteur membranaire des acides biliaires TGR5. Or, des liens entre les signalisations CAR, PXR et le métabolisme hépatique des acides biliaires ont déjà été établis. En effet, les récepteurs CAR et PXR régulent l'expression de gènes codant des enzymes de détoxication qui facilite l'excrétion de certains acides biliaires, tel que l'acide lithocholique dont l'abondance est corrélée à la survenue de choléstase (Li et al. 2012). Les modulations néonatales des voies de signalisation CAR et PXR pourraient donc avoir un impact hépatique sur le métabolisme des acides biliaires qui pourraient *in fine* médier des altérations de la physiologie testiculaire.

Généralement, les activations des voies de signalisation CAR ou PXR ont des effets plutôt protecteurs sur le foie. Dans notre étude, l'analyse de la masse relative du foie des souris de 8 mois traitées en période néonatale avec le TCPOBOP et/ou le PCN n'indique pas d'altérations majeures de la physiologie hépatique. Ces données préliminaires associées aux données disponibles dans la littérature suggèrent qu'il y aurait un risque minime d'atteintes hépatiques dans ces modèles. Nous avons également travaillé avec une molécule inhibitrice de la signalisation CAR, l'androstanol. A 8 mois, les souris traitées avec l'androstanol en période néonatale ne présentent pas non plus de modifications de la masse du foie, suggérant également un impact hépatique minime du traitement avec l'androstanol. Cependant, les conséquences de l'inhibition de la signalisation CAR sur le foie n'ont pas encore été clairement identifiés dans la littérature.

En revanche, les impacts hépatiques de l'inactivation des gènes *Car* ou *Pxr* ont été identifiés. L'inactivation des gènes *Pxr* (*Pxr*^{-/-}) ou *Car* (*Car*^{-/-}) chez la souris entraîne une hépatomégalie associée à des altérations la physiologie hépatique (Spruiell et al. 2014), (Lukowicz et al. 2019). Une étude a montré que les souris *Car*^{-/-} présentent à la fois une diminution globale de la concentration plasmatique d'acides biliaires et une augmentation spécifique de la concentration plasmatique de certains acides biliaires tels que les acides désoxycholique et muricholique (Lickteig et al. 2019). Toutefois, dans ces différentes études, la fertilité des animaux ne semble pas avoir été analysée.

Dans notre étude, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les traitements (ou l'inactivation du gène *Car*) altèrent l'expression hépatique de gènes codant des enzymes de détoxification, ce qui pourrait modifier la taille ou la composition du pool d'acides biliaires (hépatiques, plasmatiques et/ou testiculaires) et ainsi conduire à des atteintes testiculaires. Il nous faudra donc réaliser une analyse des phénotypes histologique et moléculaires au niveau hépatique pour évaluer la part relative du foie dans les altérations de la fertilité induite par les molécules utilisées dans nos études. Ainsi, des analyses permettant d'identifier de potentielles altérations du métabolisme et de la composition du pool des acides biliaires sont donc nécessaires pour répondre à cette question. Plusieurs stratégies s'offrent à nous : le dosage des acides biliaires par des méthodes d'immuno-absorption enzymatique (ELISA), l'analyse par spectrométrie de masse du pool d'acides biliaires et l'analyse en qPCR des niveaux de transcrits de gènes codant les enzymes clés de leur biosynthèse.

7. D'autres impacts systémiques envisagés sur la physiologie testiculaire

Les récepteurs CAR et PXR sont exprimés au niveau hépatique. Comme rappelé plusieurs fois au cours de cette étude, ils sont tous les deux impliqués dans la régulation de nombreux gènes. Etant donné la diversité de leurs rôles et la spécificité de leurs fonctions selon le tissu étudié, il est probable qu'ils puissent intervenir à différentes étapes de la régulation de nombreux gènes, au niveau de la régulation transcriptionnelle ou post-traductionnelle, ce qui pourrait entraîner des conséquences délétères au niveau testiculaire. Les hypothèses ci-dessous ont été envisagées puisque les modulations des signalisations par les molécules utilisées sont corrélées à des altérations de la production de testostérone plasmatique voire intra-testiculaire, suggérant une régulation complexe exercée par les deux récepteurs (*cf. B.*). Cependant, les résultats que nous avons obtenus avec l'androstanol suggèrent que les effets observés sur les niveaux de testostérone ne sont pas dépendants de la signalisation CAR. En effet, les modulations des taux de testostérone induites par l'AI sont également observées chez les animaux *Car*^{-/-} traités avec les différentes molécules. Ainsi, il reste important de commenter ces données pour l'AI même si elles sortent du champ d'action du récepteur *Car*. Pour le traitement avec le PCN ainsi que pour le co-traitement avec le PCN et le TCPOBOP il nous faudra réaliser les expériences sur des souris invalidées pour le gène *Pxr*.

Il est possible que l'exposition à l'AI ou au PCN affectent la régulation de IGF1 au niveau hépatique, un facteur de croissance intervenant dans la régulation de la stéroïdogénèse,

indispensable au développement de la gonade mâle et au maintien de la spermatogenèse (Griffeth, Bianda, et Nef 2014). Une étude a notamment suggéré que PXR pourrait réguler de manière post-transcriptionnelle l'expression du gène *Igf1* (Wang 2021). La modulation de la signalisation PXR pourrait donc entraîner la dégradation de l'ARN messager du gène *Igf1* et altérer la synthèse de testostérone. Cependant cette hypothèse est peu probable puisque l'activation de PXR par le PCN entraîne initialement une augmentation de la synthèse de testostérone intra-testiculaire (à 10 jours et dans la lignée de cellules de Leydig MLTC1). Toutefois il reste intéressant d'analyser par qPCR et par western blot l'expression hépatique du gène *Igf1* à la suite des différents traitements.

La sécrétion d'adipokines produites par le tissu adipeux peut également impacter la stéroïdogenèse et donc les capacités de reproduction (Barbagallo et al. 2021). La leptine serait notamment impliquée dans la diminution des niveaux de testostérone chez les personnes en surpoids (Khodamoradi et al. 2022). Des données de la littérature suggèrent que les signalisations CAR et PXR interviennent dans la production de certaines adipokines (Masuyama et Hiramatsu 2012), (Spruiell et al. 2014), ce qui pourrait être en lien avec les modulations des niveaux de testostérone observées dans notre étude. Le dosage hormonal par ELISA des niveaux de leptine serait notamment intéressant pour analyser le lien potentiel entre les modifications des niveaux de testostérone et la production d'adipokines dans nos modèles.

Les gonadotrophines dont la production est contrôlée au niveau cérébral jouent un rôle central majeur dans la régulation des fonctions testiculaires, notamment *via* la régulation de la stéroïdogenèse. A ce jour aucun lien n'a été observé entre CAR, PXR et les sécrétions de gonadotrophines. Cependant, des études ont montré que *Car* est exprimé au sein de l'hypophyse et que l'activation de CAR au niveau cérébral peut avoir des conséquences au niveau périphérique notamment hépatique (Bernal-Mizrachi et al. 2003), (J. Gao et al. 2009). Les modulations néonatales des signalisations CAR et/ou PXR pourraient ainsi altérer les sécrétions de LH et/ou de FSH au niveau hypophysaire ce qui impacterait la stéroïdogenèse et la physiologie du testicule. Le dosage hormonal par ELISA des niveaux de LH et de FSH plasmatiques nous permettrait donc d'étudier les impacts systémiques des différents traitements.

En parallèle de toutes les analyses citées dans cette partie **A.**, il est essentiel d'étudier l'impact des différents traitements sur des animaux invalidés spécifiquement pour les gènes *Car* et/ou *Pxr* dans la lignée germinale (*Vasa-Cre*), dans les cellules de Leydig (*Cyp11a1-Cre*),

ou encore dans les hépatocytes (albumine-CRE). Aussi, des approches approfondies sur des lignées cellulaires (les MLTC1 et les C18.4 et la coculture de ces lignées) ainsi que sur des cultures primaires de cellules Leydig ou de spermatogonies sont également fondamentales pour répondre à cette question. L'analyse de l'ensemble des modèles décrits est donc nécessaire afin de définir si les altérations observées sont médiées spécifiquement au niveau testiculaire par les modulations néonatales des voies de signalisation CAR et/ou PXR.

B. Quels sont les rôles des signalisations CAR et PXR au niveau testiculaire ?

8. L'impact de l'inhibition de la signalisation CAR sur les cellules germinales indifférenciées

Nos données montrent que l'inhibition néonatale de la signalisation CAR entraîne une hypofertilité chez les souris adultes de 8 mois, associée à une altération de la qualité spermatique. Le traitement avec l'androstanol a été réalisé de manière transitoire entre les jours postnataux P1 et P10. A ce stade, il n'y a pas encore de spermatozoïdes ce qui suggère que l'inhibition de la signalisation CAR pourrait notamment impacter initialement l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées. L'analyse histologique des testicules issus des souris en période néonatale montre en effet une diminution du nombre de spermatogonies indifférenciées, associée à une altération de leur localisation puisque certaines sont présentes au centre des tubes séminifères. Si les précurseurs des spermatogonies (les gonocytes) se trouvent initialement au centre des tubes séminifères, ils commencent normalement à se différencier et à migrer en périphérie entre les jours postnataux P3 et P5 : on parle alors de la transition des gonocytes en spermatogonies. Les résultats observés chez les jeunes souris suggèrent une altération de cette transition à la suite du traitement avec l'androstanol.

Plusieurs études ont démontré que la protéine FOXO1, et notamment sa localisation subcellulaire, est impliquée dans la régulation de la différenciation des gonocytes en spermatogonies (Goertz et al. 2011), (Pui et Saga 2017) et de manière générale dans le contrôle de multiples étapes de la spermatogenèse. Pour mieux identifier les causes des altérations observées, nous avons analysé l'impact de l'androstanol sur la protéine FOXO1 dans un premier temps *in vivo*, en réalisant des marquages immunohistochimiques. Les résultats obtenus chez les souris de 5 jours traitées avec l'androstanol montrent la présence de cellules FOXO1 positives ectopiques au centre des tubes séminifères, toutefois sans altération du nombre de cellules germinales. De plus, les résultats obtenus chez les souris de 10 jours montrent des

impacts majeurs de l'androstanol sur la signalisation FOXO1, associés notamment à des modifications de la localisation subcellulaire de la protéine FOXO1 au sein des cellules germinales et au sein des tubes séminifères pour les cellules positives pour FOXO1. A l'âge adulte (8 mois), les souris traitées avec l'androstanol présentent une diminution du nombre de cellules positives pour FOXO1 qui ne semble cependant pas associée d'après nos données préliminaires à une modification de la localisation subcellulaire de FOXO1 dans les spermatogonies.

Il semble que l'inhibition de la signalisation CAR impacte de manière précoce la signalisation de la protéine FOXO1 dans les cellules germinales indifférenciées ce qui pourrait altérer *in fine* la transition des gonocytes en spermatogonies. En effet, les phénotypes observés à P5 et à P10 suggèrent un retard de migration et/ou de différenciation des cellules germinales indifférenciées. Il serait intéressant de réaliser une analyse plus poussée de la cinétique de la progression de ce phénotype, par exemple en analysant la localisation au sein des tubes séminifères des cellules positives pour FOXO1 plus tardivement en période de maturation sexuelle entre P15 et P30. De plus, l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine FOXO1 à P3 au moment de la transition des gonocytes en spermatogonies nous permettrait de comprendre si l'altération de la localisation subcellulaire apparaît en amont et pourrait influencer sur la localisation tubulaire ectopique des cellules germinales, témoignant d'un potentiel retard de migration.

L'hypothèse de l'altération de la transition des gonocytes en spermatogonies pourrait expliquer la présence de cellules germinales indifférenciées ectopiques en période néonatale. D'après la littérature, les gonocytes qui ne migrent pas au cours de la transition sont éliminés par apoptose (Roosen-Runge et Leik 1968), ce qui pourrait être en lien avec la diminution transitoire du nombre de cellules germinales indifférenciées observée chez les souris de 10 jours traitées avec l'androstanol. Cependant, à ce stade nous n'avons pas observé d'augmentation de l'apoptose des cellules germinales au sein des tubes séminifères, ce qui suggère plutôt un retard de migration plutôt qu'un arrêt total de cette dernière. De plus, les données générées *in vitro* indiquent également que le traitement avec l'androstanol n'entraîne pas d'apoptose dans la lignée de spermatogonies indifférenciées C18.4. Par ailleurs, l'androstanol entraîne une diminution de la prolifération des spermatogonies C18.4, associée à une diminution du nombre de cellules adhérentes après 24h de traitement. L'impact de l'inhibition de la signalisation CAR sur la prolifération des spermatogonies C18.4 pourrait donc expliquer la diminution du nombre de cellules germinales observée *in vivo* à P10. Il sera important d'analyser de manière

spécifique la prolifération des spermatogonies en période néonatale (P5 et P10) à l'aide d'un co-immunomarquage de PLZF ou de ID4 et du marqueur de prolifération PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*). Ces données sont à mettre en relation avec les analyses réalisées par qPCR dans les C18.4 qui montrent une diminution de l'accumulation des transcrits du gène *Id4*. Comme décrit dans l'introduction, la protéine ID4 est notamment essentielle à l'auto-renouvellement des cellules germinales souches, ce qui pourrait expliquer dans notre modèle *in vitro*, la diminution de la prolifération cellulaire. De plus, les données préliminaires générées à partir du tri cellulaire de spermatogonies chez les souris de 10 jours suggèrent également une diminution de l'accumulation des transcrits du gène *Id4*, mais également d'autres gènes tels que *Gfra1* et *Plzf*, fondamentaux pour le maintien de l'état indifférencié des spermatogonies et à leur auto-renouvellement. Il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie le transcriptome des spermatogonies triées par *RNAseq* afin de rechercher des altérations de l'expression d'autres gènes essentiels à leur homéostasie (auto-renouvellement, maintien de l'état indifférencié et prolifération).

Les données obtenues *in vitro* dans la lignée de spermatogonies indifférenciées C18.4 montrent que le traitement avec l'androstanol entraîne une diminution de l'expression du gène *Foxo1* et de certains de ses gènes cibles (tels que les gènes *Cdh1*, *Gata2* et *Tex19.1*), appuyant l'hypothèse d'un impact direct de la signalisation CAR sur la signalisation FOXO1 dans les cellules germinales.

Comme déjà présenté dans la discussion du papier 1, de nombreux liens ont déjà été établi entre CAR et FOXO1 témoignant de relations complexes entre ces deux signalisations. Il est notamment connu que les protéines CAR et FOXO1 peuvent interagir directement entre elles dans le noyau des cellules et former un complexe protéique dissocié de la chromatine, ou encore agir comme co-facteurs l'une pour l'autre et participer à la régulation de la transcription de leurs gènes cibles. De plus, l'hétérodimère CAR-RXR peut également se fixer par compétition au niveau des éléments de réponse de FOXO1. Les modulations de la signalisation CAR peuvent également altérer l'activité de FOXO1 de manière plus indirecte. En effet, l'activation de CAR conduit à la phosphorylation de la kinase AKT ce qui réduit la localisation nucléaire et l'activité transcriptionnelle de FOXO1 (Kazantseva, Yarushkin, et Pustyl'nyak 2014), (Yarushkin et al. 2020). L'ensemble de ces données suggère que CAR pourrait altérer la localisation et l'activité de la protéine FOXO1, comme suggéré *in vivo* dans notre étude. Cependant, malgré les données disponibles dans la littérature, les mécanismes par lesquels l'inhibition de la signalisation CAR pourrait altérer l'expression, la localisation et l'activité de

la protéine FOXO1 dans les cellules germinales indifférenciées restent à identifier. Il est donc essentiel de poursuivre les expérimentations sur la lignée germinale C18.4. Nous prévoyons de réaliser des expériences de fractions cellulaires, afin d'étudier les localisations subcellulaires de FOXO1 et de CAR en réponse à l'androstano. De plus, il sera important de réaliser des co-immunoprécipitations de CAR et de FOXO1 pour identifier une potentielle interaction, ainsi que des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine pour analyser la présence de FOXO1 ou de CAR au niveau des régions régulatrices de leurs gènes cibles. En effet, comme discuté dans le papier 1, l'impact de l'androstano sur la localisation de la protéine CAR notamment dans les cellules germinales reste à identifier.

Les analyses par western blot réalisées après 3 heures de traitement avec l'androstano montrent une tendance à l'augmentation de la phosphorylation de FOXO1 au niveau de la sérine 256. Cette donnée suggère que l'inhibition de la signalisation CAR conduit à la phosphorylation de FOXO1, ce qui pourrait entraîner sa translocation ou sa rétention cytoplasmique, ainsi que sa dégradation par le protéasome. En effet, d'après la littérature, l'acétylation et la phosphorylation de FOXO1 (la première amplifiant la deuxième) entraîne sa translocation vers le cytoplasme, son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Matsuzaki et al. 2005), (Huang et Tindall 2011). Il est donc fondamental d'étudier la localisation subcellulaire de FOXO1 dans les spermatogonies, ainsi que son acétylation, son ubiquitination et sa potentielle dégradation par le protéasome. De manière intéressante, *in vivo* en période néonatale, les cellules positives pour FOXO1 (notamment les cellules ectopiques) présentent une diminution du marquage nucléaire de la protéine FOXO1, associée à une augmentation de sa localisation cytoplasmique.

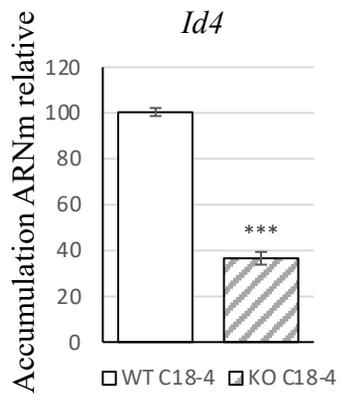
Les résultats obtenus *in vitro* montrent également un impact rapide de l'exposition à l'androstano sur l'acétylation de l'histone H4, ce qui suggère la mobilisation de voies de signalisations intracellulaires cytoplasmiques. Si le rôle de l'acétylation de l'histone H4 dans les spermatogonies indifférenciées demeurent aujourd'hui inconnu, une étude a cependant démontré que les hommes présentant une azoospermie ont une hyperacétylation réduite au niveau de l'histone H4 dans les spermatogonies (Kleiman et al. 2008). L'acétylation de l'histone H4 dans les spermatogonies jouerait donc un rôle pour le déroulement normal de la spermatogenèse. Toutefois, les mécanismes par lesquels l'inhibition de la signalisation CAR régulerait l'acétylation de l'histone H4 demeurent à ce jour inconnus. Les résultats obtenus après la transfection d'un plasmide codant une protéine FOXO1 non phosphorylable et constitutivement nucléaire (FOXO1-3A) dans la lignée C18.4 montrent que les effets médiés

par l'androstanol sont dépendants de la phosphorylation de FOXO1 et donc de sa localisation cytoplasmique. Des expériences de cotransfections, de fractionnement cellulaire et de coimmunoprécipitations de CAR avec FOXO1 et avec l'histone H4 dans les C18.4 permettraient de mieux comprendre les mécanismes moléculaires médiant les impacts du traitement androstanol.

De manière intéressante, nous avons observé des altérations des niveaux d'acétylation de l'histone H4 (ac-H4) au niveau testiculaire à l'âge adulte, démontrées par l'augmentation du nombre de tubes avec des spermatides rondes présentant un marquage pour ac-H4 et la diminution du nombre de tubes avec des spermatides allongées présentant un marquage pour ac-H4. Ces données suggèrent que les altérations initiales au niveau de l'acétylation de l'histone H4, provoquées par l'inhibition de la signalisation CAR dans les spermatogonies indifférenciées, pourraient être maintenues sur le long terme et transmises au cours de la spermatogenèse, ce qui pourrait altérer à l'âge adulte le processus de spermiogenèse. Cette hypothèse est pertinente puisque nous avons identifié une rétention de l'histone H3 chez les spermatozoïdes issus des souris traitées avec l'androstanol, indiquant une altération de la transition histone-protamine au cours du processus de spermiogenèse. Cette donnée témoigne d'une altération de la qualité spermatique et explicite en partie l'hypofertilité des souris traitées avec l'agoniste inverse, puisque l'altération de la transition histone protamine est décrite pour être associée à l'hypofertilité (Oliva et Ballescà 2012), (Yuen et al. 2014). L'ensemble de ces données suggère que l'inhibition de la signalisation CAR impacterait l'homéostasie des spermatogonies indifférenciées sur le long terme altérant *in fine* le processus de spermiogenèse et la fertilité des souris.

Par ailleurs, il est important de commenter que plusieurs des altérations observées *in vivo* en réponse à l'androstanol sont retrouvées de manière similaire chez les souris invalidées pour le gène *Car*. En effet, la désorganisation des spermatogonies (PLZF ou FOXO1 positives) est également présente chez les animaux invalidés pour le gène *Car* et non traités. Si certains phénotypes ainsi que leur cinétique d'apparition semblent similaires entre les animaux *Car*^{-/-} non traités et les animaux sauvages traités avec l'androstanol, en revanche nous avons observé des altérations spécifiques chez les souris sauvages traitées avec l'androstanol. À 5 et à 10 jours, le nombre de cellules ectopiques (ID4 positives, PLZF positives ou FOXO1 positives) semblent relativement similaires entre les souris sauvages traitées avec l'androstanol et les souris invalidées pour le gène *Car* et non traitées. Cependant à 10 jours, les souris sauvages traitées avec l'androstanol présentent une diminution du nombre de cellules germinales qui n'est pas

(A)



(B)

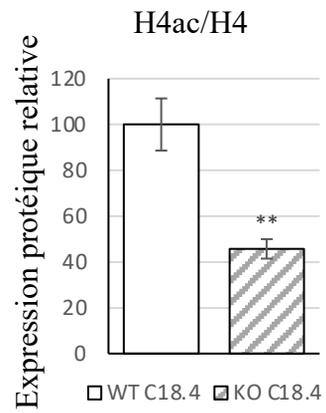


Figure 29 : Altérations WT / KO C18.4

(A) Accumulation relative de l'ARNm du gène *Id4*.

(B) Accumulation relative du ratio protéine H4 acétylée/protéine H4.

Les données du groupe contrôle (WT) ont été fixées arbitrairement à 100.

WT : Wild-type ; KO : Knock out (*Car*^{-/-}).

retrouvée chez les animaux *Car* ^{-/-} non traités. De plus, nous n'avons pas identifié d'augmentation du marquage cytoplasmique de FOXO1 parmi les cellules ectopiques chez les souris *Car* ^{-/-} non traitées à 10 jours, ce qui est le cas chez les souris sauvages traitées avec l'androstanol. Ces différences phénotypiques en période néonatale pourraient participer à expliquer pourquoi les animaux sauvages traités avec l'androstanol ont une fertilité plus altérée que les animaux *Car* ^{-/-}.

In vitro, chez les cellules de la lignée C18.4 sauvages traitées avec l'androstanol ou *Car* ^{-/-}, nous avons également observé dans certains cas des phénotypes similaires. La signalisation FOXO1 et l'expression de certains gènes tels que *Id4* sont également altérées par l'inactivation du gène *Car* dans la lignée germinale C18.4 (**Figure 29 A**), supportant l'hypothèse d'un rôle majeur de CAR pour réguler l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées. De plus, nous avons également identifiés des altérations au niveau de l'acétylation de l'histone H4 à la suite de l'inactivation du gène *Car* dans les C18.4 (**Figure 29 B**).

Ces données ne sont pas surprenantes puisque l'inactivation pharmacologique ou génétique de CAR conduit à une inhibition de sa signalisation. Cependant, les animaux invalidés pour le gène *Car* présentent une altération moins importante de leur fertilité que les animaux sauvages traités avec l'agoniste inverse de CAR, ce qui suggère que l'absence totale de la protéine CAR aurait un impact moins important que l'inhibition transcriptionnelle de sa signalisation par l'androstanol. Ce constat est intéressant et accentue l'importance d'étudier l'activité ainsi que les rôles de la protéine CAR au sein des cellules germinales, de manière basale ainsi qu'en réponse à l'androstanol.

9. Les impacts de l'activation des signalisations CAR et/ou PXR au niveau testiculaire

i. Des effets spécifiques à chaque molécule

Les résultats obtenus sur la lignée germinale C18.4 ont également permis de mettre en lumière un impact direct de l'activation de CAR par le TCPOBOP sur les spermatogonies indifférenciées. L'activation de CAR entraîne une diminution du nombre de cellules adhérentes, pouvant suggérer une augmentation de la mort cellulaire. Cependant, nos données suggèrent que l'activation de la signalisation CAR par le TCPOBOP n'impacte pas le processus apoptotique ni la prolifération de la lignée C18.4. Il est donc fondamental d'analyser l'impact

du traitement TCPOBOP sur d'autres programmes de mort cellulaire tel que l'autophagie notamment par l'analyse en western blot de l'abondance de la protéine LC3/MAP1LC3A (*Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha*). En revanche, les données obtenues *in vivo* montrent, après 10 jours de traitements avec le TCPOBOP, une diminution du nombre de spermatogonies indifférenciées, associée à une augmentation de l'apoptose des cellules germinales. Cet impact sur l'apoptose est transitoire car il n'est pas retrouvé à 8 mois. Il est intéressant de noter qu'à 8 mois les souris présentent une altération quantitative à long terme de la spermatogenèse corrélée à une diminution du nombre de spermatozoïdes produits, n'ayant cependant pas d'impact majeur sur la fertilité des animaux. L'ensemble de ces données suggèrent que l'activation de la signalisation CAR pourrait intervenir dans la régulation de la mort programmée des cellules germinales indifférenciées. Ainsi en période néonatale, l'activation de la signalisation CAR pourrait altérer de manière quantitative l'établissement du pool de cellules germinales souches et impacter la spermatogenèse sur le long terme. Pour aller plus loin dans cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser l'impact du traitement TCPOBOP sur les capacités de recolonisation des spermatogonies. Pour cela, des souris sauvages seraient traitées en période néonatale comme dans notre étude avec le TCPOBOP ou avec un traitement véhicule. Une fois adulte, leurs spermatogonies souches seraient triées et retransplantées dans les tubes séminifères de souris receveuses (des souris sauvages adultes stériles qui n'ont pas de lignée germinale, les souris invalidées pour le gène *Nanos2*, *Nanos2* $-/-$). La capacité et la vitesse des cellules germinales réimplantées à coloniser le testicule receveur permettra d'étudier l'impact de l'activation de la signalisation CAR sur le maintien des capacités souches des spermatogonies. L'analyse par RNAseq du transcriptome des spermatogonies triées après le traitement avec le TCPOBOP nous permettrait également de comprendre l'impact de l'activation de CAR sur l'homéostasie des cellules germinales souches. Par exemple, il serait intéressant de rechercher des altérations de l'expression de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement des spermatogonies souches tels que *Id4*, *Gfra1* et *Plzf* ou de gènes impliqués dans des processus de mort cellulaires des cellules germinales, notamment l'autophagie tel que *Lc3*.

Nos résultats indiquent que PXR serait impliqué dans la production de testostérone au sein des cellules de Leydig, comme le suggère l'augmentation des taux de testostérone observée en culture cellulaire en réponse au traitement PCN dans la lignée murine de Leydig MLTC1. Cette augmentation des niveaux de testostérone n'est cependant pas associée à un impact sur l'expression des gènes codant les enzymes de la stéroïdogénèse, ce qui pourrait suggérer une

augmentation de la mobilisation du cholestérol, précurseur des hormones stéroïdes. En effet, il a été démontré que certains médicaments, activateurs de la voie de signalisation PXR, augmente le taux de cholestérol plasmatique (Karpale, Hukkanen, et Hakkola 2022). Lors de traitements plus longs avec le PCN, une diminution de l'expression de certains gènes codant des enzymes de la stéroïdogénèse (tel que le gène *Star*) a été observée dans les MLTC1. Ces données suggèrent une boucle classique de rétrocontrôle négatif sur ces gènes, en réponse à l'augmentation des niveaux de testostérone. Cette hypothèse est appuyée par les données obtenues *in vivo* qui révèlent initialement (à 10 jours postnataux) une tendance à l'augmentation des niveaux de testostérone chez les souris traitées avec le PCN, suivie par une diminution à l'âge adulte (8 mois). Il serait également intéressant d'analyser l'implication du gène *Shp* (*small heterodimer partner*), un gène cible de PXR, dans l'altération de la stéroïdogénèse observée à l'âge adulte. En effet, le gène *Shp* est impliqué dans la régulation de la production de testostérone au sein des cellules de Leydig (Volle et al. 2007), (Volle et al. 2009). Le traitement PCN pourrait entraîner l'augmentation de l'expression du gène *Shp* qui serait à l'origine du rétrocontrôle négatif sur les niveaux de testostérone.

De plus, même si le récepteur PXR n'est pas exprimé dans les spermatogonies, il semble que l'activation de sa signalisation entraîne une augmentation de l'apoptose des cellules germinales chez les souris de 10 jours et de 8 mois, toutefois sans impact significatif sur la production spermatique. La diminution des taux de testostérone à 8 mois chez les souris traitées avec le PCN pourrait être en lien avec l'augmentation de l'apoptose des cellules germinales observée, cependant à 10 jours, ces deux paramètres ne peuvent être mis en relation puisque le taux de testostérone intra-testiculaire est plus important que celui des souris du groupe contrôle. Il serait donc intéressant d'analyser, notamment grâce à la co-culture de la lignée germinale C18.4 (sauvage ou invalidée pour *Car*) avec la lignée leydigienne MLTC1 (sauvage, invalidée pour *Car* ou pour *Pxr*) l'impact du traitement PCN sur l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées.

Nos résultats montrent *in fine* que les expositions néonatales au TCPOBOP ou au PCN seuls n'altèrent pas les capacités de reproduction des souris à l'âge adulte, mais que les signalisations CAR et PXR interviennent dans des processus différents aboutissant à des altérations de l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées.

ii. Des effets parfois additifs ou synergiques de la co-exposition

	TCPOBOP	PCN	TCPOBOP + PCN
<u>Test de fertilité</u>	=	 Mort <i>in utero</i>	 Mort <i>in utero</i> - Fécondations + Mâles stériles
<u>Comptage des spermatozoïdes</u>	- 	=	- 
<u>Histologie testiculaire adulte</u>	-  -gonies PLZF+ -  -cytes SYCP3+ -  Tubes H4ac+	=	-  -gonies PLZF+ -  -cytes SYCP3+ -  Tubes H4ac+
<u>Apoptose adulte</u>	=	+	+
<u>Testostérone IT adulte</u>	=	-	-
<u>Histologie testiculaire jeune</u>	-  -gonies ID4+ -  -gonies PLZF+	-  -gonies ID4+ -  -gonies PLZF+	-  -gonies ID4+ -  -gonies PLZF+
<u>Apoptose jeune</u>	+	+	+
<u>Testostérone IT jeune</u>	=	+	-

Figure 30 : Figure récapitulative des phénotypes observés chez les souris sauvages traitées avec le PCN et/ou TCPOBOP.

= : phénotype similaire aux souris du groupe véhicule ; -gonies : spermatogonies ; -cytes : spermatocytes.

Le traitement néonatal combiné des souris avec les molécules TCPOBOP et PCN nous a permis d'identifier une interaction entre les voies de signalisation CAR et PXR qui entraînent des effets délétères additifs ou synergiques sur certains paramètres testiculaires.

Pour rappel, l'activation néonatale « simple » de CAR par le TCPOBOP entraîne une altération quantitative à long terme de la spermatogenèse associée à une diminution du nombre de spermatozoïdes, qui n'impacte pas la fertilité des animaux. L'activation néonatale « simple » de PXR par le PCN entraîne une altération de la stéroïdogénèse ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des cellules germinales sur le long terme, sans impact majeur sur la spermatogenèse ni sur la fertilité des souris. En revanche, la fertilité des animaux doublement exposés avec le TCPOBOP et le PCN est altérée à l'âge adulte (8 mois), témoignant d'un impact additif des modulations néonatales des voies de signalisations CAR et PXR sur la fonction de reproduction. En effet, nous avons observé une augmentation du nombre de mâles stériles. De plus, les animaux demeurants fertiles présentent une diminution du nombre de petits par portée, associée à une diminution du nombre de spermatozoïdes ainsi qu'à une augmentation de la mort *in utero*. Ces données suggèrent que la co-activation néonatale des voies CAR et PXR altèrent de manière quantitative et qualitative la production spermatique.

Il faut noter que les animaux doublement exposés présentent à l'âge adulte (8 mois) une augmentation du nombre de cellules germinales apoptotiques, associée à une forte diminution de la testostérone intra-testiculaire avec des tendances qui semblent relativement équivalentes à celles observées dans le groupe PCN à l'âge adulte (**Figure 30**). De plus, les souris traitées avec les 2 molécules agonistes présentent une altération à long terme de la spermatogenèse équivalente à celle observée chez les souris traitées avec le TCPOBOP à l'âge adulte (**Figure 30**). Il semble donc que le traitement combiné avec les molécules PCN et TCPOBOP altère la fertilité *via* l'additivité des impacts provoqués.

Le co-traitement entraîne également des conséquences précoces sur la physiologie testiculaire qui ne sont pas forcément additives, puisque nous avons notamment observé à 10 jours une augmentation de l'apoptose des cellules germinales (équivalente à celle observée dans les groupes PCN ou TCPOBOP) (**Figure 30**). De plus, de manière intéressante, la coactivation néonatale des voies CAR et PXR a un effet synergique sur la stéroïdogénèse puisqu'elle semble médier une diminution des niveaux de testostérone intra-testiculaire à 10 jours. Ces données sont surprenantes, puisque comme décrit précédemment, le traitement néonatal avec le TCPOBOP ne semble pas avoir d'impact sur la stéroïdogénèse, alors que le traitement néonatal

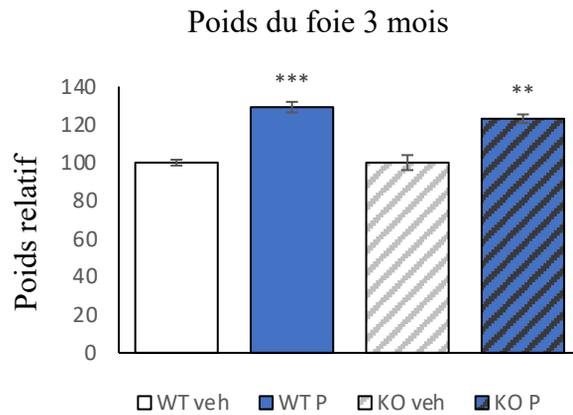


Figure 31 : Analyse de la physiologie hépatique à l'âge adulte

Masse relative hépatique à 10 jours. Le traitement avec le PCN entraîne une augmentation de la masse relative du foie chez les animaux sauvages et invalidés pour le gène *Car*^{-/-}

Les données des groupes contrôles (veh) ont été fixées arbitrairement à 100.

avec le PCN entraîne plutôt l'augmentation des niveaux de testostérone intra-testiculaire à 10 jours (**Figure 31**). Ces données indiquent que l'activation néonatale combinée de CAR et de PXR conduit à une altération de la stéroïdogénèse, différente de celle observée par l'activation « simple » de la signalisation PXR. Il est possible que la signalisation CAR interagissent avec la signalisation PXR, altérant de manière considérable la stéroïdogénèse. Nous envisageons notamment pour expliquer cette observation que l'activation de CAR par le TCPOBOP antagoniserait l'activité de PXR dans les cellules de Leydig : l'activation « simple » de PXR stimule la production de testostérone dans les cellules de Leydig, mais l'activation combinée de CAR réprimerait cet effet et aurait même des conséquences inverses. Une étude a récemment démontré que CAR et PXR peuvent interagir directement entre eux, entraînant une inhibition mutuelle de leur signalisation (Bwayi et al. 2022). Il est également possible que l'interaction entre ces deux voies modifie la disponibilité des co-activateurs de PXR (notamment de SRC1 qui est un coactivateur commun de CAR et de PXR), ou bien la disponibilité de leur partenaire commun d'hétérodimérisation le récepteur RXR. De manière intéressante, une étude a montré chez le cochon que l'activation de CAR ou de PXR entraîne une diminution de la stéroïdogénèse. D'autres études ont démontré que l'activation de PXR par le PCN augmenterait la 6 β -hydroxylation de la testostérone, une réaction normalement minoritaire du catabolisme de la testostérone, grâce à l'augmentation de l'expression des gènes codant les cytochrome P450 CYP3A4, (Gonzalez, Song, et Hardwick 1986) et CYP3A25 (C. Y. Li et al. 2016), (D. Dai et al. 2001). Le gène *Car* participe également à la régulation du gène *Cyp3a4* (L. Huang et al. 2011), la possibilité que la co-activation des voies CAR et PXR augmente fortement l'expression du cytochrome CYP3A4 et entraîne un fort catabolisme de la testostérone est donc à envisager. L'ensemble de nos résultats rend plus complexe la compréhension de la régulation de l'homéostasie des cellules germinales et de la production de testostérone intra-testiculaire par les récepteurs CAR et PXR.

Pour mieux comprendre les impacts des signalisations CAR et PXR sur la physiologie du testicule, il est essentiel de poursuivre les expérimentations *in vitro* sur les cellules de Leydig MLTC1, sur les spermatogonies indifférenciées C18.4 et sur la co-culture de ces lignées. Afin d'étudier les conséquences moléculaires des traitements avec le TCPOBOP et/ou avec le PCN, il faudrait notamment réaliser des analyses par *single cell RNAseq* des testicules pour préciser les gènes dont l'expression est dérégulée dans les cellules germinales indifférenciées et dans les cellules de Leydig, pour étudier l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la stéroïdogène et dans l'homéostasie des spermatogonies et leurs interconnexions.

C. Les effets de la signalisation PXR au niveau testiculaire sont-ils dépendants de l'activité de la signalisation CAR ?

Nos données ont montré que l'inactivation totale du gène *Car* est suffisante pour contrecarrer les effets de la double exposition néonatale sur le nombre de spermatozoïdes, sur le nombre de petits par portée et sur la mort *in utero*, sur le nombre de mâles stériles et *in fine* sur la fertilité. L'inactivation du gène *Car* permet également d'inhiber les impacts des traitements avec le TCPOBOP, mais aussi de ceux observés avec le PCN (et du co-traitement) sur l'apoptose des cellules germinales à 10 jours et à l'âge adulte. Nos données montrent également que les souris invalidées pour le gène *Car* traitées avec le PCN ou co-traitées avec le PCN et le TCPOBOP ne présentent plus d'altérations des taux de testostérone intra-testiculaire en période néonatale et à l'âge adulte. Ces données suggèrent que les effets délétères médiés par l'activation de la voie de signalisation PXR sur les cellules germinales et sur la fonction de reproduction sont dépendants de la signalisation CAR.

Il faut cependant noter que seuls certains impacts de l'activation de PXR semblent être contrecarrés au niveau testiculaire par l'inactivation du gène *Car*. En effet, nous avons observé une augmentation de la masse du foie après 10 jours de traitements avec le PCN chez les souris sauvages ainsi que chez les souris invalidées pour le gène *Car* (**Figure 31**), ce qui suggère une signalisation particulière de PXR et de CAR au niveau testiculaire. Au niveau testiculaire, nous ne pouvons pas exclure que PXR pourrait réguler l'expression du gène *Car*, même si de telles données n'ont pas été démontré dans la littérature à l'heure actuelle. Dans ce cas de figure, l'activation de la voie de signalisation PXR par le PCN pourrait moduler la signalisation CAR dans les cellules de Leydig, entraînant par exemple une diminution de la synthèse de testostérone intra-testiculaire. Cependant, l'activation de CAR par le TCPOBOP n'a pas d'impact majeur sur la production de testostérone, et l'utilisation de l'androstanol entraîne des conséquences sur la stéroïdogénèse qui semble indépendantes du gène *Car*. L'activation de PXR pourrait donc plutôt impacter l'homéostasie des spermatogonies *via* des dialogues entre les types cellulaires testiculaires (puisque PXR n'est pas exprimé dans la lignée germinale indifférenciée). Il semble que les processus régulés par PXR dans le testicule se répercuteraient dans les cellules germinales en mobilisant au sein de ces cellules la signalisation CAR. En absence du gène *Car*, la molécule PCN activerait la signalisation PXR qui aurait cependant des impacts différents que ceux observés chez les souris sauvages au niveau testiculaire.

Pour étudier si l'ensemble des impacts testiculaires de la signalisation PXR sont dépendants de l'activité de CAR dans le testicule, nous souhaitons tout d'abord approfondir l'analyse des phénotypes testiculaires des souris invalidées pour le gène *Car* et traitées au PCN ou co-exposée, notamment pour identifier l'impact des traitements sur le nombre de cellules germinales. En effet, le traitement PCN et la co-exposition entraîne notamment chez les souris sauvages une diminution du nombre de cellules germinales positives pour ID4, PLZF ou pour SYCP3. De plus, nous envisageons plusieurs expériences. Il serait intéressant de co-traiter des souris sauvages en période néonatale avec l'androstanol et avec le PCN pour étudier l'impact de ces modulations sur la physiologie testiculaire et mieux comprendre l'interaction entre les voies de signalisation CAR et PXR. L'utilisation d'animaux spécifiquement invalidés pour le gène *Car* dans la lignée germinale ou dans les cellules de Leydig est également essentielle. De plus, l'exposition de co-culture de cellules germinales et de cellules de Leydig aux différents traitements, combinée à l'inactivation spécifique du gène *Car* ou de *Pxr* dans l'un ou l'autre des types cellulaires est ici fondamentale pour comprendre si CAR peut médier les impacts de l'activation de PXR sur la lignée germinale. Comme décrit précédemment, il est connu que CAR et PXR peuvent interagir directement entre eux, modulant mutuellement leur signalisation (Bwayi et al. 2022), qu'ils partagent des co-facteurs communs et qu'ils possèdent le même partenaire d'hétérodimérisation (RXR). Aussi, des expériences de co-immunoprécipitations (avec CAR, PXR, RXR et leurs co-facteurs) dans la lignée cellulaire MLTC1 en réponse au traitement PCN nous permettraient d'étudier une potentielle interaction entre leurs voies de signalisation.

D. Les modulations précoces et néonatales des signalisations CAR et/ou PXR entraînent des conséquences qui semblent irréversibles

Nos données montrent que les modulations néonatales des voies de signalisation CAR et PXR chez la souris entraîne à l'âge adulte une altération de la fertilité. S'il est établi que la période néonatale est une fenêtre développementale particulièrement sensible à l'exposition des xénobiotiques, comment pouvons-nous expliquer le maintien de ces altérations à l'âge adulte ?

Depuis plusieurs décennies, il est connu que l'exposition néonatale à des xénobiotiques peut altérer sur le long terme l'expression de certains cytochromes, qui sont essentiellement régulés par CAR et PXR (Zangar, Springer, et Buhler 1993). Il a également été démontré que l'exposition néonatale au TCPOBOP ou au PCN entraîne des altérations épigénétiques qui seront maintenues au cours du vieillissement, et qui altèrent de manière permanente l'expression

des gènes. En effet, le TCPOBOP altère l'expression hépatique de *Cyp2b10* via des modifications épigénétiques des marques histones : augmentation de la mono-, de la di- et de la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 et diminution de la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 sur le promoteur du gène *Cyp210* (W.-D. Chen et al. 2012). Des données similaires ont été démontrées à la suite d'une exposition néonatale au PCN, qui entraîne à l'âge adulte des altérations à long terme dans l'expression de gènes tel que *Cyp3a1*. L'augmentation de la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 et la diminution de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 sur le promoteur du gène *Cyp3a1* ont été corrélées à ces altérations (Wang et al. 2019). Une étude a également montré que l'activation néonatale des voies de signalisation CAR ou PXR entraîne une dérégulation à long terme de l'expression des gènes de la sous famille *Cyp4a* via la réduction de l'interaction du facteur de transcription PPAR α au niveau des loci des gènes *Cyp4a* (C. Y. Li et al. 2016). La co-activation des voies CAR et PXR pourrait alors modifier de manière plus importante l'expression des gènes sur le long terme.

Les données de la littérature révèlent que l'activation des signalisations CAR et/ou PXR peut entraîner des conséquences irréversibles sur l'expression des gènes notamment via des modifications épigénétiques altérant l'homéostasie des cellules impactées, comme suggéré dans notre étude. Les mécanismes impliqués dans le maintien de ces altérations restent à identifier. Toutefois, il est possible que la mise en place d'empreintes épigénétiques, telles que la méthylation d'ADN, la méthylation des histones et/ou les petits ARNs, notamment au niveau des régions régulatrices de l'expression des gènes soient impliquées. Ces modifications conduiraient à une modulation permanente des niveaux d'ARNm, comme cela a été suggéré par de nombreuses études sur les impacts des expositions *in utero*/néonatales aux perturbateurs endocriniens (Predieri, Alves, et Iughetti 2022).

Il est important de rappeler que certaines de nos données nous ont permis d'identifier le maintien de certaines altérations sur le long terme, évoquant un lien potentiel entre les altérations initiales de l'homéostasie des spermatogonies et l'infertilité à l'âge adulte. Cependant, ces données doivent être approfondies, il est donc fondamental d'étudier l'impact des traitements sur la mise en place des marques épigénétiques dans les régions régulatrices impliquées dans l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie des cellules germinales et de la stéroïdogenèse. Il est également essentiel d'identifier les causes des altérations de la qualité spermatique (suggérée par l'augmentation de la mort *in utero* des petits à la suite du traitement avec l'androstanoil et de la double exposition des souris mâles). Des expériences pour approfondir l'altération de l'homéostasie des spermatogonies (via des approches de RNAseq

ou des analyses omiques des marques épigénétiques (ChIP-seq)) et des spermatozoïdes (*via* des analyses morphologiques, des analyses approfondies de la transition histones-protamines par western blot ou par coloration à la chromomycine A3, et des analyses de marques épigénétiques par exemple par *Reduced representation bisulfite sequencing* (RRBS)) nous permettraient de comprendre les causes des altérations de la fertilité, observées à la suite du traitement avec l'androstanol ou à la suite de la co-exposition.

E. Conclusion

Plusieurs études ont déjà démontré que les expositions aux xénobiotiques peuvent être délétères pour la santé de manière générale et pour la fertilité. Il est notamment bien établi aujourd'hui que l'exposition à des molécules environnementales polluantes pendant des fenêtres développementales sensibles, comme la période périnatale, peut causer des altérations à long terme de la physiologie testiculaire et prédisposer à l'infertilité.

Notre étude a permis d'identifier pour la première fois chez la souris un impact de la modulation néonatale pharmacologique de la signalisation CAR sur la fertilité. Nous avons également montré que la modulation néonatale combinée des signalisations CAR et PXR augmente le risque d'infertilité chez la souris, médié par des altérations diverses dont les mécanismes moléculaires restent à approfondir.

Nos données ont été générées à l'aide de molécules synthétiques pharmacologiques (le TCPOBOP et le PCN) ou naturelle (l'androstanol) modulant spécifiquement les signalisations murines CAR et PXR. Celles-ci posent les bases pour de futures études. En effet, il serait intéressant d'étudier l'impact sur la fertilité des souris de l'exposition à un ou plusieurs xénobiotiques présents dans l'environnement et modulateurs des signalisations murines CAR et/ou PXR. De plus, il est également essentiel d'évaluer les risques de la modulation de ces signalisations chez l'homme, d'une part puisque les isoformes humaines de CAR et de PXR n'interviennent pas dans la régulation des mêmes gènes que les formes murines, et d'autre part car les isoformes murines et humaines ne sont pas forcément modulées par les mêmes xénobiotiques (*cf. figure 19* dans l'introduction). Pour étudier cela, il serait possible d'utiliser et d'exposer plusieurs modèles :

- La culture d'explants testiculaires humains
- La culture *in vitro* de lignées testiculaires humaines
- L'utilisation de souris humanisées pour les gènes *Car* et/ou *Pxr*

Aussi, l'exposition de ces modèles à une ou plusieurs molécules identifiées chez l'homme, par exemple au niveau plasmatique ou urinaire grâce à des études épidémiologiques, serait pertinente pour évaluer leurs impacts sur la fertilité.

Nos données novatrices font la lumière sur l'implication potentielle des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans la survenue des troubles de la fertilité alors que la plupart des études environnementales s'intéressent aux impacts des perturbateurs endocriniens sur la fonction de reproduction (chez le rongeur comme chez l'Homme). Ces études sont donc essentiellement focalisées sur les conséquences de l'exposition aux molécules environnementales qui affectent les récepteurs hormonaux et leurs signalisations. Or, le nombre et la diversité de polluants relargués dans la nature sont colossales et continuent de s'accroître, menaçant les écosystèmes en raison de leur persistance dans l'environnement. Il est donc incontestable que les xénobiotiques peuvent altérer de nombreuses signalisations associées à des récepteurs qui n'ont pas uniquement une signalisation endocrinienne, et entraîner ainsi des conséquences sur la santé.

Notre étude souligne donc aujourd'hui l'importance d'étudier l'impact des perturbateurs environnementaux sur les récepteurs dans leur ensemble. Chez l'Homme, 49 récepteurs nucléaires et une multitude de récepteurs membranaires ont été identifiés. La Communauté européenne et l'Agence américaine de protection de l'environnement évaluent le nombre de molécules chimiques différentes produites entre 80 000 et 100 000. Le crible des impacts de ces molécules sur les différents récepteurs nucléaires et membranaires est donc un défi colossal pour la communauté scientifique, mais nécessaire pour la régulation de la mise sur le marché de molécules potentiellement toxiques et donc pour la protection des écosystèmes. En effet, selon une étude nous aurions franchi un seuil critique de production chimique qui risque d'entraîner des répercussions durables sur le vivant (Persson et al. 2022). La production de plastique aurait notamment augmenté de 80 % entre 2000 et 2015. Les molécules chimiques de nos produits industriels, agricoles et pharmaceutiques se diffusent dans les sols, l'eau et les organismes avec un effet cumulatif que nous ne maîtrisons plus. Avec la vitesse à laquelle ces produits chimiques apparaissent dans l'environnement, les organismes vivants sont exposés à une multitude de molécules xénobiotiques, il est donc également impératif de prendre en compte les impacts d'une exposition combinée à plusieurs polluants, aussi appelé effet cocktail. En effet comme suggéré dans notre étude, l'impact d'une molécule chimique peut être modifié voire amplifié par l'interaction avec une autre molécule, ajoutant encore de la complexité au travail d'identification des risques environnementaux pour la santé. Nos résultats permettront

peut-être d'aiguiller les instances décisionnaires pour évaluer les risques liés aux molécules xénobiotiques, et agir en conséquence.

Références bibliographiques

- « A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse - PubMed ». s. d. Consulté le 22 mai 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7298230/>.
- Agarwal, Ashok, Saradha Baskaran, Neel Parekh, Chak-Lam Cho, Ralf Henkel, Sarah Vij, Mohamed Arafa, Manesh Kumar Panner Selvam, et Rupin Shah. 2021. « Male Infertility ». *Lancet (London, England)* 397 (10271): 319-33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2).
- Aghajanzpour-Mir, Seyed Mohsen, Ebrahim Zabihi, Haleh Akhavan-Niaki, Elahe Keyhani, Iman Bagherizadeh, Sajjad Biglari, et Farkhondeh Behjati. 2016. « The Genotoxic and Cytotoxic Effects of Bisphenol-A (BPA) in MCF-7 Cell Line and Amniocytes ». *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 5 (1): 19-29.
- Almeida, Susana, Luis Rato, Mario Sousa, Marco G. Alves, et Pedro F. Oliveira. 2017. « Fertility and Sperm Quality in the Aging Male ». *Current Pharmaceutical Design* 23 (30): 4429-37. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170503150313>.
- Anderson, Ericka L., Andrew E. Baltus, Hermien L. Roepers-Gajadien, Terry J. Hassold, Dirk G. de Rooij, Ans M. M. van Pelt, et David C. Page. 2008. « Stra8 and Its Inducer, Retinoic Acid, Regulate Meiotic Initiation in Both Spermatogenesis and Oogenesis in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (39): 14976-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807297105>.
- Arai, Tamaki, Fumi Kano, et Masayuki Murata. 2015. « Translocation of Forkhead Box O1 to the Nuclear Periphery Induces Histone Modifications That Regulate Transcriptional Repression of PCK1 in HepG2 Cells ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 20 (4): 340-57. <https://doi.org/10.1111/gtc.12226>.
- Auerbach, Scott S., Richard Ramsden, Matthew A. Stoner, Christophe Verlinde, Christopher Hassett, et Curtis J. Omiecinski. 2003. « Alternatively Spliced Isoforms of the Human Constitutive Androstane Receptor ». *Nucleic Acids Research* 31 (12): 3194-3207.
- Avilion, Ariel A., Silvia K. Nicolis, Larysa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, et Robin Lovell-Badge. 2003. « Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function ». *Genes & Development* 17 (1): 126-40. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>.
- Axelstad, M., U. Hass, M. Scholze, S. Christiansen, A. Kortenkamp, et J. Boberg. 2018. « EDC IMPACT: Reduced Sperm Counts in Rats Exposed to Human Relevant Mixtures of Endocrine Disruptors ». *Endocrine Connections* 7 (1): 139-48. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0307>.
- Baes, M., T. Gulick, H. S. Choi, M. G. Martinoli, D. Simha, et D. D. Moore. 1994. « A New Orphan Member of the Nuclear Hormone Receptor Superfamily That Interacts with a Subset of Retinoic Acid Response Elements ». *Molecular and Cellular Biology* 14 (3): 1544-52.
- Bao, Jianqiang, et Mark T. Bedford. 2016. « Epigenetic Regulation of the Histone-to-Protamine Transition during Spermiogenesis ». *Reproduction (Cambridge, England)* 151 (5): R55-70. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0562>.
- Baptissart, Marine, Lauriane Sèdes, Hélène Holota, Laura Thirouard, Emmanuelle Martinot, Angélique de Haze, Betty Rouaisnel, Françoise Caira, Claude Beaudoin, et David H. Volle. 2018. « Multigenerational Impacts of Bile Exposure Are Mediated by TGR5 Signaling Pathways ». *Scientific Reports* 8 (1): 16875. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34863-0>.
- Baptissart, Marine, Aurélie Vega, Emmanuelle Martinot, Aurélien J. Pommier, Sander M. Houten, Geoffroy Marceau, Angélique de Haze, et al. 2014. « Bile Acids Alter Male Fertility through G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1 Signaling Pathways in

- Mice ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 60 (3): 1054-65. <https://doi.org/10.1002/hep.27204>.
- Barbagallo, Federica, Rosita A. Condorelli, Laura M. Mongioì, Rossella Cannarella, Laura Cimino, Maria Cristina Magagnini, Andrea Crafa, Sandro La Vignera, et Aldo E. Calogero. 2021. « Molecular Mechanisms Underlying the Relationship between Obesity and Male Infertility ». *Metabolites* 11 (12): 840. <https://doi.org/10.3390/metabo11120840>.
- Barral, Sophie, Yuichi Morozumi, Hiroki Tanaka, Emilie Montellier, Jérôme Govin, Maud de Dieuleveult, Guillaume Charbonnier, et al. 2017. « Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells ». *Molecular Cell* 66 (1): 89-101.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.025>.
- Barros, Aline L. de, Julie H. Bae, Cibele S. Borges, Josiane L. Rosa, Marília M. Cavariani, Patrícia V. Silva, Patricia F. F. Pinheiro, Janete A. Anselmo-Franci, et Arielle C. Arena. 2017. « Perinatal Exposure to Insecticide Fipronil: Effects on the Reproductive System in Male Rats ». *Reproduction, Fertility, and Development* 29 (6): 1130-43. <https://doi.org/10.1071/RD15517>.
- Bedford, J. M. 1970. « Sperm Capacitation and Fertilization in Mammals ». *Biology of Reproduction* 2 (juin): Suppl 2:128-158.
- Bellastella, Giuseppe, Davide Menafrà, Giulia Puliani, Annamaria Colao, Silvia Savastano, et Obesity Programs of nutrition, Education, Research and Assessment (OPERA) Group. 2019. « How Much Does Obesity Affect the Male Reproductive Function? » *International Journal of Obesity Supplements* 9 (1): 50-64. <https://doi.org/10.1038/s41367-019-0008-2>.
- Bernal-Mizrachi, Carlos, Sherry Weng, Chu Feng, Brian N. Finck, Russell H. Knutsen, Teresa C. Leone, Trey Coleman, Robert P. Mecham, Daniel P. Kelly, et Clay F. Semenkovich. 2003. « Dexamethasone Induction of Hypertension and Diabetes Is PPAR-Alpha Dependent in LDL Receptor-Null Mice ». *Nature Medicine* 9 (8): 1069-75. <https://doi.org/10.1038/nm898>.
- Besmer, P., K. Manova, R. Duttlinger, E. J. Huang, A. Packer, C. Gyssler, et R. F. Bachvarova. 1993. « The Kit-Ligand (Steel Factor) and Its Receptor c-Kit/W: Pleiotropic Roles in Gametogenesis and Melanogenesis ». *Development (Cambridge, England). Supplement*, 125-37.
- Bhang, Dong Ha, Bang-Jin Kim, Byung Gak Kim, Keri Schadler, Kwan-Hyuck Baek, Yong Hee Kim, Wayland Hsiao, et al. 2018. « Testicular Endothelial Cells Are a Critical Population in the Germline Stem Cell Niche ». *Nature Communications* 9 (1): 4379. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06881-z>.
- Bhattacharya, Indrashis, et Souvik Dey. 2022. « Emerging Concepts on Leydig Cell Development in Fetal and Adult Testis ». *Frontiers in Endocrinology* 13: 1086276. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1086276>.
- Bisconti, Marie, Jean-François Simon, Sarah Grassi, Baptiste Leroy, Baptiste Martinet, Vanessa Arcolia, Vladimir Isachenko, et Elise Hennebert. 2021. « Influence of Risk Factors for Male Infertility on Sperm Protein Composition ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (23): 13164. <https://doi.org/10.3390/ijms222313164>.
- Blanco-Rodríguez, J., C. Martínez-García, et A. Porras. 2003. « Correlation between DNA Synthesis in the Second, Third and Fourth Generations of Spermatogonia and the Occurrence of Apoptosis in Both Spermatogonia and Spermatoocytes ». *Reproduction (Cambridge, England)* 126 (5): 661-68. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260661>.
- Boivin, Jacky, Laura Bunting, John A. Collins, et Karl G. Nygren. 2007. « International Estimates of Infertility Prevalence and Treatment-Seeking: Potential Need and Demand

- for Infertility Medical Care ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 22 (6): 1506-12. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem046>.
- Borch, Julie, Stine Broeng Metzdorff, Anne Marie Vinggaard, Leon Brokken, et Majken Dalgaard. 2006. « Mechanisms Underlying the Anti-Androgenic Effects of Diethylhexyl Phthalate in Fetal Rat Testis ». *Toxicology* 223 (1-2): 144-55. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.03.015>.
- Borges, Edson, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, Rodrigo R. Provenza, Rita de Cassia Savio Figueira, Assumpto Iaconelli, et Amanda Souza Setti. 2018. « Paternal Lifestyle Factors in Relation to Semen Quality and in Vitro Reproductive Outcomes ». *Andrologia* 50 (9): e13090. <https://doi.org/10.1111/and.13090>.
- Bornheim, L. M. 1998. « Effect of Cytochrome P450 Inducers on Cocaine-Mediated Hepatotoxicity ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 150 (1): 158-65. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8403>.
- Bowles, Josephine, Deon Knight, Christopher Smith, Dagmar Wilhelm, Joy Richman, Satoru Mamiya, Kenta Yashiro, et al. 2006. « Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5773): 596-600. <https://doi.org/10.1126/science.1125691>.
- Braun, Joseph M., Carmen Messerlian, et Russ Hauser. 2017. « Fathers Matter: Why It's Time to Consider the Impact of Paternal Environmental Exposures on Children's Health ». *Current epidemiology reports* 4 (1): 46-55. <https://doi.org/10.1007/s40471-017-0098-8>.
- Breuker, Cyril, Amélie Moreau, Laila Lakhali, Viola Tamasi, Yannick Parmentier, Urs Meyer, Patrick Maurel, Serge Lumbroso, Marie-José Vilarem, et Jean-Marc Pascussi. 2010. « Hepatic Expression of Thyroid Hormone-Responsive Spot 14 Protein Is Regulated by Constitutive Androstane Receptor (NR1I3) ». *Endocrinology* 151 (4): 1653-61. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1435>.
- Brinster, R. L., et M. R. Avarbock. 1994. « Germline Transmission of Donor Haplotype Following Spermatogonial Transplantation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (24): 11303-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11303>.
- Brinster, R. L., et J. W. Zimmermann. 1994. « Spermatogenesis Following Male Germ-Cell Transplantation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (24): 11298-302. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11298>.
- Brunet, Anne, Lora B. Sweeney, J. Fitzhugh Sturgill, Katrin F. Chua, Paul L. Greer, Yingxi Lin, Hien Tran, et al. 2004. « Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5666): 2011-15. <https://doi.org/10.1126/science.1094637>.
- Buaas, F. William, Jennifer R. Gardiner, Sally Clayton, Pierre Val, et Amanda Swain. 2012. « In Vivo Evidence for the Crucial Role of SF1 in Steroid-Producing Cells of the Testis, Ovary and Adrenal Gland ». *Development (Cambridge, England)* 139 (24): 4561-70. <https://doi.org/10.1242/dev.087247>.
- Buaas, F. William, Andrew L. Kirsh, Manju Sharma, Derek J. McLean, Jamie L. Morris, Michael D. Griswold, Dirk G. de Rooij, et Robert E. Braun. 2004. « Plzf Is Required in Adult Male Germ Cells for Stem Cell Self-Renewal ». *Nature Genetics* 36 (6): 647-52. <https://doi.org/10.1038/ng1366>.
- Bucci, L. R., et M. L. Meistrich. 1987. « Effects of Busulfan on Murine Spermatogenesis: Cytotoxicity, Sterility, Sperm Abnormalities, and Dominant Lethal Mutations ». *Mutation Research* 176 (2): 259-68. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(87\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(87)90057-1).
- Buñay, Julio, Eduardo Larriba, Daniel Patiño-García, Leonor Cruz-Fernandes, Sergio Castañeda-Zegarra, María Rodríguez-Fernández, Jesús del Mazo, et Ricardo D Moreno.

2018. « Editor's Highlight: Differential Effects of Exposure to Single Versus a Mixture of Endocrine-Disrupting Chemicals on Steroidogenesis Pathway in Mouse Testes ». *Toxicological Sciences* 161 (1): 76-86. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx200>.
- Bundhun, Pravesh Kumar, Girish Janoo, Akash Bhurtu, Abhishek Rishikesh Teeluck, Mohammad Zafooruddin Sani Soogund, Manish Pursun, et Feng Huang. 2019. « Tobacco Smoking and Semen Quality in Infertile Males: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *BMC Public Health* 19 (1): 36. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-6319-3>.
- Busada, Jonathan T., Vesna A. Chappell, Bryan A. Niedenberger, Evelyn P. Kaye, Brett D. Keiper, Cathryn A. Hogarth, et Christopher B. Geyer. 2015. « Retinoic Acid Regulates Kit Translation during Spermatogonial Differentiation in the Mouse ». *Developmental Biology* 397 (1): 140-49. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.10.020>.
- Bwayi, Monicah N., Efren Garcia-Maldonado, Sergio C. Chai, Boer Xie, Shirish Chodankar, Andrew D. Huber, Jing Wu, et al. 2022. « Molecular Basis of Crosstalk in Nuclear Receptors: Heterodimerization between PXR and CAR and the Implication in Gene Regulation ». *Nucleic Acids Research* 50 (6): 3254-75. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac133>.
- Cabrera-Ortega, Adriana Alicia, Daniel Feinberg, Youde Liang, Carlos Rossa, et Dana T. Graves. 2017. « The Role of Forkhead Box 1 (FOXO1) in the Immune System: Dendritic Cells, T Cells, B Cells, and Hematopoietic Stem Cells ». *Critical reviews in immunology* 37 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2017019636>.
- Carazo, Alejandro, Jan Dusek, Ondrej Holas, Josef Skoda, Lucie Hyrsova, Tomas Smutny, Tomas Soukup, Martin Dosedel, et Petr Pávek. 2018. « Teriflunomide Is an Indirect Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Activator Interacting With Epidermal Growth Factor (EGF) Signaling ». *Frontiers in Pharmacology* 9: 993. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00993>.
- Carbone, S., O. J. Ponzio, N. Gobetto, Y. A. Samaniego, R. Reynoso, P. Scacchi, J. A. Moguilevsky, et R. Cutrera. 2013. « Antiandrogenic Effect of Perinatal Exposure to the Endocrine Disruptor Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate Increases Anxiety-like Behavior in Male Rats during Sexual Maturation ». *Hormones and Behavior* 63 (5): 692-99. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.01.006>.
- Cassault-Meyer, Estelle, Steeve Gress, Gilles-Éric Séralini, et Isabelle Galeraud-Denis. 2014. « An Acute Exposure to Glyphosate-Based Herbicide Alters Aromatase Levels in Testis and Sperm Nuclear Quality ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38 (1): 131-40. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.007>.
- Chae, Yun-Cheol, Ji-Young Kim, Jin Woo Park, Kee-Beom Kim, Hyein Oh, Kyung-Hwa Lee, et Sang-Beom Seo. 2019. « FOXO1 degradation via G9a-mediated methylation promotes cell proliferation in colon cancer ». *Nucleic Acids Research* 47 (4): 1692-1705. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1230>.
- Chai, Sergio C., Milu T. Cherian, Yue-Ming Wang, et Taosheng Chen. 2016. « Small-molecule modulators of PXR and CAR ». *Biochimica et biophysica acta* 1859 (9): 1141-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.013>.
- Chakraborty, P, F.W. Buaas, M Sharma, E Snyder, D.G. de Rooij, et R.E. Braun. 2014. « LIN28A marks the spermatogonial progenitor population and regulates its cyclic expansion ». *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32 (4): 860-73. <https://doi.org/10.1002/stem.1584>.
- Chakraborty, S., S. Kanakasabai, et J. J. Bright. 2011. « Constitutive Androstane Receptor Agonist CITCO Inhibits Growth and Expansion of Brain Tumour Stem Cells ». *British Journal of Cancer* 104 (3): 448-59. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606064>.

- Chan, Ai-Leen, Hue M. La, Julien M.D. Legrand, Juho-Antti Mäkelä, Michael Eichenlaub, Mia De Seram, Mirana Ramialison, et Robin M. Hobbs. 2017. « Germline Stem Cell Activity Is Sustained by SALL4-Dependent Silencing of Distinct Tumor Suppressor Genes ». *Stem Cell Reports* 9 (3): 956-71. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.08.001>.
- Chan, Frieda, Melissa J. Oatley, Amy V. Kaucher, Qi-En Yang, Charles J. Bieberich, Cooduvalli S. Shashikant, et Jon M. Oatley. 2014. « Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes ». *Genes & Development* 28 (12): 1351-62. <https://doi.org/10.1101/gad.240465.114>.
- Chang, Chawnshang, Yen-Ta Chen, Shauh-Der Yeh, Qingquan Xu, Ruey-Sheng Wang, Florian Guillou, Henry Lardy, et Shuyuan Yeh. 2004. « Infertility with Defective Spermatogenesis and Hypotestosteronemia in Male Mice Lacking the Androgen Receptor in Sertoli Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (18): 6876-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307306101>.
- Chang, Chawnshang, Soo Ok Lee, Ruey-Sheng Wang, Shuyuan Yeh, et Ta-Min Chang. 2013. « Androgen Receptor (AR) Physiological Roles in Male and Female Reproductive Systems: Lessons Learned from AR-Knockout Mice Lacking AR in Selective Cells ». *Biology of Reproduction* 89 (1): 21. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109132>.
- Chen, Hong, Máira Bianchi Rodrigues Alves, et Clémence Belleannée. 2021. « Contribution of Epididymal Epithelial Cell Functions to Sperm Epigenetic Changes and the Health of Progeny ». *Human Reproduction Update* 28 (1): 51-66. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab029>.
- Chen, Liang-Yu, Paula R. Brown, William B. Willis, et Edward M. Eddy. 2014. « Peritubular Myoid Cells Participate in Male Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance ». *Endocrinology* 155 (12): 4964-74. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1406>.
- Chen, Wei-Dong, Xianghui Fu, Bingning Dong, Yan-Dong Wang, Steven Shiah, David D. Moore, et Wendong Huang. 2012. « Neonatal Activation of the Nuclear Receptor CAR Results in Epigenetic Memory and Permanent Change of Drug Metabolism in Mouse Liver ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56 (4): 1499-1509. <https://doi.org/10.1002/hep.25766>.
- Chen, Zhuo, Xuezhi Zuo, Dongliang He, Shibin Ding, Fangyi Xu, Huiqin Yang, Xin Jin, et al. 2017. « Long-Term Exposure to a “safe” Dose of Bisphenol A Reduced Protein Acetylation in Adult Rat Testes ». *Scientific Reports* 7 (janvier): 40337. <https://doi.org/10.1038/srep40337>.
- Chiang, John Y. L., et Jessica M. Ferrell. 2018. « Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology ». *Gene Expression* 18 (2): 71-87. <https://doi.org/10.3727/105221618X15156018385515>.
- Chiarini-Garcia, H., J. R. Hornick, M. D. Griswold, et L. D. Russell. 2001. « Distribution of Type A Spermatogonia in the Mouse Is Not Random ». *Biology of Reproduction* 65 (4): 1179-85. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.4.1179>.
- Chiarini-Garcia, H., A. M. Raymer, et L. D. Russell. 2003. « Non-Random Distribution of Spermatogonia in Rats: Evidence of Niches in the Seminiferous Tubules ». *Reproduction (Cambridge, England)* 126 (5): 669-80. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260669>.
- Choi, H. S., M. Chung, I. Tzamelis, D. Simha, Y. K. Lee, W. Seol, et D. D. Moore. 1997. « Differential Transactivation by Two Isoforms of the Orphan Nuclear Hormone Receptor CAR ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (38): 23565-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23565>.
- Ciccarelli, Michela, Mariana I. Giassetti, Deqiang Miao, Melissa J. Oatley, Colton Robbins, Blanca Lopez-Biladeau, Muhammad Salman Waqas, et al. 2020. « Donor-derived spermatogenesis following stem cell transplantation in sterile NANOS2 knockout

- males ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (39): 24195-204. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010102117>.
- Clermont, Y., et B. Perey. 1957. « Quantitative Study of the Cell Population of the Seminiferous Tubules in Immature Rats ». *The American Journal of Anatomy* 100 (2): 241-67. <https://doi.org/10.1002/aja.1001000205>.
- Colborn, Theo, et Coralie Clement, éd. 1992. *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development-- the Wildlife/Human Connection*. Advances in Modern Environmental Toxicology, v. 21. Princeton, N.J: Princeton Scientific Pub. Co.
- Columbano, Amedeo, Giovanna M. Ledda-Columbano, Monica Pibiri, Costanza Cossu, Marta Menegazzi, David D. Moore, Wendong Huang, Jianmin Tian, et Joseph Locker. 2005. « Gadd45beta Is Induced through a CAR-Dependent, TNF-Independent Pathway in Murine Liver Hyperplasia ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 42 (5): 1118-26. <https://doi.org/10.1002/hep.20883>.
- Combarrous, Yves, et Thi Mong Diep Nguyen. 2019. « Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds ». *Toxics* 7 (1): E5. <https://doi.org/10.3390/toxics7010005>.
- Conine, Colin C., et Oliver J. Rando. 2022. « Soma-to-Germline RNA Communication ». *Nature Reviews Genetics* 23 (2): 73-88. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00412-1>.
- Costoya, José A., Robin M. Hobbs, Maria Barna, Giorgio Cattoretti, Katia Manova, Meena Sukhwani, Kyle E. Orwig, Debra J. Wolgemuth, et Pier Paolo Pandolfi. 2004. « Essential Role of Plzf in Maintenance of Spermatogonial Stem Cells ». *Nature Genetics* 36 (6): 653-59. <https://doi.org/10.1038/ng1367>.
- Coussens, Matthew, John G. Maresh, Ryuzo Yanagimachi, Gregg Maeda, et Richard Allsopp. 2008. « Sirt1 Deficiency Attenuates Spermatogenesis and Germ Cell Function ». *PLOS ONE* 3 (2): e1571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001571>.
- Dai, D., R. Bai, E. Hodgson, et R. L. Rose. 2001. « Cloning, Sequencing, Heterologous Expression, and Characterization of Murine Cytochrome P450 3a25*(Cyp3a25), a Testosterone 6beta-Hydroxylase ». *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 15 (2): 90-99. <https://doi.org/10.1002/jbt.4>.
- Dai, Jing-Bo, Zhao-Xia Wang, et Zhong-Dong Qiao. 2015. « The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility ». *Asian Journal of Andrology* 17 (6): 954-60. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.150847>.
- Daitoku, Hiroaki, Mitsutoki Hatta, Hitomi Matsuzaki, Satoko Aratani, Takayuki Ohshima, Makoto Miyagishi, Toshihiro Nakajima, et Akiyoshi Fukamizu. 2004. « Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (27): 10042-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400593101>.
- Datta, J., M. J. Palmer, C. Tanton, L. J. Gibson, K. G. Jones, W. Macdowall, A. Glasier, et al. 2016. « Prevalence of Infertility and Help Seeking among 15 000 Women and Men ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 31 (9): 2108-18. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew123>.
- De Gendt, Karel, Johannes V. Swinnen, Philippa T. K. Saunders, Luc Schoonjans, Mieke Dewerchin, Ann Devos, Karen Tan, et al. 2004. « A Sertoli Cell-Selective Knockout of the Androgen Receptor Causes Spermatogenic Arrest in Meiosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (5): 1327-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308114100>.
- De Gendt, Karel, et Guido Verhoeven. 2012. « Tissue- and Cell-Specific Functions of the Androgen Receptor Revealed through Conditional Knockout Models in Mice ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 352 (1-2): 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.008>.

- De Miguel, M. P., M. De Boer-Brouwer, R. Paniagua, R. van den Hurk, D. G. De Rooij, et F. M. Van Dissel-Emiliani. 1996. « Leukemia Inhibitory Factor and Ciliary Neurotropic Factor Promote the Survival of Sertoli Cells and Gonocytes in Coculture System ». *Endocrinology* 137 (5): 1885-93. <https://doi.org/10.1210/endo.137.5.8612528>.
- DeFalco, Tony, Sarah J. Potter, Alyna V. Williams, Brittain Waller, Matthew J. Kan, et Blanche Capel. 2015. « Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis ». *Cell Reports* 12 (7): 1107-19. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.015>.
- Dettmer, Rabea, Karsten Cirksena, Julia Münchhoff, Jasmin Kresse, Ulf Diekmann, Isabell Niwolik, Falk F. R. Buettner, et Ortwin Naujok. 2020. « FGF2 Inhibits Early Pancreatic Lineage Specification during Differentiation of Human Embryonic Stem Cells ». *Cells* 9 (9): E1927. <https://doi.org/10.3390/cells9091927>.
- Diamante, Graciél, Norma Menjivar-Cervantes, Man Sin Leung, David C. Volz, et Daniel Schlenk. 2017. « Contribution of G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER) to 17 β -Estradiol-Induced Developmental Toxicity in Zebrafish ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 186 (mai): 180-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.024>.
- Diaz, Dolores, Rama Pai, Gary Cain, Nghi La, Donna Dambach, Jacob Schwartz, et Jacqueline M. Tarrant. 2017. « MEK and ERK Kinase Inhibitors Increase Circulating Ceruloplasmin and Cause Green Serum in Rats ». *Toxicologic Pathology* 45 (2): 353-61. <https://doi.org/10.1177/0192623316664590>.
- Ding, Hongwei, Wei Zheng, Hua Han, Xiyin Hu, Binli Hu, Feng Wang, Liyu Su, Hong Li, et Yan Li. 2017. « Reproductive Toxicity of Linuron Following Gestational Exposure in Rats and Underlying Mechanisms ». *Toxicology Letters* 266 (janvier): 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.013>.
- Dong, Bingning, Pradip K. Saha, Wendong Huang, Wenling Chen, Lutfi A. Abu-Elheiga, Salih J. Wakil, Robert D. Stevens, et al. 2009. « Activation of Nuclear Receptor CAR Ameliorates Diabetes and Fatty Liver Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18831-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909731106>.
- Doshi, Tanvi, Smita Salián Mehta, Vikas Dighe, Nafisa Balasinor, et Geeta Vanage. 2011. « Hypermethylation of Estrogen Receptor Promoter Region in Adult Testis of Rats Exposed Neonatally to Bisphenol A ». *Toxicology* 289 (2-3): 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.011>.
- Drumond, Ana Luiza, Marvin L. Meistrich, et Hélio Chiarini-Garcia. 2011. « Spermatogonial Morphology and Kinetics during Testis Development in Mice: A High-Resolution Light Microscopy Approach ». *Reproduction* 142 (1): 145-55. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0431>.
- Durazzo, Marilena, Alberto Premoli, Cataldo Di Bisceglie, Angela Bertagna, Emanuela Faga, Giampaolo Biroli, Chiara Manieri, Simona Bo, et Gianfranco Pagano. 2006. « Alterations of Seminal and Hormonal Parameters: An Extrahepatic Manifestation of HCV Infection? ». *World Journal of Gastroenterology* 12 (19): 3073-76. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i19.3073>.
- Dym, M., et J. C. Cavicchia. 1978. « Functional Morphology of the Testis ». *Biology of Reproduction* 18 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1095/biolreprod18.1.1>.
- Ejlassi-Lassalette, Aïda, Eloïse Mocquard, Marie-Claire Arnaud, et Christophe Thiriet. 2011. « H4 Replication-Dependent Diacetylation and Hat1 Promote S-Phase Chromatin Assembly in Vivo ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (2): 245-55. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-07-0633>.
- Erickson-Lawrence, M., S. D. Zabludoff, et W. W. Wright. 1991. « Cyclic Protein-2, a Secretory Product of Rat Sertoli Cells, Is the Proenzyme Form of Cathepsin L ».

- Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.) 5 (12): 1789-98. <https://doi.org/10.1210/mend-5-12-1789>.
- Eto, Ko, Masahiro Shiotsuki, et Shin-Ichi Abe. 2013. « Nociceptin Induces Rec8 Phosphorylation and Meiosis in Postnatal Murine Testes ». *Endocrinology* 154 (8): 2891-99. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1977>.
- Eto, Ko, Masahiro Shiotsuki, Tomomi Sakai, et Shin-Ichi Abe. 2012. « Nociceptin Is Upregulated by FSH Signaling in Sertoli Cells in Murine Testes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 421 (4): 678-83. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.061>.
- Ferlin, Alberto, Savina Dipresa, Andrea Delbarba, Filippo Maffezzoni, Teresa Porcelli, Carlo Cappelli, et Carlo Foresta. 2019. « Contemporary Genetics-Based Diagnostics of Male Infertility ». *Expert Review of Molecular Diagnostics* 19 (7): 623-33. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1633917>.
- Fijak, Monika, Sudhanshu Bhushan, et Andreas Meinhardt. 2011. « Immunoprivileged Sites: The Testis ». *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 677: 459-70. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0_29.
- Forman, B. M., I. Tzamelis, H. S. Choi, J. Chen, D. Simha, W. Seol, R. M. Evans, et D. D. Moore. 1998. « Androstane Metabolites Bind to and Deactivate the Nuclear Receptor CAR-Beta ». *Nature* 395 (6702): 612-15. <https://doi.org/10.1038/26996>.
- Foster, Paul M. D. 2005. « Mode of Action: Impaired Fetal Leydig Cell Function--Effects on Male Reproductive Development Produced by Certain Phthalate Esters ». *Critical Reviews in Toxicology* 35 (8-9): 713-19. <https://doi.org/10.1080/10408440591007395>.
- França, L. R., R. A. Hess, J. M. Dufour, M. C. Hofmann, et M. D. Griswold. 2016. « The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity ». *Andrology* 4 (2): 189-212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>.
- Francavilla, Felice, Riccardo Santucci, Arcangelo Barbonetti, et Sandro Francavilla. 2007. « Naturally-Occurring Antisperm Antibodies in Men: Interference with Fertility and Clinical Implications. An Update ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12 (mai): 2890-2911. <https://doi.org/10.2741/2280>.
- Fu, Guoqing, Juan Dai, Dayi Zhang, Lishan Zhu, Xiao Tang, Ling Zhang, Ting Zhou, et al. 2017. « Di(2-Ethylhexyl) Phthalate Induces Apoptosis through Mitochondrial Pathway in GC-2spd Cells ». *Environmental Toxicology* 32 (3): 1055-64. <https://doi.org/10.1002/tox.22304>.
- Gabrielsen, J. S., et C. Tanrikut. 2016. « Chronic Exposures and Male Fertility: The Impacts of Environment, Diet, and Drug Use on Spermatogenesis ». *Andrology* 4 (4): 648-61. <https://doi.org/10.1111/andr.12198>.
- Gallardo, Teresa, Lane Shirley, George B. John, et Diego H. Castrillon. 2007. « Generation of a Germ Cell-Specific Mouse Transgenic Cre Line, Vasa-Cre ». *Genesis* (New York, N.Y.: 2000) 45 (6): 413-17. <https://doi.org/10.1002/dvg.20310>.
- Gallo, Alessandra, Raffaele Boni, et Elisabetta Tosti. 2020. « Gamete Quality in a Multistressor Environment ». *Environment International* 138 (mai): 105627. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105627>.
- Gannon, John R., Benjamin R. Emery, Timothy G. Jenkins, et Douglas T. Carrell. 2014. « The Sperm Epigenome: Implications for the Embryo ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 791: 53-66. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7783-9_4.
- Gao, Jie, Jinhua He, Yonggong Zhai, Taira Wada, et Wen Xie. 2009. « The Constitutive Androstane Receptor Is an Anti-Obesity Nuclear Receptor That Improves Insulin Sensitivity ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (38): 25984-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016808>.

- Gao, Ying, Dolores D. Mruk, Wing-Yee Lui, Will M. Lee, et C. Yan Cheng. 2016. « F5-Peptide Induces Aspermatogenesis by Disrupting Organization of Actin- and Microtubule-Based Cytoskeletons in the Testis ». *Oncotarget* 7 (39): 64203-20. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11887>.
- Garcia, Thomas Xavier, et Marie-Claude Hofmann. 2013. « NOTCH Signaling in Sertoli Cells Regulates Gonocyte Fate ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (16): 2538-45. <https://doi.org/10.4161/cc.25627>.
- Gassei, Kathrin, et Kyle E. Orwig. 2013. « SALL4 Expression in Gonocytes and Spermatogonial Clones of Postnatal Mouse Testes ». *PloS One* 8 (1): e53976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053976>.
- Gassman, Natalie R. 2017. « Induction of Oxidative Stress by Bisphenol A and Its Pleiotropic Effects ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58 (2): 60-71. <https://doi.org/10.1002/em.22072>.
- Gaudriault, Pierre, Séverine Mazaud-Guittot, Vincent Lavoué, Isabelle Coiffec, Laurianne Lesné, Nathalie Dejucq-Rainsford, Martin Scholze, Andreas Kortenkamp, et Bernard Jégou. 2017. « Endocrine Disruption in Human Fetal Testis Explants by Individual and Combined Exposures to Selected Pharmaceuticals, Pesticides, and Environmental Pollutants ». *Environmental Health Perspectives* 125 (8): 087004. <https://doi.org/10.1289/EHP1014>.
- George, Vazhappilly Cijo, et H. P. Vasantha Rupasinghe. 2018. « DNA Damaging and Apoptotic Potentials of Bisphenol A and Bisphenol S in Human Bronchial Epithelial Cells ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 60 (juin): 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.009>.
- Gewiss, Rachel L., Eric A. Shelden, et Michael D. Griswold. 2021. « STRA8 induces transcriptional changes in germ cells during spermatogonial development ». *Molecular Reproduction and Development* 88 (2): 128-40. <https://doi.org/10.1002/mrd.23448>.
- Goertz, Meredith J., Zhuoru Wu, Teresa D. Gallardo, F. Kent Hamra, et Diego H. Castrillon. 2011. « Foxo1 Is Required in Mouse Spermatogonial Stem Cells for Their Maintenance and the Initiation of Spermatogenesis ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (9): 3456-66. <https://doi.org/10.1172/JCI57984>.
- Gonsioroski, Andressa, Vasiliki E. Mourikes, et Jodi A. Flaws. 2020. « Endocrine Disruptors in Water and Their Effects on the Reproductive System ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (6): 1929. <https://doi.org/10.3390/ijms21061929>.
- Gonzalez, F. J., B. J. Song, et J. P. Hardwick. 1986. « Pregnenolone 16 Alpha-Carbonitrile-Inducible P-450 Gene Family: Gene Conversion and Differential Regulation ». *Molecular and Cellular Biology* 6 (8): 2969-76. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.8.2969-2976.1986>.
- González-Rojo, S., M. Lombó, C. Fernández-Díez, et M. P. Herráez. 2019. « Male Exposure to Bisphenol a Impairs Spermatogenesis and Triggers Histone Hyperacetylation in Zebrafish Testes ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 248 (mai): 368-79. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.127>.
- Goto, Tomoko, et Masashi Takano. 2009. « Transcriptional Role of FOXO1 in Drug Resistance through Antioxidant Defense Systems ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 665: 171-79. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1599-3_13.
- Grabole, Nils, Julia Tischler, Jamie A Hackett, Shinseog Kim, Fuchou Tang, Harry G Leitch, Erna Magnúsdóttir, et M Azim Surani. 2013. « Prdm14 promotes germline fate and naive pluripotency by repressing FGF signalling and DNA methylation ». *EMBO Reports* 14 (7): 629-37. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.67>.
- Green, Christopher Daniel, Qianyi Ma, Gabriel L. Manske, Adrienne Niederriter Shami, Xianing Zheng, Simone Marini, Lindsay Moritz, et al. 2018. « A Comprehensive

- Roadmap of Murine Spermatogenesis Defined by Single-Cell RNA-Seq ». *Developmental Cell* 46 (5): 651-667.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.07.025>.
- Griffeth, Richard J, Vanessa Bianda, et Serge Nef. 2014. « The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function ». *Basic and Clinical Andrology* 24 (août): 12. <https://doi.org/10.1186/2051-4190-24-12>.
- Griswold, M. D. 1998. « The Central Role of Sertoli Cells in Spermatogenesis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 9 (4): 411-16. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0203>.
- Gross, D. N., A. P. J. van den Heuvel, et M. J. Birnbaum. 2008. « The Role of FoxO in the Regulation of Metabolism ». *Oncogene* 27 (16): 2320-36. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.25>.
- Guengerich, F. Peter, Michael R. Waterman, et Martin Egli. 2016. « Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function ». *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (8): 625-40. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.006>.
- « Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment ». s. d., 143.
- Guo, G.-Q. Guanq-Qin, et G.-C. Guo-Chang Zheng. 2004. « Hypotheses for the Functions of Intercellular Bridges in Male Germ Cell Development and Its Cellular Mechanisms ». *Journal of Theoretical Biology* 229 (1): 139-46. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.03.010>.
- Guttman, J. A., G. H. Kimel, et A. W. Vogl. 2000. « Dynein and Plus-End Microtubule-Dependent Motors Are Associated with Specialized Sertoli Cell Junction Plaques (Ectoplasmic Specializations) ». *Journal of Cell Science* 113 (Pt 12) (juin): 2167-76. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.12.2167>.
- Hackett, Jamie A., Roopsha Sengupta, Jan J. Zylicz, Kazuhiro Murakami, Caroline Lee, Thomas A. Down, et M. Azim Surani. 2013. « Germline DNA Demethylation Dynamics and Imprint Erasure through 5-Hydroxymethylcytosine ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6118): 448-52. <https://doi.org/10.1126/science.1229277>.
- Hajkova, Petra, Sean J. Jeffries, Caroline Lee, Nigel Miller, Stephen P. Jackson, et M. Azim Surani. 2010. « Genome-Wide Reprogramming in the Mouse Germ Line Entails the Base Excision Repair Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 329 (5987): 78-82. <https://doi.org/10.1126/science.1187945>.
- Harchegani, Asghar Beigi, Alireza Rahmani, Eisa Tahmasbpour, Hamid Bakhari Kabootaraki, Hossein Rostami, et Alireza Shahriary. 2018. « Mechanisms of Diazinon Effects on Impaired Spermatogenesis and Male Infertility ». *Toxicology and Industrial Health* 34 (9): 653-64. <https://doi.org/10.1177/0748233718778665>.
- Hatta, Mitsutoki, et Lisa Ann Cirillo. 2007. « Chromatin Opening and Stable Perturbation of Core Histone:DNA Contacts by FoxO1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (49): 35583-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704735200>.
- Hauser, R., J. D. Meeker, N. P. Singh, M. J. Silva, L. Ryan, S. Duty, et A. M. Calafat. 2007. « DNA Damage in Human Sperm Is Related to Urinary Levels of Phthalate Monoester and Oxidative Metabolites ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 22 (3): 688-95. <https://doi.org/10.1093/humrep/del428>.
- Hauser, Russ, John D. Meeker, Susan Duty, Manori J. Silva, et Antonia M. Calafat. 2006. « Altered Semen Quality in Relation to Urinary Concentrations of Phthalate Monoester and Oxidative Metabolites ». *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 17 (6): 682-91. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000235996.89953.d7>.
- He, Zuping, Jiji Jiang, Marie-Claude Hofmann, et Martin Dym. 2007. « Gfra1 Silencing in Mouse Spermatogonial Stem Cells Results in Their Differentiation Via the Inactivation of RET Tyrosine Kinase ». *Biology of reproduction* 77 (4): 723-33. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062513>.

- Helsel, Aileen R., Qi-En Yang, Melissa J. Oatley, Tessa Lord, Fred Sablitzky, et Jon M. Oatley. 2017. « ID4 levels dictate the stem cell state in mouse spermatogonia ». *Development (Cambridge, England)* 144 (4): 624-34. <https://doi.org/10.1242/dev.146928>.
- Hess, Rex A., et Luiz Renato de Franca. 2008. « Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 636: 1-15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1.
- Hobbs, Robin M., Sharmila Fagoonee, Antonella Papa, Kaitlyn Webster, Fiorella Altruda, Ryuichi Nishinakamura, Li Chai, et Pier Paolo Pandolfi. 2012. « Functional antagonism between Sall4 and Plzf define germline progenitors ». *Cell Stem Cell* 10 (3): 284-98. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.004>.
- Hofmann, Marie-Claude. 2008. « Gdnf Signaling Pathways within the Mammalian Spermatogonial Stem Cell Niche ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 288 (1-2): 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.012>.
- Hofny, Eman Riaad M., Mohammed Essam M. Ali, Emad A. Taha, Hanan M. Nafeh, Doaa Samir Sayed, Hanan G. Abdel-Azeem, Ehab Fawzy Abdou, Ghada Mostafa Kamal, et Taymour Mostafa. 2011. « Semen and Hormonal Parameters in Men with Chronic Hepatitis C Infection ». *Fertility and Sterility* 95 (8): 2557-59. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.014>.
- Honkakoski, P., et M. Negishi. 1997. « Characterization of a Phenobarbital-Responsive Enhancer Module in Mouse P450 Cyp2b10 Gene ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (23): 14943-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14943>.
- Honkakoski, P., I. Zelko, T. Sueyoshi, et M. Negishi. 1998. « The Nuclear Orphan Receptor CAR-Retinoid X Receptor Heterodimer Activates the Phenobarbital-Responsive Enhancer Module of the CYP2B Gene ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (10): 5652-58.
- Honkakoski, Paavo, Tatsuya Sueyoshi, et Masahiko Negishi. 2003. « Drug-Activated Nuclear Receptors CAR and PXR ». *Annals of Medicine* 35 (3): 172-82. <https://doi.org/10.1080/07853890310008224>.
- Hsueh, A. J., K. D. Dahl, J. Vaughan, E. Tucker, J. Rivier, C. W. Bardin, et W. Vale. 1987. « Heterodimers and Homodimers of Inhibin Subunits Have Different Paracrine Action in the Modulation of Luteinizing Hormone-Stimulated Androgen Biosynthesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (14): 5082-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.14.5082>.
- Huang, Ling, Hui-Chang Bi, Ya-He Liu, Yi-Tao Wang, Xin-Ping Xue, et Min Huang. 2011. « CAR-Mediated up-Regulation of CYP3A4 Expression in LS174T Cells by Chinese Herbal Compounds ». *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 26 (4): 331-40. <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-10-rg-115>.
- Huang, Pan, Zhengrong Zhou, Fangxiong Shi, Genbao Shao, Ran Wang, Jintian Wang, Kangxin Wang, et Wei Ding. 2016. « Effects of the IGF-1/PTEN/Akt/FoxO signaling pathway on male reproduction in rats subjected to water immersion and restraint stress ». *Molecular Medicine Reports* 14 (6): 5116-24. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5880>.
- Huang, et Donald J. Tindall. 2011. « Regulation of FOXO Protein Stability via Ubiquitination and Proteasome Degradation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1813 (11): 1961-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.007>.
- Huang, Wendong, Jun Zhang, Steven S. Chua, Mohammed Qatanani, Yunqing Han, Riccarda Granata, et David D. Moore. 2003. « Induction of Bilirubin Clearance by the Constitutive Androstane Receptor (CAR) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4156-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630614100>.

- Huang, Wendong, Jun Zhang, Michele Washington, Jun Liu, John M. Parant, Guillermina Lozano, et David D. Moore. 2005. « Xenobiotic Stress Induces Hepatomegaly and Liver Tumors via the Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (6): 1646-53. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0520>.
- Huang, Yen-Hua, Cheng-Chieh Chin, Hong-Nerng Ho, Chuan-Kai Chou, Chia-Ning Shen, Hung-Chih Kuo, Tsai-Jung Wu, et al. 2009. « Pluripotency of Mouse Spermatogonial Stem Cells Maintained by IGF-1- Dependent Pathway ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (7): 2076-87. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121939>.
- Ishii, Kei, Mito Kanatsu-Shinohara, Shinya Toyokuni, et Takashi Shinohara. 2012. « FGF2 Mediates Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal via Upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 Activation ». *Development (Cambridge, England)* 139 (10): 1734-43. <https://doi.org/10.1242/dev.076539>.
- Jarvi, Keith, Kirk Lo, Ethan Grober, Victor Mak, Anthony Fischer, John Grantmyre, Armand Zini, et al. 2015. « The Workup and Management of Azoospermic Males ». *Canadian Urological Association Journal = Journal De l'Association Des Urologues Du Canada* 9 (7-8): 229-35. <https://doi.org/10.5489/cuaj.3209>.
- Jégou, B. 1995. « La cellule de Sertoli: actualisation du concept de cellule nourricière ». *médecine/sciences* 11 (4): 519. <https://doi.org/10.4267/10608/2241>.
- Joensen, Ulla Nordström, Rossana Bossi, Henrik Leffers, Allan Astrup Jensen, Niels E. Skakkebaek, et Niels Jørgensen. 2009. « Do Perfluoroalkyl Compounds Impair Human Semen Quality? ». *Environmental Health Perspectives* 117 (6): 923-27. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800517>.
- Ju, Yinghua, Taojun Xu, Hongkai Zhang, et Aiming Yu. 2014. « FOXO1-Dependent DNA Damage Repair Is Regulated by JNK in Lung Cancer Cells ». *International Journal of Oncology* 44 (4): 1284-92. <https://doi.org/10.3892/ijco.2014.2269>.
- Kagiwada, Saya, Kazuki Kurimoto, Takayuki Hirota, Masashi Yamaji, et Mitinori Saitou. 2013. « Replication-Coupled Passive DNA Demethylation for the Erasure of Genome Imprints in Mice ». *The EMBO Journal* 32 (3): 340-53. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.331>.
- Kanatsu-Shinohara, Mito, Narumi Ogonuki, Tomohiko Iwano, Jiyoung Lee, Yasuhiro Kazuki, Kimiko Inoue, Hiromi Miki, et al. 2005. « Genetic and Epigenetic Properties of Mouse Male Germline Stem Cells during Long-Term Culture ». *Development (Cambridge, England)* 132 (18): 4155-63. <https://doi.org/10.1242/dev.02004>.
- Kanatsu-Shinohara, Mito, Masanori Takehashi, Seiji Takashima, Jiyoung Lee, Hiroko Morimoto, Shinichiro Chuma, Aurelia Raducanu, Norio Nakatsuji, Reinhard Fässler, et Takashi Shinohara. 2008. « Homing of Mouse Spermatogonial Stem Cells to Germline Niche Depends on Beta1-Integrin ». *Cell Stem Cell* 3 (5): 533-42. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.002>.
- Kar, Supratik, Maria S. Sepúlveda, Kunal Roy, et Jerzy Leszczynski. 2017. « Endocrine-Disrupting Activity of per- and Polyfluoroalkyl Substances: Exploring Combined Approaches of Ligand and Structure Based Modeling ». *Chemosphere* 184 (octobre): 514-23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.024>.
- Karpale, Mikko, Janne Hukkanen, et Jukka Hakkola. 2022. « Nuclear Receptor PXR in Drug-Induced Hypercholesterolemia ». *Cells* 11 (3): 313. <https://doi.org/10.3390/cells11030313>.
- Kasai, Shinya, Shinichiro Chuma, Noboru Motoyama, et Norio Nakatsuji. 2003. « Haploinsufficiency of Bcl-x Leads to Male-Specific Defects in Fetal Germ Cells:

- Differential Regulation of Germ Cell Apoptosis between the Sexes ». *Developmental Biology* 264 (1): 202-16. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00400-7](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00400-7).
- Kassam, A., C. J. Winrow, F. Fernandez-Rachubinski, J. P. Capone, et R. A. Rachubinski. 2000. « The Peroxisome Proliferator Response Element of the Gene Encoding the Peroxisomal Beta-Oxidation Enzyme Enoyl-CoA Hydratase/3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Is a Target for Constitutive Androstane Receptor Beta/9-Cis-Retinoic Acid Receptor-Mediated Transactivation ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (6): 4345-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4345>.
- Kaucher, Amy V., Melissa J. Oatley, et Jon M. Oatley. 2012. « NEUROG3 Is a Critical Downstream Effector for STAT3-Regulated Differentiation of Mammalian Stem and Progenitor Spermatogonia ». *Biology of Reproduction* 86 (5): 164, 1-11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097386>.
- Kavlock, R. J., G. P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L. E. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, et al. 1996. « Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U.S. EPA-Sponsored Workshop ». *Environmental Health Perspectives* 104 Suppl 4 (août): 715-40. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s4715>.
- Kawamoto, T., T. Sueyoshi, I. Zelko, R. Moore, K. Washburn, et M. Negishi. 1999. « Phenobarbital-Responsive Nuclear Translocation of the Receptor CAR in Induction of the CYP2B Gene ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (9): 6318-22.
- Kazantseva, Yuliya A., Andrei A. Yarushkin, et Vladimir O. Pustyl'nyak. 2014. « CAR-Mediated Repression of Foxo1 Transcriptional Activity Regulates the Cell Cycle Inhibitor P21 in Mouse Livers ». *Toxicology* 321 (juillet): 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.04.003>.
- Kerr, J. B., et D. M. de Kretser. 1974. « Proceedings: The Role of the Sertoli Cell in Phagocytosis of the Residual Bodies of Spermatids ». *Journal of Reproduction and Fertility* 36 (2): 439-40. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0360439>.
- Khanehzad, Maryam, Roya Abbaszadeh, Marzieh Holakuyee, Mohammad Hossein Modarressi, et Seyed Mehdi Nourashrafeddin. 2021. « FSH Regulates RA Signaling to Commit Spermatogonia into Differentiation Pathway and Meiosis ». *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 19 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00686-w>.
- Khodamoradi, Kajal, Zahra Khosravizadeh, Deepa Seetharam, Suresh Mallepalli, Natoli Farber, et Himanshu Arora. 2022. « The Role of Leptin and Low Testosterone in Obesity ». *International Journal of Impotence Research*, janvier. <https://doi.org/10.1038/s41443-022-00534-y>.
- Kim, Sangsoo Daniel, Larry Morgan, Elyse Hargreaves, Xiaoying Zhang, Zhihui Jiang, Monica Antenos, Ben Li, et Gordon M. Kirby. 2021. « Regulation of Cytochrome P450 2a5 by Artemisia capillaris and 6,7-Dimethylesculetin in Mouse Hepatocytes ». *Frontiers in Pharmacology* 12 (novembre): 730416. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.730416>.
- Kitadate, Yu, David J. Jörg, Moe Tokue, Ayumi Maruyama, Rie Ichikawa, Soken Tsuchiya, Eri Segi-Nishida, et al. 2019. « Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche ». *Cell Stem Cell* 24 (1): 79-92.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.013>.
- Kleiman, Sandra E., Batia Bar-Shira Maymon, Ron Hauser, Amnon Botchan, Gedalia Paz, Haim Yavetz, et Leah Yogev. 2008. « Histone H4 Acetylation and AZFc Involvement in Germ Cells of Specimens of Impaired Spermatogenesis ». *Fertility and Sterility* 89 (6): 1728-36. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.068>.
- Kliwer, S. A., J. T. Moore, L. Wade, J. L. Staudinger, M. A. Watson, S. A. Jones, D. D. McKee, et al. 1998. « An Orphan Nuclear Receptor Activated by Pregnanes Defines a

- Novel Steroid Signaling Pathway ». *Cell* 92 (1): 73-82. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80900-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80900-9).
- Kluin, P. M., et D. G. de Rooij. 1981. « A Comparison between the Morphology and Cell Kinetics of Gonocytes and Adult Type Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse ». *International Journal of Andrology* 4 (4): 475-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1981.tb00732.x>.
- Kobayashi, Kaoru, Tatsuya Sueyoshi, Kaoru Inoue, Rick Moore, et Masahiko Negishi. 2003. « Cytoplasmic Accumulation of the Nuclear Receptor CAR by a Tetratricopeptide Repeat Protein in HepG2 Cells ». *Molecular Pharmacology* 64 (5): 1069-75. <https://doi.org/10.1124/mol.64.5.1069>.
- Kodama, Susumu, Chika Koike, Masahiko Negishi, et Yukio Yamamoto. 2004. « Nuclear Receptors CAR and PXR Cross Talk with FOXO1 to Regulate Genes That Encode Drug-Metabolizing and Gluconeogenic Enzymes ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (18): 7931-40. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.7931-7940.2004>.
- Kodama, Susumu, et Masahiko Negishi. 2006. « Phenobarbital Confers Its Diverse Effects by Activating the Orphan Nuclear Receptor Car ». *Drug Metabolism Reviews* 38 (1-2): 75-87. <https://doi.org/10.1080/03602530600569851>.
- Koike, Chika, Rick Moore, et Masahiko Negishi. 2005. « Localization of the Nuclear Receptor CAR at the Cell Membrane of Mouse Liver ». *FEBS Letters* 579 (30): 6733-36. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.070>.
- Küblbeck, Jenni, Jonna Niskanen, et Paavo Honkakoski. 2020. « Metabolism-Disrupting Chemicals and the Constitutive Androstane Receptor CAR ». *Cells* 9 (10): 2306. <https://doi.org/10.3390/cells9102306>.
- Kubota, Hiroshi, Mary R. Avarbock, et Ralph L. Brinster. 2004. « Growth Factors Essential for Self-Renewal and Expansion of Mouse Spermatogonial Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47): 16489-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407063101>.
- La Vecchia, Carlo, et Eva Negri. 2014. « A Review of Epidemiological Data on Epilepsy, Phenobarbital, and Risk of Liver Cancer ». *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 23 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e32836014c8>.
- Lahtela, J. T., A. J. Arranto, et E. A. Sotaniemi. 1985. « Enzyme Inducers Improve Insulin Sensitivity in Non-Insulin-Dependent Diabetic Subjects ». *Diabetes* 34 (9): 911-16. <https://doi.org/10.2337/diab.34.9.911>.
- Lauretta, Rosa, Andrea Sansone, Massimiliano Sansone, Francesco Romanelli, et Marialuisa Appetecchia. 2019. « Endocrine Disrupting Chemicals: Effects on Endocrine Glands ». *Frontiers in Endocrinology* 10 (mars): 178. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00178>.
- Law, G. L., et M. D. Griswold. 1994. « Activity and Form of Sulfated Glycoprotein 2 (Clusterin) from Cultured Sertoli Cells, Testis, and Epididymis of the Rat ». *Biology of Reproduction* 50 (3): 669-79. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.669>.
- Layman, L. C., et P. G. McDonough. 2000. « Mutations of Follicle Stimulating Hormone-Beta and Its Receptor in Human and Mouse: Genotype/Phenotype ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 161 (1-2): 9-17. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00217-8](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00217-8).
- Ledda-Columbano, G. M., M. Pibiri, R. Loi, A. Perra, H. Shinozuka, et A. Columbano. 2000. « Early Increase in Cyclin-D1 Expression and Accelerated Entry of Mouse Hepatocytes into S Phase after Administration of the Mitogen 1, 4-Bis[2-(3,5-Dichloropyridyloxy)] Benzene ». *The American Journal of Pathology* 156 (1): 91-97. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64709-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64709-8).
- Leduc, Frédéric, Vincent Maquennehan, Geneviève Bikond Nkoma, et Guylain Boissonneault. 2008. « DNA Damage Response during Chromatin Remodeling in Elongating

- Spermatids of Mice ». *Biology of Reproduction* 78 (2): 324-32. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064162>.
- Lee, L. K., et K. Y. Foo. 2014. « Recent Insights on the Significance of Transcriptomic and Metabolomic Analysis of Male Factor Infertility ». *Clinical Biochemistry* 47 (10-11): 973-82. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.05.053>.
- Lessard, Maryse, Pauline M. Herst, Phanie L. Charest, Pauline Navarro, Charles Joly-Beauparlant, Arnaud Droit, Sarah Kimmins, et al. 2019. « Prenatal Exposure to Environmentally-Relevant Contaminants Perturbs Male Reproductive Parameters Across Multiple Generations That Are Partially Protected by Folic Acid Supplementation ». *Scientific Reports* 9 (1): 13829. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50060-z>.
- Levine, Hagai, Niels Jørgensen, Anderson Martino-Andrade, Jaime Mendiola, Dan Weksler-Derri, Irina Mindlis, Rachel Pinotti, et Shanna H. Swan. 2017. « Temporal Trends in Sperm Count: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis ». *Human Reproduction Update* 23 (6): 646-59. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022>.
- Li, Cindy Yanfei, Sunny Lihua Cheng, Theo K. Bammler, et Julia Yue Cui. 2016. « Editor's Highlight: Neonatal Activation of the Xenobiotic-Sensors PXR and CAR Results in Acute and Persistent Down-regulation of PPAR α -Signaling in Mouse Liver ». *Toxicological Sciences* 153 (2): 282-302. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw127>.
- Li, Cuiling, Kai Zhao, Huiping Zhang, Lili Liu, Fei Xiong, Kunyu Wang, et Biao Chen. 2018. « Lead Exposure Reduces Sperm Quality and DNA Integrity in Mice ». *Environmental Toxicology* 33 (5): 594-602. <https://doi.org/10.1002/tox.22545>.
- Li, Daochuan, Bryan Mackowiak, Timothy G. Brayman, Michael Mitchell, Lei Zhang, Shiew-Mei Huang, et Hongbing Wang. 2015. « Genome-wide Analysis of Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Transcriptome in Wild-type and CAR-knockout HepaRG cells ». *Biochemical pharmacology* 98 (1): 190-202. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.087>.
- Li, Haishan, et Hongbing Wang. 2010. « Activation of Xenobiotic Receptors: Driving into the Nucleus ». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 6 (4): 409-26. <https://doi.org/10.1517/17425251003598886>.
- Li, Linhao, Tao Chen, Joseph D Stanton, Tatsuya Sueyoshi, Masahiko Negishi, et Hongbing Wang. 2008. « The Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligand 1-(2-Chlorophenylmethylpropyl)-3-isoquinoline-carboxamide Is a Novel Antagonist of Human Constitutive Androstane Receptor ». *Molecular pharmacology* 74 (2): 443-53. <https://doi.org/10.1124/mol.108.046656>.
- Li, V. Papadopoulos, B. Vidic, M. Dym, et M. Culty. 1997. « Regulation of Rat Testis Gonocyte Proliferation by Platelet-Derived Growth Factor and Estradiol: Identification of Signaling Mechanisms Involved ». *Endocrinology* 138 (3): 1289-98. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.5021>.
- Li, Yong, Millard H. Lambert, et H. Eric Xu. 2003. « Activation of Nuclear Receptors: A Perspective from Structural Genomics ». *Structure (London, England: 1993)* 11 (7): 741-46. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00133-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00133-3).
- Li, Ruth T. Yu, Annette R. Atkins, Michael Downes, Robert H. Tukey, et Ronald M. Evans. 2012. « Targeting the pregnane X receptor in liver injury (review) ». *Expert opinion on therapeutic targets* 16 (11): 1075-83. <https://doi.org/10.1517/14728222.2012.715634>.
- Liao, Jinyue, Shuk Han Ng, Jiajie Tu, Alfred Chun Shui Luk, Yan Qian, Jacqueline Fung, Nelson Leung Sang Tang, et al. 2017. « Single-Cell RNA-Seq Resolves Cellular Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in Spermatogonial Stem Cells Establishment ». Preprint. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/194696>.

- Lickteig, Andrew J., Youcai Zhang, Curtis D. Klaassen, et Iván L. Csanaky. 2019. « Effects of Absence of Constitutive Androstane Receptor (CAR) on Bile Acid Homeostasis in Male and Female Mice ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, juin. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz143>.
- Lin, T., J. K. Calkins, P. L. Morris, W. Vale, et C. W. Bardin. 1989. « Regulation of Leydig Cell Function in Primary Culture by Inhibin and Activin ». *Endocrinology* 125 (4): 2134-40. <https://doi.org/10.1210/endo-125-4-2134>.
- Liu, Yue, et Zhide Ding. 2017. « Obesity, a Serious Etiologic Factor for Male Subfertility in Modern Society ». *Reproduction (Cambridge, England)* 154 (4): R123-31. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0161>.
- Livera, Gabriel, Virginie Rouiller-Fabre, Catherine Pairault, Christine Levacher, et René Habert. 2002. « Regulation and Perturbation of Testicular Functions by Vitamin A ». *Reproduction (Cambridge, England)* 124 (2): 173-80.
- Lolicato, Francesca, Rita Marino, Maria Paola Paronetto, Manuela Pellegrini, Susanna Dolci, Raffaele Geremia, et Paola Grimaldi. 2008. « Potential Role of Nanos3 in Maintaining the Undifferentiated Spermatogonia Population ». *Developmental Biology* 313 (2): 725-38. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.011>.
- Lukowicz, Céline, Sandrine Ellero-Simatos, Marion Régner, Fabiana Oliviero, Frédéric Lasserre, Arnaud Polizzi, Alexandra Montagner, et al. 2019. « Dimorphic Metabolic and Endocrine Disorders in Mice Lacking the Constitutive Androstane Receptor ». *Scientific Reports* 9 (1): 20169. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56570-0>.
- Lynch, Caitlin, Yongmei Pan, Linhao Li, Scott Heyward, Timothy Moeller, Peter W. Swaan, et Hongbing Wang. 2014. « Activation of the Constitutive Androstane Receptor Inhibits Gluconeogenesis without Affecting Lipogenesis or Fatty Acid Synthesis in Human Hepatocytes ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 279 (1): 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.05.009>.
- Mackowiak, Bryan, et Hongbing Wang. 2016. « Mechanisms of Xenobiotic Receptor Activation: Direct vs. Indirect ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1859 (9): 1130-40. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.006>.
- Maglich, Jodi M., Derek J. Parks, Linda B. Moore, Jon L. Collins, Bryan Goodwin, Andrew N. Billin, Catherine A. Stoltz, et al. 2003. « Identification of a Novel Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonist and Its Use in the Identification of CAR Target Genes ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (19): 17277-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300138200>.
- Maglich, Jodi M., Catherine M. Stoltz, Bryan Goodwin, Diane Hawkins-Brown, John T. Moore, et Steven A. Kliewer. 2002. « Nuclear Pregnane x Receptor and Constitutive Androstane Receptor Regulate Overlapping but Distinct Sets of Genes Involved in Xenobiotic Detoxification ». *Molecular Pharmacology* 62 (3): 638-46. <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.638>.
- Manku, Gurpreet, et Martine Culty. 2015. « Mammalian Gonocyte and Spermatogonia Differentiation: Recent Advances and Remaining Challenges ». *Reproduction (Cambridge, England)* 149 (3): R139-157. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0431>.
- Marettová, E., M. Mareta, et J. Legáth. 2015. « Toxic Effects of Cadmium on Testis of Birds and Mammals: A Review ». *Animal Reproduction Science* 155 (avril): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.007>.
- Mark, Manuel, Hugues Jacobs, Mustapha Oulad-Abdelghani, Christine Dennefeld, Betty Féret, Nadège Vernet, Carmen-Alina Codreanu, Pierre Chambon, et Norbert B. Ghyselinck. 2008. « STRA8-Deficient Spermatocytes Initiate, but Fail to Complete, Meiosis and Undergo Premature Chromosome Condensation ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 19): 3233-42. <https://doi.org/10.1242/jcs.035071>.

- Marmugi, Alice, Céline Lukowicz, Frederic Lasserre, Alexandra Montagner, Arnaud Polizzi, Simon Ducheix, Adeline Goron, et al. 2016. « Activation of the Constitutive Androstane Receptor Induces Hepatic Lipogenesis and Regulates Pnpla3 Gene Expression in a LXR-Independent Way ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 303 (juillet): 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.006>.
- Martinot, Emmanuelle, Marine Baptissart, Aurélie Véga, Lauriane Sèdes, Betty Rouaisnel, Fred Vaz, Jean-Paul Saru, et al. 2017. « Bile Acid Homeostasis Controls CAR Signaling Pathways in Mouse Testis through FXR α ». *Scientific Reports* 7 (février): 42182. <https://doi.org/10.1038/srep42182>.
- Masaki, Kaito, Mizuki Sakai, Shunsuke Kuroki, Jun-Ichiro Jo, Kazuo Hoshina, Yuki Fujimori, Kenji Oka, et al. 2018. « FGF2 Has Distinct Molecular Functions from GDNF in the Mouse Germline Niche ». *Stem Cell Reports* 10 (6): 1782-92. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.016>.
- Masuyama, Hisashi, et Yuji Hiramatsu. 2012. « Treatment with Constitutive Androstane Receptor Ligand during Pregnancy Prevents Insulin Resistance in Offspring from High-Fat Diet-Induced Obese Pregnant Mice ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 303 (2): E293-300. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00167.2012>.
- Matsuzaki, Hitomi, Hiroaki Daitoku, Mitsutoki Hatta, Hisanori Aoyama, Kenji Yoshimochi, et Akiyoshi Fukamizu. 2005. « Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (32): 11278-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502738102>.
- McBirney, Margaux, Stephanie E. King, Michelle Pappalardo, Elizabeth Houser, Margaret Unkefer, Eric Nilsson, Ingrid Sadler-Riggelman, Daniel Beck, Paul Winchester, et Michael K. Skinner. 2017. « Atrazine Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Disease, Lean Phenotype and Sperm Epimutation Pathology Biomarkers ». *PLoS One* 12 (9): e0184306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184306>.
- McCarrey, John R. 2012. « The Epigenome as a Target for Heritable Environmental Disruptions of Cellular Function ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 354 (1-2): 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.014>.
- Meeker, John D., Shelley Ehrlich, Thomas L. Toth, Diane L. Wright, Antonia M. Calafat, Ana T. Trisini, Xiaoyun Ye, et Russ Hauser. 2010. « Semen Quality and Sperm DNA Damage in Relation to Urinary Bisphenol A among Men from an Infertility Clinic ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 30 (4): 532-39. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.005>.
- Meistrich, Marvin L., et Gunapala Shetty. 2015. « The New Director of “the Spermatogonial Niche”: Introducing the Peritubular Macrophage ». *Cell Reports* 12 (7): 1069-70. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.057>.
- Meng, Jing, Robert W. Holdcraft, James E. Shima, Michael D. Griswold, et Robert E. Braun. 2005. « Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (46): 16696-700. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506084102>.
- Meng, X., M. Lindahl, M. E. Hyvönen, M. Parvinen, D. G. de Rooij, M. W. Hess, A. Raatikainen-Ahokas, et al. 2000. « Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5457): 1489-93. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1489>.
- Mezza, Teresa, Jun Shirakawa, Rachael Martinez, Jiang Hu, Andrea Giaccari, et Rohit N. Kulkarni. 2016. « Nuclear Export of FoxO1 Is Associated with ERK Signaling in β -

- Cells Lacking Insulin Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (41): 21485-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.735738>.
- Miao, Ji, Sungsoon Fang, Yangjin Bae, et Jongsook Kim Kemper. 2006. « Functional Inhibitory Cross-Talk between Constitutive Androstane Receptor and Hepatic Nuclear Factor-4 in Hepatic Lipid/Glucose Metabolism Is Mediated by Competition for Binding to the DR1 Motif and to the Common Coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (21): 14537-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510713200>.
- Miao, M., X. Zhou, Y. Li, O. Zhang, Z. Zhou, T. Li, W. Yuan, R. Li, et D.-K. Li. 2014. « LINE-1 Hypomethylation in Spermatozoa Is Associated with Bisphenol A Exposure ». *Andrology* 2 (1): 138-44. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00166.x>.
- Miller, Siennah R., et Nathan J. Cherrington. 2018. « Transepithelial Transport across the Blood-Testis Barrier ». *Reproduction (Cambridge, England)* 156 (6): R187-94. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0338>.
- Moore, R. D. Klein, I. Fariñas, H. Sauer, M. Armanini, H. Phillips, L. F. Reichardt, A. M. Ryan, K. Carver-Moore, et A. Rosenthal. 1996. « Renal and Neuronal Abnormalities in Mice Lacking GDNF ». *Nature* 382 (6586): 76-79. <https://doi.org/10.1038/382076a0>.
- Moore, L. B., D. J. Parks, S. A. Jones, R. K. Bledsoe, T. G. Consler, J. B. Stimmel, B. Goodwin, et al. 2000. « Orphan Nuclear Receptors Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Share Xenobiotic and Steroid Ligands ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (20): 15122-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001215200>.
- Morris, I. D., C. W. Bardin, N. A. Musto, R. Thau, et G. L. Gunsalus. 1988. « Androgen Binding Protein in Serum, Testis and Epididymis Following Treatment with the Leydig Cell Cytotoxic Agent, Ethylene Dimethanesulphonate ». *International Journal of Andrology* 11 (2): 153-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1988.tb00991.x>.
- Motta, Maria Carla, Nullin Divecha, Madeleine Lemieux, Christopher Kamel, Delin Chen, Wei Gu, Yvette Bultsma, Michael McBurney, et Leonard Guarente. 2004. « Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors ». *Cell* 116 (4): 551-63. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00126-6).
- Mruk, Dolores D., et C. Yan Cheng. 2004. « Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis ». *Endocrine Reviews* 25 (5): 747-806. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0022>.
- Mruk, Dolores D., Michelle K. Y. Siu, Anne M. Conway, Nikki P. Y. Lee, Ann S. N. Lau, et C. Yan Cheng. 2003. « Role of Tissue Inhibitor of Metalloproteases-1 in Junction Dynamics in the Testis ». *Journal of Andrology* 24 (4): 510-23. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02703.x>.
- Muthusami, K. R., et P. Chinnaswamy. 2005. « Effect of Chronic Alcoholism on Male Fertility Hormones and Semen Quality ». *Fertility and Sterility* 84 (4): 919-24. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.04.025>.
- Mutoh, Shingo, Makoto Osabe, Kaoru Inoue, Rick Moore, Lee Pedersen, Lalith Perera, Yvette Rebolloso, Tatsuya Sueyoshi, et Masahiko Negishi. 2009. « Dephosphorylation of Threonine 38 Is Required for Nuclear Translocation and Activation of Human Xenobiotic Receptor CAR (NR1I3) ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (50): 34785-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048108>.
- Nagano, Makoto C. 2003. « Homing Efficiency and Proliferation Kinetics of Male Germ Line Stem Cells Following Transplantation in Mice ». *Biology of Reproduction* 69 (2): 701-7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016352>.
- Nagano, Makoto, Buom-Yong Ryu, Clayton J. Brinster, Mary R. Avarbock, et Ralph L. Brinster. 2003. « Maintenance of Mouse Male Germ Line Stem Cells in Vitro ». *Biology of Reproduction* 68 (6): 2207-14. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014050>.

- Nakae, Jun, Valarie Barr, et Domenico Accili. 2000. « Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR ». *The EMBO Journal* 19 (5): 989-96. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.5.989>.
- Nakamura, M., S. Okinaga, et K. Arai. 1984. « Metabolism of Round Spermatids: Evidence That Lactate Is Preferred Substrate ». *The American Journal of Physiology* 247 (2 Pt 1): E234-242. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1984.247.2.E234>.
- Nakayama, Y., T. Yamamoto, et S. I. Abé. 1999. « IGF-I, IGF-II and Insulin Promote Differentiation of Spermatogonia to Primary Spermatocytes in Organ Culture of Newt Testes ». *The International Journal of Developmental Biology* 43 (4): 343-47.
- Neubert, D. 1988. « Significance of Pharmacokinetic Variables in Reproductive and Developmental Toxicity ». *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 18 Suppl 1 (janvier): 45-58.
- Oatley, Jon M., Mary R. Avarbock, et Ralph L. Brinster. 2007. « Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Regulation of Genes Essential for Self-Renewal of Mouse Spermatogonial Stem Cells Is Dependent on Src Family Kinase Signaling* ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (35): 25842-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703474200>.
- Oatley, Jon M., Mary R. Avarbock, Aino I. Telaranta, Douglas T. Fearon, et Ralph L. Brinster. 2006. « Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (25): 9524-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603332103>.
- Oatley, Jon M., et Ralph L. Brinster. 2012. « The Germline Stem Cell Niche Unit in Mammalian Testes ». *Physiological Reviews* 92 (2): 577-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011>.
- Oatley, Jon M., Melissa J. Oatley, Mary R. Avarbock, John W. Tobias, et Ralph L. Brinster. 2009. « Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal ». *Development (Cambridge, England)* 136 (7): 1191-99. <https://doi.org/10.1242/dev.032243>.
- Oatley, Karen E. Racicot, et Jon M. Oatley. 2011. « Sertoli Cells Dictate Spermatogonial Stem Cell Niches in the Mouse Testis ». *Biology of Reproduction* 84 (4): 639-45. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087320>.
- Ohinata, Yasuhide, Bernhard Payer, Dónal O'Carroll, Katia Ancelin, Yukiko Ono, Mitsue Sano, Sheila C. Barton, et al. 2005. « Blimp1 Is a Critical Determinant of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Nature* 436 (7048): 207-13. <https://doi.org/10.1038/nature03813>.
- Okumura, K., I. P. Lee, et R. L. Dixon. 1975. « Permeability of Selected Drugs and Chemicals across the Blood-Testis Barrier of the Rat ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 194 (1): 89-95.
- Oliva, Rafael, et Josep Luís Ballescà. 2012. « Altered Histone Retention and Epigenetic Modifications in the Sperm of Infertile Men ». *Asian Journal of Andrology* 14 (2): 239-40. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.159>.
- Oliviero, Fabiana, Céline Lukowicz, Badreddine Boussadia, Isabel Forner-Piquer, Jean-Marc Pascussi, Nicola Marchi, et Laila Mselli-Lakhal. 2020. « Constitutive Androstane Receptor: A Peripheral and a Neurovascular Stress or Environmental Sensor ». *Cells* 9 (11): 2426. <https://doi.org/10.3390/cells9112426>.
- Omolaoye, Temidayo S., Omar El Shahawy, Bongekile T. Skosana, Thomas Boillat, Tom Loney, et Stefan S. du Plessis. 2021. « The Mutagenic Effect of Tobacco Smoke on Male Fertility ». *Environmental Science and Pollution Research International*, septembre. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16331-x>.
- Ono, Shoichiro. 2018. « Functions of Actin-Interacting Protein 1 (AIP1)/WD Repeat Protein 1 (WDR1) in Actin Filament Dynamics and Cytoskeletal Regulation ». *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications* 506 (2): 315-22.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.096>.
- Oulad-Abdelghani, M., P. Bouillet, D. Décimo, A. Gansmuller, S. Heyberger, P. Dollé, S. Bronner, Y. Lutz, et P. Chambon. 1996. « Characterization of a Premeiotic Germ Cell-Specific Cytoplasmic Protein Encoded by *Stra8*, a Novel Retinoic Acid-Responsive Gene ». *The Journal of Cell Biology* 135 (2): 469-77.
<https://doi.org/10.1083/jcb.135.2.469>.
- Pedigo, N. G., W. J. George, et M. B. Anderson. 1988. « Effects of Acute and Chronic Exposure to Cobalt on Male Reproduction in Mice ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 2 (1): 45-53. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(88\)80008-x](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(88)80008-x).
- Peng, Shiming, Wei Li, Nannan Hou, et Niu Huang. 2020. « A Review of FoxO1-Regulated Metabolic Diseases and Related Drug Discoveries ». *Cells* 9 (1): 184.
<https://doi.org/10.3390/cells9010184>.
- Persson, Carney Almroth Bm, Collins Cd, Cornell S, de Wit Ca, Diamond Ml, Fantke P, et al. 2022. « Outside the Safe Operating Space of the Planetary Boundary for Novel Entities ». *Environmental Science & Technology* 56 (3).
<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04158>.
- Phillips, Jennifer M., Yukio Yamamoto, Masahiko Negishi, Robert R. Maronpot, et Jay I. Goodman. 2007. « Orphan Nuclear Receptor Constitutive Active/Androstane Receptor-Mediated Alterations in DNA Methylation during Phenobarbital Promotion of Liver Tumorigenesis ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 96 (1): 72-82. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl188>.
- Piquet-Pellorce, C., I. Dorval-Coiffec, M. D. Pham, et B. Jégou. 2000. « Leukemia Inhibitory Factor Expression and Regulation within the Testis ». *Endocrinology* 141 (3): 1136-41.
<https://doi.org/10.1210/endo.141.3.7399>.
- Pitetti, Jean-Luc, Pierre Calvel, Céline Zimmermann, Béatrice Conne, Marilena D. Papaioannou, Florence Aubry, Christopher R. Cederroth, et al. 2013. « An Essential Role for Insulin and IGF1 Receptors in Regulating Sertoli Cell Proliferation, Testis Size, and FSH Action in Mice ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 27 (5): 814-27. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1258>.
- Poganitsch-Korhonen, M, I Masliukaite, M Nurmio, P Lähteenmäki, M van Wely, A M M van Pelt, K Jahnukainen, et J-B Stukenborg. 2017. « Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents ». *Leukemia* 31 (6): 1460-63. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.76>.
- Potter, Sarah J., et Tony DeFalco. 2017. « Role of the Testis Interstitial Compartment in Spermatogonial Stem Cell Function ». *Reproduction (Cambridge, England)* 153 (4): R151-62. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0588>.
- Predieri, Barbara, Crésio A. D. Alves, et Lorenzo Iughetti. 2022. « New Insights on the Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Children ». *Jornal de Pediatria* 98 (mars): S73-85. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2021.11.003>.
- Print, C. G., et K. L. Loveland. 2000. « Germ Cell Suicide: New Insights into Apoptosis during Spermatogenesis ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 22 (5): 423-30. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200005\)22:5<423::AID-BIES4>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<423::AID-BIES4>3.0.CO;2-0).
- Pui, Han Pin, et Yumiko Saga. 2017. « Gonocytes-to-Spermatogonia Transition Initiates Prior to Birth in Murine Testes and It Requires FGF Signaling ». *Mechanisms of Development* 144 (Pt B): 125-39. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.03.002>.
- . 2018. « NANOS2 Acts as an Intrinsic Regulator of Gonocytes-to-Spermatogonia Transition in the Murine Testes ». *Mechanisms of Development* 149 (février): 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.01.001>.

- Pustyl'nyak, Yuliya A., Lyudmila F. Gulyaeva, et Vladimir O. Pustyl'nyak. 2020. « Noncanonical Constitutive Androstane Receptor Signaling in Gene Regulation ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186735>.
- Qiu, Lie-Wang, Lu-Yun Gu, Lin Lü, Xiao-Feng Chen, Chuan-Fei Li, et Zhe-Chuan Mei. 2015. « FOXO1-Mediated Epigenetic Modifications Are Involved in the Insulin-Mediated Repression of Hepatocyte Aquaporin 9 Expression ». *Molecular Medicine Reports* 11 (4): 3064-68. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3085>.
- Ramalho-Santos, J., R. D. Moreno, G. M. Wessel, E. K. Chan, et G. Schatten. 2001. « Membrane Trafficking Machinery Components Associated with the Mammalian Acrosome during Spermiogenesis ». *Experimental Cell Research* 267 (1): 45-60. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5119>.
- Rato, Luís, Sílvia Socorro, José E. B. Cavaco, et Pedro F. Oliveira. 2010. « Tubular Fluid Secretion in the Seminiferous Epithelium: Ion Transporters and Aquaporins in Sertoli Cells ». *The Journal of Membrane Biology* 236 (2): 215-24. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9294-x>.
- Rebourcet, Diane, Annalucia Darbey, Ana Monteiro, Ugo Soffientini, Yi Ting Tsai, Ian Handel, Jean-Luc Pitetti, Serge Nef, Lee B. Smith, et Peter J. O'Shaughnessy. 2017. « Sertoli Cell Number Defines and Predicts Germ and Leydig Cell Population Sizes in the Adult Mouse Testis ». *Endocrinology* 158 (9): 2955-69. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00196>.
- Rehman, Saba, Zeenat Usman, Sabeen Rehman, Moneera Aldraihem, Noor Rehman, Ibraheem Rehman, et Gulfam Ahmad. 2018. « Endocrine Disrupting Chemicals and Impact on Male Reproductive Health ». *Translational Andrology and Urology* 7 (3): 490-503. <https://doi.org/10.21037/tau.2018.05.17>.
- Ren, Jian-Wen, Zhang-Jun Li, et Chen Tu. 2015. « MiR-135 Post-Transcriptionally Regulates FOXO1 Expression and Promotes Cell Proliferation in Human Malignant Melanoma Cells ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (6): 6356-66.
- Rena, G., S. Guo, S. C. Cichy, T. G. Unterman, et P. Cohen. 1999. « Phosphorylation of the Transcription Factor Forkhead Family Member FKHR by Protein Kinase B ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (24): 17179-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17179>.
- Robinson, R., et I. B. Fritz. 1981. « Metabolism of Glucose by Sertoli Cells in Culture ». *Biology of Reproduction* 24 (5): 1032-41. <https://doi.org/10.1095/biolreprod24.5.1032>.
- Rolland, M., J. Le Moal, V. Wagner, D. Royère, et J. De Mouzon. 2013. « Decline in Semen Concentration and Morphology in a Sample of 26,609 Men Close to General Population between 1989 and 2005 in France ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 28 (2): 462-70. <https://doi.org/10.1093/humrep/des415>.
- Rooij, D. G. de. 2001. « Proliferation and Differentiation of Spermatogonial Stem Cells ». *Reproduction (Cambridge, England)* 121 (3): 347-54. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210347>.
- Rooij, D. G. de, et J. A. Grootegoed. 1998. « Spermatogonial Stem Cells ». *Current Opinion in Cell Biology* 10 (6): 694-701. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(98\)80109-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80109-9).
- Rooij, D. G. de, et L. D. Russell. 2000. « All You Wanted to Know about Spermatogonia but Were Afraid to Ask ». *Journal of Andrology* 21 (6): 776-98.
- Roosen-Runge, E. C., et J. Leik. 1968. « Gonocyte Degeneration in the Postnatal Male Rat ». *The American Journal of Anatomy* 122 (2): 275-99. <https://doi.org/10.1002/aja.1001220208>.
- Rousseaux, S., N. Reynoird, E. Escoffier, J. Thevenon, C. Caron, et S. Khochbin. 2008. « Epigenetic Reprogramming of the Male Genome during Gametogenesis and in the

- Zygote ». *Reproductive Biomedicine Online* 16 (4): 492-503. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60456-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60456-7).
- Rubes, Jiri, Sherry G. Selevan, Donald P. Evenson, Dagmar Zudova, Miluse Vozdova, Zdena Zudova, Wendie A. Robbins, et Sally D. Perreault. 2005. « Episodic Air Pollution Is Associated with Increased DNA Fragmentation in Human Sperm without Other Changes in Semen Quality ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 20 (10): 2776-83. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei122>.
- Russell, L. D., A. Bartke, et J. C. Goh. 1989. « Postnatal Development of the Sertoli Cell Barrier, Tubular Lumen, and Cytoskeleton of Sertoli and Myoid Cells in the Rat, and Their Relationship to Tubular Fluid Secretion and Flow ». *The American Journal of Anatomy* 184 (3): 179-89. <https://doi.org/10.1002/aja.1001840302>.
- Russell, L. D., T. J. Corbin, K. E. Borg, L. R. De Franca, P. Grasso, et A. Bartke. 1993. « Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone Is Capable of Exerting a Biological Effect in the Adult Hypophysectomized Rat by Reducing the Numbers of Degenerating Germ Cells ». *Endocrinology* 133 (5): 2062-70. <https://doi.org/10.1210/endo.133.5.8404654>.
- Sada, Aiko, Atsushi Suzuki, Hitomi Suzuki, et Yumiko Saga. 2009. « The RNA-Binding Protein NANOS2 Is Required to Maintain Murine Spermatogonial Stem Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5946): 1394-98. <https://doi.org/10.1126/science.1172645>.
- Sadate-Ngatchou, Patricia I., Derek J. Pouchnik, et Michael D. Griswold. 2004. « Follicle-Stimulating Hormone Induced Changes in Gene Expression of Murine Testis ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 18 (11): 2805-16. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0203>.
- Saini, Simrat P. S., Junichiro Sonoda, Li Xu, David Toma, Hirdesh Uppal, Ying Mu, Songrong Ren, David D. Moore, Ronald M. Evans, et Wen Xie. 2004. « A Novel Constitutive Androstane Receptor-Mediated and CYP3A-Independent Pathway of Bile Acid Detoxification ». *Molecular Pharmacology* 65 (2): 292-300. <https://doi.org/10.1124/mol.65.2.292>.
- Saitou, Mitinori, et Masashi Yamaji. 2010. « Germ Cell Specification in Mice: Signaling, Transcription Regulation, and Epigenetic Consequences ». *Reproduction* 139 (6): 931-42. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0043>.
- Salian, Smita, Tanvi Doshi, et Geeta Vanage. 2009. « Neonatal Exposure of Male Rats to Bisphenol A Impairs Fertility and Expression of Sertoli Cell Junctional Proteins in the Testis ». *Toxicology* 265 (1-2): 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.012>.
- Samarasinghe, S. V. a. C., K. Krishnan, R. Naidu, M. Megharaj, K. Miller, B. Fraser, et R. J. Aitken. 2018. « Parabens Generate Reactive Oxygen Species in Human Spermatozoa ». *Andrology* 6 (4): 532-41. <https://doi.org/10.1111/andr.12499>.
- Schenkman, J. B. 1992. « Steroid Metabolism by Constitutive Cytochromes P450 ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43 (8): 1023-30. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90329-H](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90329-H).
- Schofield, R. 1978. « The Relationship between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell ». *Blood Cells* 4 (1-2): 7-25.
- Sèdes, Lauriane, Christèle Desdoits-Lethimonier, Betty Rouaisnel, Hélène Holota, Laura Thirouard, Laurianne Lesne, Christelle Damon-Soubeyrand, et al. 2018. « Crosstalk between BPA and FXR α Signaling Pathways Lead to Alterations of Undifferentiated Germ Cell Homeostasis and Male Fertility Disorders ». *Stem Cell Reports* 11 (4): 944-58. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.018>.
- Sèdes, Lauriane, Emmanuelle Martinot, Marine Baptissart, Silvère Baron, Françoise Caira, Claude Beaudoin, et David H. Volle. 2017. « Bile Acids and Male Fertility: From

- Mouse to Human? » *Molecular Aspects of Medicine* 56 (août): 101-9. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.05.004>.
- Seisenberger, Stefanie, Simon Andrews, Felix Krueger, Julia Arand, Jörn Walter, Fátima Santos, Christian Popp, Bernard Thienpont, Wendy Dean, et Wolf Reik. 2012. « The Dynamics of Genome-Wide DNA Methylation Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells ». *Molecular Cell* 48 (6): 849-62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.001>.
- Sermondade, N., C. Faure, L. Fezeu, A. G. Shayeb, J. P. Bonde, T. K. Jensen, M. Van Wely, et al. 2013. « BMI in Relation to Sperm Count: An Updated Systematic Review and Collaborative Meta-Analysis ». *Human Reproduction Update* 19 (3): 221-31. <https://doi.org/10.1093/humupd/dms050>.
- Seydoux, Geraldine, et Robert E. Braun. 2006. « Pathway to Totipotency: Lessons from Germ Cells ». *Cell* 127 (5): 891-904. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.016>.
- Shan, Li, Jeremy Vincent, Joseph S. Brunzelle, Isabelle Dussault, Min Lin, Irina Ianculescu, Mark A. Sherman, Barry M. Forman, et Elias J. Fernandez. 2004. « Structure of the Murine Constitutive Androstane Receptor Complexed to Androstenediol: A Molecular Basis for Inverse Agonism ». *Molecular cell* 16 (6): 907-17. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.037>.
- Sharma, et Robert E. Braun. 2018. « Cyclical Expression of GDNF Is Required for Spermatogonial Stem Cell Homeostasis ». *Development (Cambridge, England)* 145 (5): dev151555. <https://doi.org/10.1242/dev.151555>.
- Sharma, Poonam, Rambir Singh, et Mysra Jan. 2014. « Dose-Dependent Effect of Deltamethrin in Testis, Liver, and Kidney of Wistar Rats ». *Toxicology International* 21 (2): 131-39. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.139789>.
- Sharma, Rakesh, Kelly R Biedenharn, Jennifer M Fedor, et Ashok Agarwal. 2013. « Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility ». *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 11 (juillet): 66. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-66>.
- Sharpe, Richard M., Chris McKinnell, Catrina Kivlin, et Jane S. Fisher. 2003. « Proliferation and Functional Maturation of Sertoli Cells, and Their Relevance to Disorders of Testis Function in Adulthood ». *Reproduction (Cambridge, England)* 125 (6): 769-84. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769>.
- Shinoda, Gen, T. Yvanka De Soysa, Marc T. Seligson, Akiko Yabuuchi, Yuko Fujiwara, Pei Yi Huang, John P. Hagan, Richard I. Gregory, Eric G. Moss, et George Q. Daley. 2013. « Lin28a Regulates Germ Cell Pool Size and Fertility ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31 (5): 1001-9. <https://doi.org/10.1002/stem.1343>.
- Shinohara, T., M. R. Avarbock, et R. L. Brinster. 1999. « Beta1- and Alpha6-Integrin Are Surface Markers on Mouse Spermatogonial Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10): 5504-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5504>.
- Shiota, Hitoshi, Sophie Barral, Thierry Buchou, Minjia Tan, Yohann Couté, Guillaume Charbonnier, Nicolas Reynoird, et al. 2018. « Nut Directs P300-Dependent, Genome-Wide H4 Hyperacetylation in Male Germ Cells ». *Cell Reports* 24 (13): 3477-3487.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.069>.
- Shiraishi, Koji, et Hideyasu Matsuyama. 2012. « Local Expression of Epidermal Growth Factor-like Growth Factors in Human Testis and Its Role in Spermatogenesis ». *Journal of Andrology* 33 (1): 66-73. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.011981>.
- Shirakata, Yoshiki, Yuuki Hiradate, Hiroki Inoue, Eimei Sato, et Kentaro Tanemura. 2014. « Histone H4 Modification during Mouse Spermatogenesis ». *The Journal of Reproduction and Development* 60 (5): 383-87.

- Shizu, Ryota, Satoshi Benoki, Yuki Numakura, Susumu Kodama, Masaaki Miyata, Yasushi Yamazoe, et Kouichi Yoshinari. 2013. « Xenobiotic-Induced Hepatocyte Proliferation Associated with Constitutive Active/Androstane Receptor (CAR) or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) Is Enhanced by Pregnane X Receptor (PXR) Activation in Mice ». *PLoS ONE* 8 (4): e61802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061802>.
- Short, M. L., D. Huang, D. M. Milkowski, S. Short, K. Kunstman, C. J. Soong, K. C. Chung, et R. A. Jungmann. 1994. « Analysis of the Rat Lactate Dehydrogenase A Subunit Gene Promoter/Regulatory Region ». *The Biochemical Journal* 304 (Pt 2) (décembre): 391-98. <https://doi.org/10.1042/bj3040391>.
- Sifakis, Stavros, Vasilis P. Androutsopoulos, Aristeidis M. Tsatsakis, et Demetrios A. Spandidos. 2017. « Human Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals: Effects on the Male and Female Reproductive Systems ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 51 (avril): 56-70. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>.
- Simon, Liz, Gail C Ekman, Thomas Garcia, Kay Carnes, Zhen Zhang, Theresa Murphy, Kenneth M Murphy, Rex A Hess, Paul S Cooke, et Marie-Claude Hofmann. 2010. « ETV5 Regulates Sertoli Cell Chemokines Involved in Mouse Stem/Progenitor Spermatogonia Maintenance ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (10): 1882-92. <https://doi.org/10.1002/stem.508>.
- Singh, J., et D. J. Handelsman. 1996. « The Effects of Recombinant FSH on Testosterone-Induced Spermatogenesis in Gonadotrophin-Deficient (Hpg) Mice ». *Journal of Andrology* 17 (4): 382-93.
- Sisakhtnezhad, Sajjad, et Parvin Heshmati. 2018. « Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Data from Mouse Spermatogonial and Mesenchymal Stem Cells to Identify Differentially Expressed Genes and Transcriptional Regulators of Germline Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (7): 5231-42. <https://doi.org/10.1002/jcp.26303>.
- Skinner, M. K., P. S. Tung, et I. B. Fritz. 1985. « Cooperativity between Sertoli Cells and Testicular Peritubular Cells in the Production and Deposition of Extracellular Matrix Components ». *The Journal of Cell Biology* 100 (6): 1941-47. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.6.1941>.
- Slama, R., O. K. H. Hansen, B. Ducot, A. Bohet, D. Sorensen, L. Giorgis Allemand, M. J. C. Eijkemans, et al. 2012. « Estimation of the Frequency of Involuntary Infertility on a Nation-Wide Basis ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 27 (5): 1489-98. <https://doi.org/10.1093/humrep/des070>.
- Somers, Christopher M. 2011. « Ambient Air Pollution Exposure and Damage to Male Gametes: Human Studies and in Situ “sentinel” Animal Experiments ». *Systems Biology in Reproductive Medicine* 57 (1-2): 63-71. <https://doi.org/10.3109/19396368.2010.500440>.
- Song, Peipei, Jianpeng Gao, Xianxu Li, Cui Zhang, Lusheng Zhu, Jinhua Wang, et Jun Wang. 2019. « Phthalate Induced Oxidative Stress and DNA Damage in Earthworms (*Eisenia Fetida*) ». *Environment International* 129 (août): 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.074>.
- Soumillon, Magali, Anamaria Necsulea, Manuela Weier, David Brawand, Xiaolan Zhang, Hongcang Gu, Pauline Barthès, et al. 2013. « Cellular Source and Mechanisms of High Transcriptome Complexity in the Mammalian Testis ». *Cell Reports* 3 (6): 2179-90. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.031>.
- Spruiell, Krisstonia, Ricardo M. Richardson, John M. Cullen, Emmanuel M. Awumey, Frank J. Gonzalez, et Maxwell A. Gyamfi. 2014. « Role of Pregnane X Receptor in Obesity and Glucose Homeostasis in Male Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (6): 3244-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494575>.

- Stedman, Catherine A. M., Christopher Liddle, Sally A. Coulter, Junichiro Sonoda, Jacqueline G. A. Alvarez, David D. Moore, Ronald M. Evans, et Michael Downes. 2005. « Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (6): 2063-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409794102>.
- Štefanac, Tea, Dijana Grgas, et Tibela Landeka Dragičević. 2021. « Xenobiotics—Division and Methods of Detection: A Review ». *Journal of Xenobiotics* 11 (4): 130-41. <https://doi.org/10.3390/jox11040009>.
- Subash, Susha K., et Pradeep G. Kumar. 2021. « Spermatogonial Stem Cells: A Story of Self-Renewal and Differentiation ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 26 (1): 163-205. <https://doi.org/10.2741/4891>.
- Sueyoshi, Tatsuya, Rick Moore, Junko Sugatani, Yonehiro Matsumura, et Masahiko Negishi. 2008. « PPP1R16A, the Membrane Subunit of Protein Phosphatase 1beta, Signals Nuclear Translocation of the Nuclear Receptor Constitutive Active/Androstane Receptor ». *Molecular Pharmacology* 73 (4): 1113-21. <https://doi.org/10.1124/mol.107.042960>.
- Sugatani, Junko, Kasumi Yamakawa, Kouich Yoshinari, Takashi Machida, Hitoshi Takagi, Masatomo Mori, Satoru Kakizaki, Tatsuya Sueyoshi, Masahiko Negishi, et Masao Miwa. 2002. « Identification of a Defect in the UGT1A1 Gene Promoter and Its Association with Hyperbilirubinemia ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292 (2): 492-97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6683>.
- Sullivan, Jeremy I., et Don C. Rockey. 2017. « Diagnosis and Evaluation of Hyperbilirubinemia ». *Current Opinion in Gastroenterology* 33 (3): 164-70. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000354>.
- Sun, Feng, Qing Xu, Danfeng Zhao, et Charlie Degui Chen. 2015. « Id4 Marks Spermatogonial Stem Cells in the Mouse Testis ». *Scientific Reports* 5 (décembre): 17594. <https://doi.org/10.1038/srep17594>.
- Surani, M. Azim, Katsuhiko Hayashi, et Petra Hajkova. 2007. « Genetic and Epigenetic Regulators of Pluripotency ». *Cell* 128 (4): 747-62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.010>.
- Suzuki, Hitomi, Hyo Won Ahn, Tianjiao Chu, Wayne Bowden, Kathrin Gassei, Kyle Orwig, et Aleksandar Rajkovic. 2012. « SOHLH1 and SOHLH2 Coordinate Spermatogonial Differentiation ». *Developmental Biology* 361 (2): 301-12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.027>.
- Suzuki, Hitomi, Aiko Sada, Shosei Yoshida, et Yumiko Saga. 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 (2): 222-31. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.002>.
- Suzuki, Shinnosuke, Victoria D Diaz, et Brian P Hermann. 2019. « What has single-cell RNA-seq taught us about mammalian spermatogenesis? » *Biology of Reproduction* 101 (3): 617-34. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz088>.
- Swan, Shanna H. 2006. « Semen Quality in Fertile US Men in Relation to Geographical Area and Pesticide Exposure ». *International Journal of Andrology* 29 (1): 62-68; discussion 105-108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00620.x>.
- Sylvester, S. R., et M. D. Griswold. 1994. « The Testicular Iron Shuttle: A “Nurse” Function of the Sertoli Cells ». *Journal of Andrology* 15 (5): 381-85.
- Tajima, Y., D. Watanabe, U. Koshimizu, T. Matsuzawa, et Y. Nishimune. 1995. « Insulin-like Growth Factor-I and Transforming Growth Factor-Alpha Stimulate Differentiation of Type A Spermatogonia in Organ Culture of Adult Mouse Cryptorchid Testes ».

- International Journal of Andrology* 18 (1): 8-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1995.tb00928.x>.
- Takashima, Seiji, Mito Kanatsu-Shinohara, Takashi Tanaka, Hiroko Morimoto, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Mayumi Jijiwa, Masahide Takahashi, Atsuo Ogura, et Takashi Shinohara. 2015. « Functional Differences between GDNF-Dependent and FGF2-Dependent Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal ». *Stem Cell Reports* 4 (3): 489-502. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.010>.
- Tam, P. P., et M. H. Snow. 1981. « Proliferation and Migration of Primordial Germ Cells during Compensatory Growth in Mouse Embryos ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 64 (août): 133-47.
- Tanaka, Takashi, Mito Kanatsu-Shinohara, Zhenmin Lei, C.V. Rao, et Takashi Shinohara. 2016. « The Luteinizing Hormone-Testosterone Pathway Regulates Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal by Suppressing WNT5A Expression in Sertoli Cells ». *Stem Cell Reports* 7 (2): 279-91. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.07.005>.
- Tarulli, Gerard A., Peter G. Stanton, et Sarah J. Meachem. 2012. « Is the Adult Sertoli Cell Terminally Differentiated? » *Biology of Reproduction* 87 (1): 13, 1-11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095091>.
- Teletin, Marius, Nadège Vernet, Jianshi Yu, Muriel Klopfenstein, Jace W. Jones, Betty Féret, Maureen A. Kane, Norbert B. Ghyselinck, et Manuel Mark. 2019. « Two Functionally Redundant Sources of Retinoic Acid Secure Spermatogonia Differentiation in the Seminiferous Epithelium ». *Development (Cambridge, England)* 146 (1): dev170225. <https://doi.org/10.1242/dev.170225>.
- Themes, U. F. O. 2017. « XENOBIOTIC ABSORPTION, DISTRIBUTION, METABOLISM, AND EXCRETION ». *Basicmedical Key* (blog). 31 juillet 2017. <https://basicmedicalkey.com/xenobiotic-absorption-distribution-metabolism-and-excretion/>.
- Thirouard, Laura, Hélène Holota, Mélusine Monroe, Manon Garcia, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin, et David H. Volle. 2021. « Analysis of the Reversible Impact of the Chemodrug Busulfan on Mouse Testes ». *Cells* 10 (9): 2403. <https://doi.org/10.3390/cells10092403>.
- Tian, Ruhui, Shi Yang, Yong Zhu, Shasha Zou, Peng Li, Junlong Wang, Zijue Zhu, Yiran Huang, Zuping He, et Zheng Li. 2016. « VEGF/VEGFR2 Signaling Regulates Germ Cell Proliferation in Vitro and Promotes Mouse Testicular Regeneration in Vivo ». *Cells, Tissues, Organs* 201 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1159/000440949>.
- Timsit, Yoav E., et Masahiko Negishi. 2007. « CAR and PXR: The Xenobiotic-Sensing Receptors ». *Steroids* 72 (3): 231-46. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.12.006>.
- Tirpák, Filip, Hana Greifová, Norbert Lukáč, Robert Stawarz, et Peter Massányi. 2021. « Exogenous Factors Affecting the Functional Integrity of Male Reproduction ». *Life (Basel, Switzerland)* 11 (3): 213. <https://doi.org/10.3390/life11030213>.
- Tokuda, Masataka, Yuzo Kadokawa, Hiroki Kurahashi, et Tohru Marunouchi. 2007. « CDH1 Is a Specific Marker for Undifferentiated Spermatogonia in Mouse Testes1 ». *Biology of Reproduction* 76 (1): 130-41. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053181>.
- Trautmann, Emilie, Marie-Justine Guerquin, Clotilde Duquenne, Jean-Baptiste Lahaye, René Habert, et Gabriel Livera. 2008. « Retinoic Acid Prevents Germ Cell Mitotic Arrest in Mouse Fetal Testes ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (5): 656-64. <https://doi.org/10.4161/cc.7.5.5482>.
- Trottier, E., A. Belzil, C. Stoltz, et A. Anderson. 1995. « Localization of a Phenobarbital-Responsive Element (PBRE) in the 5'-Flanking Region of the Rat CYP2B2 Gene ». *Gene* 158 (2): 263-68. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00916-g](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00916-g).

- Tyagi, Gaurav, Kay Carnes, Carla Morrow, Natalia V. Kostereva, Gail C. Ekman, Daryl D. Meling, Chris Hostetler, et al. 2009. « Loss of Etv5 Decreases Proliferation and RET Levels in Neonatal Mouse Testicular Germ Cells and Causes an Abnormal First Wave of Spermatogenesis ». *Biology of Reproduction* 81 (2): 258-66. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075200>.
- Tzamelis, Iphigenia, Pavlos Pissios, Erin G. Schuetz, et David D. Moore. 2000. « The Xenobiotic Compound 1,4-Bis[2-(3,5-Dichloropyridyloxy)]Benzene Is an Agonist Ligand for the Nuclear Receptor CAR ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (9): 2951-58.
- Ueda, Akiko, Hisham K. Hamadeh, Heather K. Webb, Yukio Yamamoto, Tatsuya Sueyoshi, Cynthia A. Afshari, Jürgen M. Lehmann, et Masahiko Negishi. 2002. « Diverse Roles of the Nuclear Orphan Receptor CAR in Regulating Hepatic Genes in Response to Phenobarbital ». *Molecular Pharmacology* 61 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1124/mol.61.1.1>.
- Uhlén, Mathias, Linn Fagerberg, Björn M. Hallström, Cecilia Lindskog, Per Oksvold, Adil Mardinoglu, Åsa Sivertsson, et al. 2015. « Proteomics. Tissue-Based Map of the Human Proteome ». *Science (New York, N.Y.)* 347 (6220): 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>.
- Vandenberg, Laura N., Theo Colborn, Tyrone B. Hayes, Jerrold J. Heindel, David R. Jacobs, Duk-Hee Lee, Toshi Shioda, et al. 2012. « Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses ». *Endocrine Reviews* 33 (3): 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>.
- Vega, Aurélie, Emmanuelle Martinot, Marine Baptissart, Angélique De Haze, Frederic Vaz, Wim Kulik, Christelle Damon-Soubeyrand, Silvère Baron, Françoise Caira, et David H. Volle. 2015. « Bile Acid Alters Male Mouse Fertility in Metabolic Syndrome Context ». *PLoS One* 10 (10): e0139946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139946>.
- Vergouwen, R. P., S. G. Jacobs, R. Huiskamp, J. A. Davids, et D. G. de Rooij. 1991. « Proliferative Activity of Gonocytes, Sertoli Cells and Interstitial Cells during Testicular Development in Mice ». *Journal of Reproduction and Fertility* 93 (1): 233-43. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0930233>.
- Vicente-Manzanares, Miguel, et Alan Rick Horwitz. 2011. « Cell Migration: An Overview ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 769: 1-24. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_1.
- Vihko, K. K., J. J. Suominen, et M. Parvinen. 1984. « Cellular Regulation of Plasminogen Activator Secretion during Spermatogenesis ». *Biology of Reproduction* 31 (2): 383-89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod31.2.383>.
- Virtanen, Helena E., Niels Jørgensen, et Jorma Toppari. 2017. « Semen Quality in the 21st Century ». *Nature Reviews. Urology* 14 (2): 120-30. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.261>.
- Voigt, Anna Laura, Shiama Thiageswaran, Nathalia de Lima e Martins Lara, et Ina Dobrinski. 2021. « Metabolic Requirements for Spermatogonial Stem Cell Establishment and Maintenance In Vivo and In Vitro ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (4): 1998. <https://doi.org/10.3390/ijms22041998>.
- Volle, David H., Mélanie Decourteix, Erwan Garo, Judy McNeilly, Patrick Fenichel, Johan Auwerx, Alan S. McNeilly, Kristina Schoonjans, et Mohamed Benahmed. 2009. « The Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner Mediates Male Infertility Induced by Diethylstilbestrol in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (12): 3752-64. <https://doi.org/10.1172/JCI38521>.
- Volle, David H., Rajesha Duggavathi, Benjamin C. Magnier, Sander M. Houten, Carolyn L. Cummins, Jean-Marc A. Lobaccaro, Guido Verhoeven, Kristina Schoonjans, et Johan

- Auwerx. 2007. « The Small Heterodimer Partner Is a Gonadal Gatekeeper of Sexual Maturation in Male Mice ». *Genes & Development* 21 (3): 303-15. <https://doi.org/10.1101/gad.409307>.
- Vos, K. E. van der, et P. J. Coffey. 2008. « FOXO-Binding Partners: It Takes Two to Tango ». *Oncogene* 27 (16): 2289-99. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.22>.
- Wagner, Martin, Emina Halilbasic, Hanns-Ulrich Marschall, Gernot Zollner, Peter Fickert, Cord Langner, Kurt Zatloukal, Helmut Denk, et Michael Trauner. 2005. « CAR and PXR Agonists Stimulate Hepatic Bile Acid and Bilirubin Detoxification and Elimination Pathways in Mice ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 42 (2): 420-30. <https://doi.org/10.1002/hep.20784>.
- Walker, William H. 2011. « Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis ». *Spermatogenesis* 1 (2): 116-20. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16956>.
- Wang, Enyin, Yan Huang, Qingyun Du, et Yingpu Sun. 2017. « Silver Nanoparticle Induced Toxicity to Human Sperm by Increasing ROS(Reactive Oxygen Species) Production and DNA Damage ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 52 (juin): 193-99. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.04.010>.
- Wang, Hui, Zhen Ding, Qiao-Mei Shi, Xing Ge, Heng-Xue Wang, Meng-Xue Li, Gang Chen, et al. 2017. « Anti-Androgenic Mechanisms of Bisphenol A Involve Androgen Receptor Signaling Pathway ». *Toxicology* 387 (juillet): 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.007>.
- Wang, Kun, Ivan Damjanov, et Yu-Jui Yvonne Wan. 2010. « The Protective Role of Pregnane X Receptor in Lipopolysaccharide/D-Galactosamine-Induced Acute Liver Injury ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 90 (2): 257-65. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.129>.
- Wang, Nakane, et T. Koji. 1998. « Autonomous Cell Death of Mouse Male Germ Cells during Fetal and Postnatal Period ». *Biology of Reproduction* 58 (5): 1250-56. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.5.1250>.
- Wang, Pei, Guangming Liu, Yali Nie, Shengna Han, Jiangfeng Li, Xiao-Bo Zhong, et Lirong Zhang. 2019. « Epigenetic Memory Is Involved in the Persistent Alterations of Drug-Processing Genes in Adult Mice Due to PCN-Activated PXR during Early Life ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, août, kfz177. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz177>.
- Wang, Xiaofei. 2021. « Identifying RNA-Binding Landscapes of PXR Using Enhanced UV-Crosslinking and Immunoprecipitation Followed by Sequencing ». University of Pittsburgh ETD. University of Pittsburgh. 19 avril 2021. <http://d-scholarship.pitt.edu/40514/>.
- Wang, Yi-Xin, Qiang Zeng, Yang Sun, Ling You, Peng Wang, Min Li, Pan Yang, et al. 2016. « Phthalate Exposure in Association with Serum Hormone Levels, Sperm DNA Damage and Spermatozoa Apoptosis: A Cross-Sectional Study in China ». *Environmental Research* 150 (octobre): 557-65. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.11.023>.
- Wang, Yue-Ming, Su Sien Ong, Sergio C. Chai, et Taosheng Chen. 2012. « Role of CAR and PXR in Xenobiotic Sensing and Metabolism ». *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 8 (7): 803-17. <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.685237>.
- Wang, Ziyao, Tinghe Yu, et Ping Huang. 2016. « Post-translational modifications of FOXO family proteins (Review) ». *Molecular Medicine Reports* 14 (6): 4931-41. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5867>.
- Weber, J. E., L. D. Russell, V. Wong, et R. N. Peterson. 1983. « Three-Dimensional Reconstruction of a Rat Stage V Sertoli Cell: II. Morphometry of Sertoli--Sertoli and

- Sertoli--Germ-Cell Relationships ». *The American Journal of Anatomy* 167 (2): 163-79. <https://doi.org/10.1002/aja.1001670203>.
- Wei, P., J. Zhang, D. H. Dowhan, Y. Han, et D. D. Moore. 2002. « Specific and Overlapping Functions of the Nuclear Hormone Receptors CAR and PXR in Xenobiotic Response ». *The Pharmacogenomics Journal* 2 (2): 117-26. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500087>.
- Wei, P., J. Zhang, M. Egan-Hafley, S. Liang, et D. D. Moore. 2000. « The Nuclear Receptor CAR Mediates Specific Xenobiotic Induction of Drug Metabolism ». *Nature* 407 (6806): 920-23. <https://doi.org/10.1038/35038112>.
- Weisend, Carla M., Jean A. Kundert, Elena S. Suvorova, Justin R. Prigge, et Edward E. Schmidt. 2009. « CRE ACTIVITY IN FETAL albCre MOUSE HEPATOCYTES: UTILITY FOR DEVELOPMENTAL STUDIES ». *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 47 (12): 789-92. <https://doi.org/10.1002/dvg.20568>.
- West, Jason A., Srinivas R. Viswanathan, Akiko Yabuuchi, Kerianne Cunniff, Ayumu Takeuchi, In-Hyun Park, Julia E. Sero, et al. 2009. « A Role for Lin28 in Primordial Germ-Cell Development and Germ-Cell Malignancy ». *Nature* 460 (7257): 909-13. <https://doi.org/10.1038/nature08210>.
- Wouters-Tyrou, D., A. Martinage, P. Chevaillier, et P. Sautière. 1998. « Nuclear Basic Proteins in Spermiogenesis ». *Biochimie* 80 (2): 117-28. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(98\)80018-7](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(98)80018-7).
- Wu, Xin, Shaun M. Goodyear, John W. Tobias, Mary R. Avarbock, et Ralph L. Brinster. 2011. « Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Requires ETV5-Mediated Downstream Activation of Brachyury in Mice ». *Biology of Reproduction* 85 (6): 1114-23. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091793>.
- Xiong, Shiqin, Gloria Salazar, Nikolay Patrushev, et R. Wayne Alexander. 2011. « FoxO1 Mediates an Autofeedback Loop Regulating SIRT1 Expression * ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (7): 5289-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.163667>.
- Xiong, Weipeng, Haikun Wang, Hui Wu, Yongmei Chen, et Daishu Han. 2009. « Apoptotic Spermatogenic Cells Can Be Energy Sources for Sertoli Cells ». *Reproduction (Cambridge, England)* 137 (3): 469-79. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0343>.
- Xu, Robert X., Millard H. Lambert, Bruce B. Wisely, Erin N. Warren, Emily E. Weinert, Gregory M. Waitt, Jon D. Williams, et al. 2004. « A Structural Basis for Constitutive Activity in the Human CAR/RXRalpha Heterodimer ». *Molecular Cell* 16 (6): 919-28. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.042>.
- Xu, P. Wan, M. Wang, J. Zhang, X. Gao, B. Hu, J. Han, et al. 2015. « AIP1-Mediated Actin Disassembly Is Required for Postnatal Germ Cell Migration and Spermatogonial Stem Cell Niche Establishment ». *Cell Death & Disease* 6 (7): e1818-e1818. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.182>.
- Yamaji, Masashi, Yoshiyuki Seki, Kazuki Kurimoto, Yukihiro Yabuta, Mihoko Yuasa, Mayo Shigeta, Kaori Yamanaka, Yasuhide Ohinata, et Mitinori Saitou. 2008. « Critical Function of Prdm14 for the Establishment of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Nature Genetics* 40 (8): 1016-22. <https://doi.org/10.1038/ng.186>.
- Yamamoto, Yukio, Rick Moore, Thomas L. Goldsworthy, Masahiko Negishi, et Robert R. Maronpot. 2004. « The Orphan Nuclear Receptor Constitutive Active/Androstane Receptor Is Essential for Liver Tumor Promotion by Phenobarbital in Mice ». *Cancer Research* 64 (20): 7197-7200. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1459>.
- Yamamoto, Yukio, Rick Moore, Holly A. Hess, Grace L. Guo, Frank J. Gonzalez, Kenneth S. Korach, Robert R. Maronpot, et Masahiko Negishi. 2006. « Estrogen Receptor Alpha Mediates 17alpha-Ethinylestradiol Causing Hepatotoxicity ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (24): 16625-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602723200>.

- Yan, Jinfeng Chen, Min Li, Wenying Xuan, Dongming Su, Hui You, Yujie Huang, Nuoqi Chen, et Xiubin Liang. 2016. « A Decrease in Hepatic MicroRNA-9 Expression Impairs Gluconeogenesis by Targeting FOXO1 in Obese Mice ». *Diabetologia* 59 (7): 1524-32. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3932-5>.
- Yan, Viviana A. Lavin, Leta R. Moser, Qinghua Cui, Cindy Kanies, et Elizabeth Yang. 2008. « PP2A Regulates the Pro-apoptotic Activity of FOXO1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (12): 7411-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708083200>.
- Yang, Hua, Hong-Min Ni, Fengli Guo, Yifeng Ding, Ying-Hong Shi, Pooja Lahiri, Leopold F. Fröhlich, et al. 2016. « Sequestosome 1/p62 Protein Is Associated with Autophagic Removal of Excess Hepatic Endoplasmic Reticulum in Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (36): 18663-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.739821>.
- Yang, Qi-En, Dongwon Kim, Amy Kaucher, Melissa J. Oatley, et Jon M. Oatley. 2013. « CXCL12–CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells ». *Journal of Cell Science* 126 (4): 1009-20. <https://doi.org/10.1242/jcs.119826>.
- Yang, Yang, Ying Zhao, Wenjuan Liao, Jing Yang, Lipeng Wu, Zhixing Zheng, Yu Yu, et al. 2009. « Acetylation of FoxO1 Activates Bim Expression to Induce Apoptosis in Response to Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide Treatment ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (4): 313-24.
- Yang, Yonghua, Huayan Hou, Edward M. Haller, Santo V. Nicosia, et Wenlong Bai. 2005. « Suppression of FOXO1 Activity by FHL2 through SIRT1-Mediated Deacetylation ». *The EMBO Journal* 24 (5): 1021-32. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600570>.
- Yao, Jianfei, Haiyang Zuo, Jun Gao, Mingming Wang, Dong Wang, et Xiangdong Li. 2017. « The Effects of IGF-1 on Mouse Spermatogenesis Using an Organ Culture Method ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 491 (3): 840-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.125>.
- Yarushkin, Andrei A., Mark E. Mazin, Yuliya A. Pustyl'nyak, Elena A. Prokopyeva, et Vladimir O. Pustyl'nyak. 2020. « Activation of the Akt Pathway by a Constitutive Androstane Receptor Agonist Results in β -Catenin Activation ». *European Journal of Pharmacology* 879 (juillet): 173135. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173135>.
- Ye, S. J., L. Ying, S. Ghosh, L. R. de França, et L. D. Russell. 1993. « Sertoli Cell Cycle: A Re-Examination of the Structural Changes during the Cycle of the Seminiferous Epithelium of the Rat ». *The Anatomical Record* 237 (2): 187-98. <https://doi.org/10.1002/ar.1092370206>.
- Yefimova, Marina G., Amina Sow, Isabelle Fontaine, Vincent Guilleminot, Nadine Martinat, Pascale Crepieux, Sylvie Canepa, et al. 2008. « Dimeric Transferrin Inhibits Phagocytosis of Residual Bodies by Testicular Rat Sertoli Cells ». *Biology of Reproduction* 78 (4): 697-704. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063107>.
- Ying, S. Y. 1988. « Inhibins, Activins, and Follistatins: Gonadal Proteins Modulating the Secretion of Follicle-Stimulating Hormone ». *Endocrine Reviews* 9 (2): 267-93. <https://doi.org/10.1210/edrv-9-2-267>.
- Yomogida, Kentaro, Yo Yagura, Yuko Tadokoro, et Yoshitake Nishimune. 2003. « Dramatic Expansion of Germinal Stem Cells by Ectopically Expressed Human Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Mouse Sertoli Cells ». *Biology of Reproduction* 69 (4): 1303-7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.015958>.
- Yoshida, Shosei, Mamiko Sukeno, et Yo-Ichi Nabeshima. 2007. « A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis ». *Science (New York, N.Y.)* 317 (5845): 1722-26. <https://doi.org/10.1126/science.1144885>.
- Yoshida, Shosei, Mamiko Sukeno, Toshinori Nakagawa, Kazuyuki Ohbo, Go Nagamatsu, Toshio Suda, et Yo-ichi Nabeshima. 2006. « The First Round of Mouse

- Spermatogenesis Is a Distinctive Program That Lacks the Self-Renewing Spermatogonia Stage ». *Development (Cambridge, England)* 133 (8): 1495-1505. <https://doi.org/10.1242/dev.02316>.
- Yoshida, Shosei, Ayumi Takakura, Kazuyuki Ohbo, Kuniya Abe, Junko Wakabayashi, Masayuki Yamamoto, Toshio Suda, et Yo-Ichi Nabeshima. 2004. « Neurogenin3 Delineates the Earliest Stages of Spermatogenesis in the Mouse Testis ». *Developmental Biology* 269 (2): 447-58. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.036>.
- Yoshinari, Kouichi, Kaoru Kobayashi, Rick Moore, Takeshi Kawamoto, et Masahiko Negishi. 2003. « Identification of the Nuclear Receptor CAR:HSP90 Complex in Mouse Liver and Recruitment of Protein Phosphatase 2A in Response to Phenobarbital ». *FEBS Letters* 548 (1-3): 17-20.
- Yuan, Chengfu, Lei Wang, Liang Zhou, et Zheng Fu. 2014. « The function of FOXO1 in the late phases of the cell cycle is suppressed by PLK1-mediated phosphorylation ». *Cell Cycle* 13 (5): 807-19. <https://doi.org/10.4161/cc.27727>.
- Yuen, Benjamin T. K., Kelly M. Bush, Bonnie L. Barrilleaux, Rebecca Cotterman, et Paul S. Knoepfler. 2014. « Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 141 (18): 3483-94. <https://doi.org/10.1242/dev.106450>.
- Zangar, R. C., D. L. Springer, et D. R. Buhler. 1993. « Alterations in Cytochrome P-450 Levels in Adult Rats Following Neonatal Exposure to Xenobiotics ». *Journal of Toxicology and Environmental Health* 38 (1): 43-55. <https://doi.org/10.1080/15287399309531699>.
- Zegers-Hochschild, F., G. D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, S. Vanderpoel, International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, et World Health Organization. 2009. « International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary of ART Terminology, 2009 ». *Fertility and Sterility* 92 (5): 1520-24. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.009>.
- Zelko, I., T. Sueyoshi, T. Kawamoto, R. Moore, et M. Negishi. 2001. « The Peptide near the C Terminus Regulates Receptor CAR Nuclear Translocation Induced by Xenochemicals in Mouse Liver ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (8): 2838-46. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.8.2838-2846.2001>.
- Zhang, Jinju, Xiaomei Liu, Yun Zhang, Zuo Luan, Yinxiang Yang, Zhaoyan Wang, et Chun Zhang. 2018. « Human Neural Stem Cells with GDNF Site-Specific Integration at AAVS1 by Using AAV Vectors Retained Their Stemness ». *Neurochemical Research* 43 (4): 930-37. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2498-7>.
- Zhang, Jun, Wendong Huang, Steven S. Chua, Ping Wei, et David D. Moore. 2002. « Modulation of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity by the Xenobiotic Receptor CAR ». *Science (New York, N.Y.)* 298 (5592): 422-24. <https://doi.org/10.1126/science.1073502>.
- Zhang, Jun, Wendong Huang, Mohammed Qatanani, Ronald M. Evans, et David D. Moore. 2004. « The Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Function Coordinately to Prevent Bile Acid-Induced Hepatotoxicity ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (47): 49517-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409041200>.
- Zhang, Lei, Jiangjing Tang, Christopher J. Haines, Huai L. Feng, Liangxue Lai, Xiaoming Teng, et Yibing Han. 2011. « C-Kit and Its Related Genes in Spermatogonial Differentiation ». *Spermatogenesis* 1 (3): 186-94. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.3.17760>.
- Zhao, Ping Lu, Cong Wan, Yaping Huang, Manman Cui, Xinyan Yang, Yuqiong Hu, et al. 2021. « Cell-Fate Transition and Determination Analysis of Mouse Male Germ Cells

- throughout Development ». *Nature Communications* 12 (1): 6839.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27172-0>.
- Zhao, Jing Yang, Wenjuan Liao, Xiangyu Liu, Hui Zhang, Shan Wang, Donglai Wang, Jingnan Feng, Li Yu, et Wei-Guo Zhu. 2010. « Cytosolic FoxO1 Is Essential for the Induction of Autophagy and Tumour Suppressor Activity ». *Nature Cell Biology* 12 (7): 665-75.
<https://doi.org/10.1038/ncb2069>.
- Zheng, Ke, Xin Wu, Klaus H. Kaestner, et Peijing Jeremy Wang. 2009. « The Pluripotency Factor LIN28 Marks Undifferentiated Spermatogonia in Mouse ». *BMC Developmental Biology* 9 (juin): 38. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-38>.
- Zhou, Qing, Ying Li, Rong Nie, Patrick Friel, Debra Mitchell, Ryan M. Evanoff, Derek Pouchnik, et al. 2008. « Expression of Stimulated by Retinoic Acid Gene 8 (Stra8) and Maturation of Murine Gonocytes and Spermatogonia Induced by Retinoic Acid in Vitro ». *Biology of Reproduction* 78 (3): 537-45.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064337>.
- Zhuang, Tiangang, Rex A. Hess, Venkatadri Kolla, Mayumi Higashi, Tobias D. Raabe, et Garrett M. Brodeur. 2014. « CHD5 Is Required for Spermiogenesis and Chromatin Condensation ». *Mechanisms of Development* 131 (février): 35-46.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2013.10.005>.
- Zirkin, Barry R, et Vassilios Papadopoulos. 2018. « Leydig cells: formation, function, and regulation ». *Biology of Reproduction* 99 (1): 101-11.
<https://doi.org/10.1093/biolre/i0y059>.
- Zorgniotti, A. W., et A. I. Sealfon. 1988. « Measurement of Intrascrotal Temperature in Normal and Subfertile Men ». *Journal of Reproduction and Fertility* 82 (2): 563-66.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820563>.