



**HAL**  
open science

# La signalisation oestrogénique : effets dans le testicule et perturbation par le bisphénol A et les mycotoxines du genre *Fusarium*

Maëva Drouault

► **To cite this version:**

Maëva Drouault. La signalisation oestrogénique : effets dans le testicule et perturbation par le bisphénol A et les mycotoxines du genre *Fusarium*. Reproduction sexuée. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC212 . tel-04573028

**HAL Id: tel-04573028**

**<https://theses.hal.science/tel-04573028>**

Submitted on 13 May 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.



Normandie Université

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**La signalisation oestrogénique : effets dans le testicule et perturbation par le bisphénol A et les mycotoxines du genre Fusarium**

Présentée et soutenue par  
**MAEVA DROUULT**

Thèse soutenue le 10/05/2022  
devant le jury composé de

MME SEVERINE MAZAUD-GUITTOT	Chargé de recherche HDR, UNIVERSITE RENNES 1	Rapporteur du jury
MME VIRGINIE ROUILLER FABRE	Professeur des universités, UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Rapporteur du jury
M. VINCENT CAVAILLÈS	Directeur de recherche, Université de Montpellier	Membre du jury
M. VINCENT HANOUX	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury Co-encadrant
M. DAVID GARON	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
MME CHRISTELLE LECAPITAINE	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **CHRISTELLE LECAPITAINE (Oestrogènes, reproduction, cancer (Caen))**,



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement





## | Remerciements

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la Région Normandie, qui m'a permis, grâce à une allocation doctorale, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à l'ensemble des membres du jury, pour le temps qu'ils ont accepté de consacrer à l'évaluation de ce travail de thèse : à Mme Séverine Mazaud-Guittot & Mme Virginie Rouiller-Fabre pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à M. Vincent Cavallès & M. David Garon pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je remercie Mme Christelle Delalande et M. Vincent Hanoux, qui ont encadré cette thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce projet, pour vos précieux conseils et votre aide dans la rédaction de ce manuscrit, ainsi que pour votre disponibilité. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec vous pendant ces 3 ans.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du laboratoire OeReCa, Hélène, Christophe, Brice, Pierre-Jacques, Annie, Jeannine, Hemily, ainsi qu'à tous les stagiaires que j'ai eu le plaisir de croiser. Merci pour les moments de convivialité partagés autour d'un café, d'un pot ou un repas.

Je remercie également tous ceux qui, de près ou de loin, ont été impliqués dans ce projet de recherche. En particulier, merci à Benoit et Julien de la plateforme PROTEOGEN pour leur aide et leur accueil chaleureux. Un grand merci à Nicolas du CMAbio3 pour ses nombreux conseils dans l'élaboration des protocoles d'histologie et son aide précieuse dans l'analyse des images.

J'ai bien sûr une pensée particulière pour Marion, mon binôme de thèse. Ces trois années n'auraient pas été les mêmes sans toi. Merci pour ta présence, ton soutien et ton grain de folie ! Merci aussi d'avoir profité de ton exil dans « le nord » pour enrichir mon vocabulaire en expressions du Sud-Ouest. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

J'adresse enfin mes remerciements à ceux qui me sont chers. A ma famille et mes proches, merci pour votre soutien sans faille, vous ne sauriez imaginer à quel point il m'est précieux. Je souhaite ici exprimer toute ma gratitude à mes parents, qui m'ont encouragée à me lancer sur cette voie. Avec la confiance que vous avez placée en moi, vous m'avez permis d'avancer. Et à toi JB, qui a toujours su trouver les mots justes pour me motiver dans les moments de doute. Je suis chanceuse de t'avoir à mes côtés, merci pour tout ce que tu m'apportes.



## | Résumé

La signalisation œstrogénique étant impliquée dans la mise en place et la régulation de la spermatogenèse, les xœstrogènes (des perturbateurs endocriniens capables d'interférer avec la signalisation œstrogénique) pourraient ainsi être associés au déclin de la fertilité masculine observé ces dernières décennies. Dans ce contexte, une précédente étude *in vivo* conduite chez le rat par notre équipe indique qu'une exposition en période prépubère (15 à 30 jpp) au 17 $\beta$ -œstradiol (E2 ; œstrogène endogène) retarde la mise en place de la spermatogenèse tandis que le bisphénol A (BPA ; xœstrogène) promeut sa progression chez les animaux immatures. De plus, le BPA altère l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire (BHT) chez le rat prépubère. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité de cette étude. Une exposition à ces substances en période pubère ne semble pas affecter le déroulement de la spermatogenèse chez les animaux adultes. De plus, les altérations dans la mise en place de celle-ci en période prépubère ne semblent pas altérer son déroulement chez les animaux adultes, et l'effet délétère du BPA sur l'intégrité de la BHT observé chez les animaux immatures apparaît réversible. L'ensemble de ces travaux désigne ainsi la période prépubère comme une fenêtre de sensibilité accrue aux œstrogènes et aux xœstrogènes. Le développement d'un modèle de culture organotypique d'explants testiculaires de rats de 15, 20 et 25 jpp a permis d'étudier les effets directs de l'E2, du BPA, mais aussi de la zéaralénone (ZEA ; xœstrogène) au cours de la fenêtre de la période prépubère ciblée lors de l'étude *in vivo*. Ces trois molécules perturbent de paramètres liés à la stéroïdogénèse et à la spermatogenèse dans les explants testiculaires de rat immature. Cependant, cette étude *ex vivo* révèle l'existence de fenêtres de sensibilité distinctes à l'E2, au BPA et à la ZEA au cours de la période prépubère. La ZEA est une mycotoxine produite par les champignons du genre *Fusarium*, également capables de produire une autre mycotoxine, le déoxynivaléol (DON). Le DON est décrit comme un puissant inhibiteur de la synthèse protéique, mais certaines données suggèrent l'existence d'autres mécanismes d'action. Nous avons évalué l'effet du DON sur la signalisation œstrogénique grâce à une approche *in vitro* conduite dans des cellules de carcinome mammaire, couramment utilisées à cette fin. Cette approche *in vitro* a mis en évidence que le DON active la signalisation œstrogénique dans les cellules MCF-7 au travers de l'activation du récepteur ESR1 selon la voie indépendante du ligand.



# | Sommaire

Liste des figures.....	1
Liste des tableaux.....	1
Liste des abréviations.....	3
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>Chapitre 1   Le testicule.....</b>	<b>9</b>
I. Anatomie du testicule adulte.....	9
1. Le testicule, place dans l'appareil reproducteur masculin et anatomie.....	9
2. Le tissu interstitiel.....	11
3. Les tubes séminifères.....	12
i. Les cellules de Sertoli.....	13
ii. Les cellules germinales et la spermatogenèse.....	16
iii. Organisation spatio-temporelle de la spermatogenèse.....	21
II. Régulation de la spermatogenèse.....	23
1. Régulation endocrine de la spermatogenèse.....	23
2. Régulation paracrine et autocrine de la spermatogenèse.....	25
i. Les stéroïdes.....	25
ii. Les facteurs de croissance et les cytokines.....	26
3. L'apoptose des cellules germinales.....	27
III. Mise en place de la spermatogenèse chez le rat.....	28
1. Période néonatale.....	30
2. Période infantile.....	30
i. Période infantile précoce.....	30
ii. Période infantile tardive.....	31
3. Période juvénile.....	31
4. Période péri-pubère.....	32
5. Période pubère.....	32
<b>Chapitre 2   La signalisation œstrogénique.....</b>	<b>33</b>
I. Biosynthèse des œstrogènes.....	33
II. Récepteurs aux œstrogènes.....	34
1. Les récepteurs nucléaires – ESR1 et ESR2.....	34



2.	Le récepteur transmembranaire – GPER .....	37
III.	Mécanismes d'action des œstrogènes et de leurs récepteurs .....	37
1.	Voie génomique .....	38
i.	Voie génomique directe .....	39
ii.	Voie génomique indirecte .....	39
2.	Voie non-génomique .....	40
3.	Voie indépendante du ligand .....	40
4.	Effet des œstrogènes indépendant des récepteurs .....	41
5.	Modulation de la signalisation œstrogénique par la voie PPAR $\gamma$ .....	41
IV.	La signalisation œstrogénique dans le testicule .....	43
1.	Expression des récepteurs aux œstrogènes dans le testicule .....	43
2.	Rôles de la signalisation œstrogénique dans le testicule .....	44
i.	Apport des modèles de souris transgéniques .....	44
ii.	Apport des expériences de privation ou d'exposition aux œstrogènes .....	48

### **Chapitre 3 | Les perturbateurs endocriniens** .....

I.	Contexte et généralités .....	53
1.	Émergence du concept de perturbation endocrinienne .....	53
2.	Définition et généralités .....	54
3.	Principaux mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens .....	56
i.	Modification de la concentration hormonale .....	56
ii.	Altération de l'expression du récepteur hormonal .....	57
iii.	Interaction avec les récepteurs hormonaux .....	57
4.	Perturbateurs endocriniens et fonction de reproduction chez le mâle .....	58
5.	Les xœstrogènes .....	60
II.	Le bisphénol A .....	61
1.	Généralités .....	61
2.	Exposition de la population au bisphénol A .....	61
3.	Prise en charge du bisphénol A par l'organisme .....	62
4.	Mécanismes d'action du bisphénol A .....	64
5.	Effets du bisphénol A sur l'organisme .....	64
6.	Effets du bisphénol A sur les fonctions testiculaires et le spermatozoïde .....	66
i.	Études épidémiologiques .....	66
ii.	Études expérimentales .....	66

7. Émergence de l'utilisation d'analogues au bisphénol A .....	70
III. Les mycotoxines .....	72
1. Généralités .....	72
2. Exposition de la population à la zéaralénone et au déoxynivalénol .....	73
3. Prise en charge de la zéaralénone et du déoxynivalénol par l'organisme .....	74
4. Mécanismes d'action de la zéaralénone et du déoxynivalénol .....	76
5. Effets de la zéaralénone et du déoxynivalénol sur l'organisme .....	77
6. Effets de la zéaralénone et du déoxynivalénol sur les fonctions testiculaires et le spermatozoïde .....	77
i. Études épidémiologiques .....	77
ii. Études expérimentales .....	78
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>83</b>
<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>89</b>
<b>Chapitre 1   Effets des œstrogènes et des xœstrogènes sur le testicule</b> .....	<b>91</b>
<b>Article 1</b> : Effects of bisphenol A and estradiol in adult rat testis after prepubertal and pubertal exposure .....	93
<b>Article 2</b> : Effects of 17 $\beta$ -estradiol in prepubertal rat testis .....	133
<b>Article 3</b> : Effects of bisphenol A and zearalenone in prepubertal rat testis .....	169
<b>Chapitre 2   Effet du déoxynivalénol sur la signalisation œstrogénique</b> .....	<b>205</b>
<b>Article 4</b> : Deoxynivalenol enhances estrogen receptor alpha-induced signaling by ligand-independent transactivation .....	207
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE &amp; PERSPECTIVES</b> .....	<b>243</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>255</b>
Bibliographie .....	257



## | Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Anatomie de l'appareil reproducteur masculin .....	9
<b>Figure 2</b> : Structure interne du testicule .....	10
<b>Figure 3</b> : Structure des tubes séminifères et du tissu interstitiel péritubulaire .....	10
<b>Figure 4</b> : Stéroïdogénèse testiculaire.....	11
<b>Figure 5</b> : Structure des tubes séminifères .....	13
<b>Figure 6</b> : Fonctions des cellules de Sertoli .....	14
<b>Figure 7</b> : Les différentes phases de la spermatogenèse .....	16
<b>Figure 8</b> : Modèle de prolifération spermatogonale de Clermont et Bustos-Obregon (1968) .....	17
<b>Figure 9</b> : Modèles de prolifération spermatogonale de Huckins (1971) .....	18
<b>Figure 10</b> : Spermio-genèse chez le rat .....	20
<b>Figure 11</b> : Stades de l'épithélium séminifère chez le rat (I-XIV) .....	22
<b>Figure 12</b> : Organisation spatiale des stades de l'épithélium séminifère .....	22
<b>Figure 13</b> : Régulation endocrine de la spermatogenèse par l'axe HPG.....	23
<b>Figure 14</b> : Voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque.....	27
<b>Figure 15</b> : Mise en place de la spermatogenèse chez le rat .....	29
<b>Figure 16</b> : Structure générale des récepteurs nucléaires ESR1 et ESR2 .....	34
<b>Figure 17</b> : Variants d' <i>Esr1</i> et <i>Esr2</i> identifiés dans le testicule de rat adulte .....	36
<b>Figure 18</b> : Structure du récepteur transmembranaire GPER.....	37
<b>Figure 19</b> : La signalisation œstrogénique .....	38
<b>Figure 20</b> : Variation de l'expression d'ESR1 et ESR2.....	44
<b>Figure 21</b> : Relation dose-effet monotone et non-monotone .....	54
<b>Figure 22</b> : Principaux mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens .....	57
<b>Figure 23</b> : Évolution du nombre de spermatozoïdes et de l'incidence d'anomalies des organes généitaux masculins .....	58
<b>Figure 24</b> : Prise en charge du BPA par l'organisme chez les rongeurs .....	63
<b>Figure 25</b> : Impact du BPA sur la santé humaine .....	65
<b>Figure 26</b> : Évolution de la législation relative à l'utilisation du BPA, quelques dates clé .....	70
<b>Figure 27</b> : Structures du BPA et de ses principaux analogues .....	71
<b>Figure 28</b> : Contamination de la chaîne alimentaire par la ZEA et le DON .....	73
<b>Figure 29</b> : Prise en charge de la ZEA par l'organisme chez les rongeurs .....	75
<b>Figure 30</b> : Prise en charge du DON par l'organisme chez les rongeurs .....	75
<b>Figure 31</b> : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude <i>in vivo</i> (ARTICLE 1).....	92
<b>Figure 32</b> : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude <i>ex vivo</i> (ARTICLE 2) .....	132
<b>Figure 33</b> : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude <i>ex vivo</i> (ARTICLE 3) .....	168
<b>Figure 34</b> : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude <i>in vitro</i> (ARTICLE 4).....	206
<b>Figure 35</b> : Effet de l'E2 sur la méiose dans les explants testiculaires de rat de 25 jpp.....	249

## | Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Comparaison du développement post-natal chez l'homme et le rat .....	29
<b>Tableau II</b> : Caractéristiques des différents modèles de souris transgéniques .....	45
<b>Tableau III</b> : Liste non exhaustive de substances classifiées en tant que PE (reconnu ou potentiel) ...	56
<b>Tableau IV</b> : Concentrations urinaires de BPA chez des enfants et des adultes dans différents pays .	62
<b>Tableau V</b> : Prévalence de la ZEA et du DON dans les céréales.....	74



## | Liste des abréviations

### Chiffres

---

**15d-PGJ<sub>2</sub>** : 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2

### A

---

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADNc** : ADN complémentaire  
**AF-1** : Fonction de transactivation 1  
**AF-2** : Fonction de transactivation 2  
**Akt** : Sérine-thréonine protéine kinase  
**AMH** : Hormone Anti-Mullerienne  
**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique  
**AP-1** : Activator Protein 1  
**Apaf1** : Apoptotic peptidase activating factor 1  
**AR** : Récepteur aux androgènes  
**ARKO** : Knock-out de AR  
**ArKO** : Knock-out de l'aromatase  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**AROM<sup>+</sup>** : Surexpression de l'aromatase

### B

---

**Bax** : Bcl-2-associated X protein  
**Bcl-2** : B-cell lymphoma 2  
**Bcl-xL** : B-cell lymphoma-extra large  
**BHT** : Barrière hémato-testiculaire  
**BP** : Bisphénol  
**BPA** : Bisphénol A  
**BPA-G** : BPA-glucuronide  
**BPA-S** : BPA-sulfate

### C

---

**CDKN1B** : Cyclin dependent kinase inhibitor 1B  
**CREB** : cAMP response element-binding protein  
**CREM** : cAMP response element modulator  
**CTD** : domaine C-terminal  
**CYP11A1/Cyp450scc** : Cytochrome 450 side-chain clivage

**CYP17A1** : Cytochrome P450c17  
**CYP19A1** : Cytochrome P450 aromatase

### D

---

**DBD** : Domaine de liaison à l'ADN  
**DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane  
**DES** : Diéthylstilbestrol  
**DHEA** : Déhydroépiandrostérone  
**DHT** : Dihydrotestostérone  
**DOM** : Dé-époxy DON  
**DON** : Déoxynivalénol  
**DON-G** : DON-glucuronide

### E

---

**E2** : 17 $\beta$ -œstradiol  
**EDS** : Éthane diméthane sulfonate  
**EGF** : Epidermal Growth Factor  
**EGFR** : Récepteur à l'EGF  
**ENERKI** : Estrogen Non responsive Estrogen Receptor 1 Knock-In  
**ER** : Récepteur aux œstrogènes  
**ERE** : Élément de réponse aux œstrogènes  
**ERK** : Extracellular signal-regulated kinase  
**ERR $\gamma$**  : Estrogen-related receptor gamma  
**ES** : Épithélium séminifère  
**ESR1 / ER $\alpha$**  : Récepteur aux œstrogènes 1 /  $\alpha$   
**ESR1/2KO** : Double knock-out d'ESR1 et ESR2  
**ESR1KO** : Knock-out d'ESR1  
**ESR2 / ER $\beta$**  : Récepteur aux œstrogènes 2 /  $\beta$   
**ESR2KO** : Knock-out d'ESR2

### F

---

**FADD** : Fas-Associated protein with Death Domain  
**FGF** : Fibroblast Growth Factor  
**FSH** : Follicle stimulating hormone  
**FSHR** : Récepteur à la FSH

## G

---

**GnRH** : Gonadotropin-Releasing Hormone  
**GPER** : G-protein couple estrogen receptor  
**GPERKO** : Knock-out de GPER  
**GUS** :  $\beta$ -glucuronidase

## H

---

**hpg** : Souris hypogonadotrope  
**HPG** : Axe hypothalamo-hypophysogonadique  
**HSD** : Hydroxystéroïdes déshydrogénases  
**hsp** : Heat shock protein

## I

---

**IGF1** : Insulin-like Growth Factor 1  
**IGFR** : Récepteur à l'IGF  
**IL-1** : Interleukine 1  
**INSL3** : Insulin-like hormone 3

## J

---

**jpc** : Jour *post-coitum*  
**jpp** : Jour *post-partum*

## K

---

**KI** : Knock-in  
**KO** : Knock-out

## L

---

**LBD** : Domaine de liaison au ligand  
**LH** : Luteinizing hormone  
**LHR** : Récepteur à la LH  
**LIF** : Leukemia inhibitory factor

## M

---

**MAPK** : Mitogen activated protein kinase  
**MCF-7** : Michigan Cancer Foundation-7  
**MDA-MB-231** : M.D. Anderson-Metastatic Breast-231

## N

---

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**NF- $\kappa$ B** : Nuclear factor-  $\kappa$ B  
**NGF** : Nerve growth factor

**NLS** : Nuclear localisation signal  
**NOER** : Souris nuclear-only ESR1  
**NTD** : Domaine N-terminal

## O

---

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

## P

---

**p90-RSK** : p90 ribosomal S6 kinase  
**PCNA** : Proliferating cell nuclear antigen  
**PCR** : Polymerase chain reaction  
**PE** : Perturbateur endocrinien  
**PFA** : Paraformaldéhyde  
**PI3K** : Phosphatidylinositol 3-kinase  
**PKB** : Protéine kinase B  
**PPAR** : peroxisome proliferator-activated receptor  
**PPRE** : Éléments de réponse aux PPAR  
**PR** : Récepteur à la progestérone  
**PTM-ARKO** : Knock-out sélectif de AR dans les cellules myoïdes périvitubulaires

## R

---

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène  
**RXR** : Récepteur X des rétinoïdes

## S

---

**SC-ARKO** : Knock-out sélectif de AR dans les cellules de Sertoli  
**SCF** : Stem Cell Factor  
**SCP3** : Synaptonemal complex protein 3  
**SDT** : Syndrome de dysgénésie testiculaire  
**SHBG** : sex hormone-binding globulin

**siARN** : Petit ARN interférant  
**Sp-1** : Stimulating protein 1  
**StAR** : Steroidogenic acute regulatory protein  
**SULT** : Sulfotransférases

## T

---

**TBT** : Tributylétain  
**TER** : Résistance électrique trans-épithéliale  
**TFF1/PS2** : Trefoil factor 1  
**TGF- $\beta$**  : Transforming growth factor  $\beta$   
**TNF $\alpha$**  : Tumor necrosis factor  $\alpha$   
**TS** : Tubes séminifères  
**TUNEL** : Terminal dUTP transferase nick end labelling

## U

---

**UGT** : UDP-glucuronyl-transférase

## V

---

**VEGFA** : Vascular endothelial growth factor A

## Z

---

**ZEA** : Zéaralénone  
**ZEA-G** : ZEA-glucuronide  
**ZOL** : zéaralenol





---

# INTRODUCTION

---

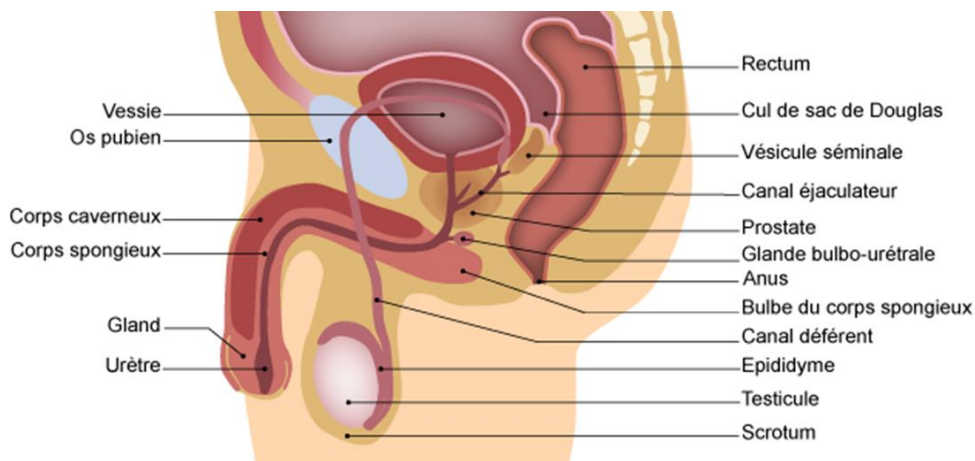


# Chapitre 1 | Le testicule

## I. Anatomie du testicule adulte

### 1. Le testicule, place dans l'appareil reproducteur masculin et anatomie

L'appareil reproducteur masculin comprend les deux gonades (les testicules) responsables de la production des gamètes mâles (les spermatozoïdes) ; les voies excrétrices (les canaux efférents, l'épididyme et les canaux déférents) qui permettent la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes ; les glandes annexes (les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales) qui participent à la formation du plasma séminal composant le sperme ; ainsi que l'urètre, un canal à la fois urinaire et génital (Figure 1).

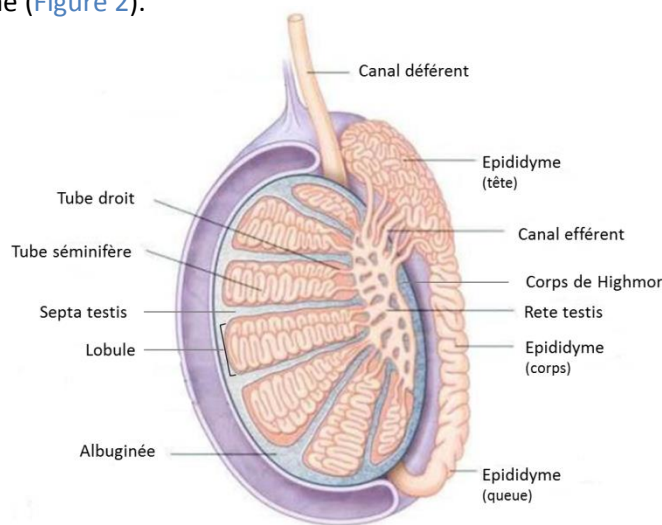


**Figure 1 : Anatomie de l'appareil reproducteur masculin**

(d'après <https://www.soins-infirmiers.com/discipline/gynecologie-obstetrique/anatomie-de-lappareil-reproducteur-masculin>)

Chez la plupart des mammifères, les testicules sont situés à l'extérieur de la cavité abdominale, dans une poche cutanée appelée scrotum. Cette position externe permet de maintenir les testicules à une température 3 à 5°C inférieure à celle du corps (34°C chez l'homme, 32°C chez le rat), primordiale pour le bon déroulement de la spermatogenèse (Mieusset et al., 1987). Chaque testicule est recouvert d'une membrane fibreuse épaisse, l'albuginée, dont l'épaississement au pôle supérieur du testicule forme le corps d'Highmore à partir duquel partent des cloisons appelées *septa testis* divisant le testicule en 250 à 300 lobules (Figure 2). Chacun de ces lobules testiculaires est composé de 1 à 4 tubes séminifères espacés par du tissu interstitiel (Figure 3). Il faut toutefois noter que les *septa testis*, présents chez l'homme, sont des structures qui n'existent pas chez les rongeurs.

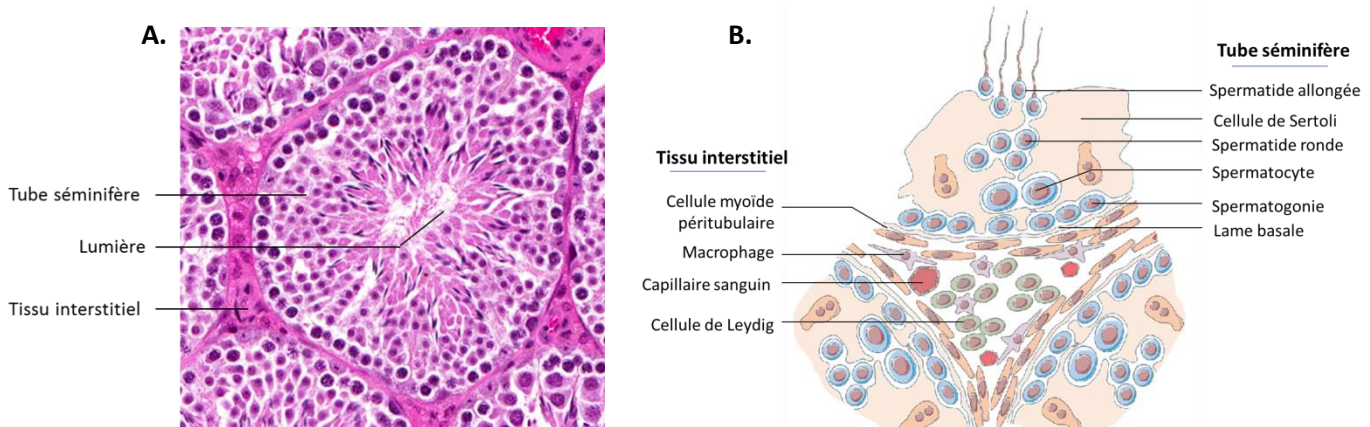
Les tubes séminifères de chaque lobule convergent pour former un segment rectiligne, le tube droit, qui débouche dans un réseau de canaux appelé *rete testis*. Les canaux du *rete testis* débouchent dans les canaux efférents, qui permettent l'acheminement des spermatozoïdes produits par le testicule dans l'épididyme (Figure 2).



**Figure 2 : Structure interne du testicule**

(d'après <http://anatomie-fmpm.uca.ma/wp-content/uploads/2020/07/App-genital-masculin.pdf>)

Le testicule est un organe mixte qui possède deux fonctions : une fonction exocrine assurée par les tubes séminifères, la spermatogenèse, et une fonction endocrine principalement assurée par les cellules de Leydig du tissu interstitiel, la synthèse hormonale. Bien que les compartiments interstitiels et tubulaires soient anatomiquement distincts (Figure 3), leurs fonctions sont étroitement liées.



**Figure 3 : Structure des tubes séminifères et du tissu interstitiel péricubulaire**

**A.** Coupe transversale de testicule de souris observé au microscope **B.** Représentation schématique de la coupe transversale de testicule (modifiée d'après l'illustration originale de Oliver and Stukenborg, 2020))

## 2. Le tissu interstitiel

Le tissu interstitiel remplit l'espace entre les tubes séminifères. C'est un tissu conjonctif lâche, riche en vaisseaux lymphatiques et sanguins qui assurent l'apport en nutriments nécessaires à la spermatogenèse. Le tissu interstitiel est composé de plusieurs types cellulaires, notamment les cellules de Leydig, mais aussi d'un nombre significatif de cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes) (Figure 3). Décrites pour la première fois au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle par Franz von Leydig, les cellules de Leydig sont des cellules somatiques polygonales présentes dans le tissu interstitiel périvitubulaire, isolées ou en amas (Leydig, 1850). La principale fonction des cellules de Leydig est de produire les stéroïdes, nécessaires pour la régulation paracrine de la spermatogenèse au sein des tubes séminifères ainsi que pour de nombreuses autres fonctions de l'organisme (Zirkin & Papadopoulos, 2018).

La stéroïdogénèse testiculaire est un processus complexe aboutissant notamment à la formation des stéroïdes sexuels : les androgènes, notamment la testostérone, et les œstrogènes. La biosynthèse de ces stéroïdes s'effectue à partir d'un substrat unique, le cholestérol (synthétisé *de novo* ou provenant de source extracellulaire), et fait intervenir un ensemble d'enzymes, principalement des cytochromes P450 et des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD) (Figure 4) (Zirkin & Papadopoulos, 2018).

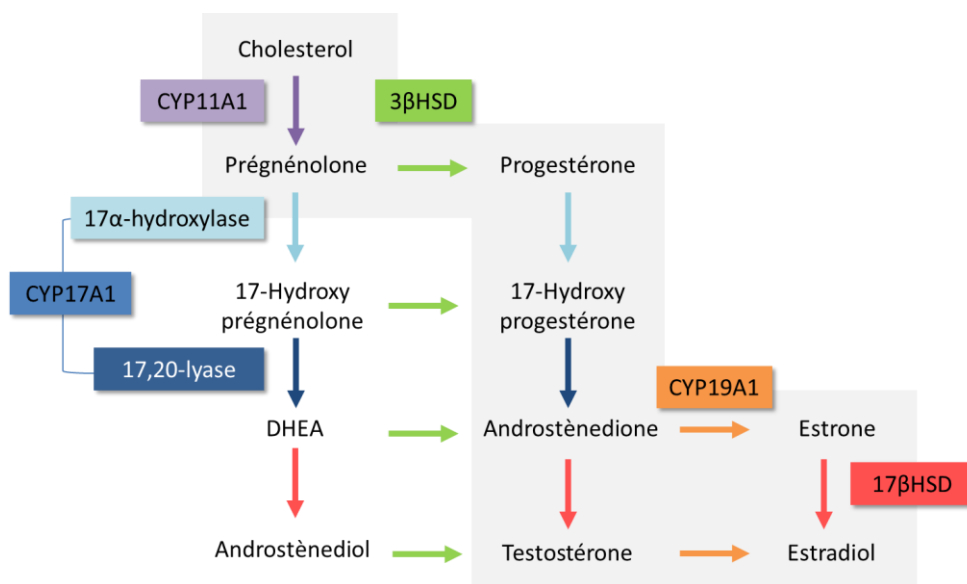


Figure 4 : Stéroïdogénèse testiculaire

La partie grisée représente la voie  $\Delta_4$ , principale voie de la stéroïdogénèse chez les rongeurs

En amont de la cascade de réactions enzymatiques, le cholestérol est transporté au niveau de la membrane mitochondriale interne par la Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). Le transport du cholestérol à la mitochondrie est une étape clé limitante de la stéroïdogénèse. Le cholestérol est alors transformé en prégnénolone par le cytochrome 450 *side-chain clivage* (scc ; également connu sous le nom de CYP11A1), qui catalyse le clivage de la chaîne latérale du cholestérol. A partir de cette étape, deux voies permettent d'aboutir à la biosynthèse de la testostérone : la voie  $\Delta 4$  et la voie  $\Delta 5$ , respectivement majoritaires chez les rongeurs (Greco & Payne, 1994) et chez l'homme (Flück et al., 2003; Huhtaniemi et al., 1970).

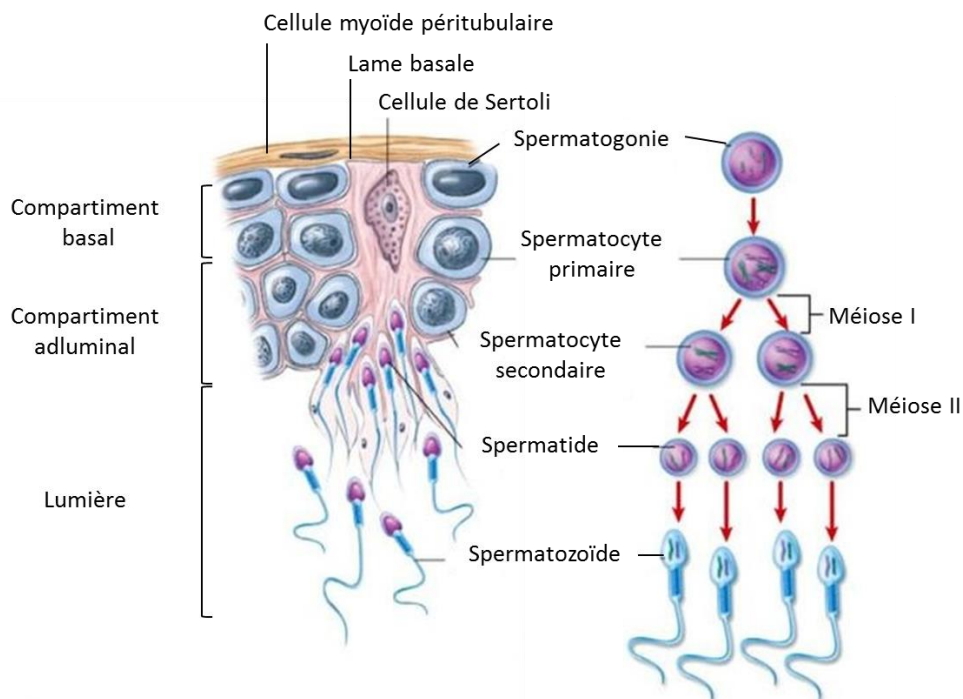
- ❖ **Voie  $\Delta 4$**  (rongeurs) : la prégnénolone est utilisée comme substrat de la  $3\beta$ HSD pour former la progestérone. La progestérone est elle-même transformée en androstènedione par le cytochrome P450c17 (CYP17A1), possédant à la fois une activité  $17\alpha$ -hydroxylase et une activité  $17,20$ -lyase. L'androstènedione est le précurseur de la testostérone, formée par l'action de la  $17\beta$ HSD (Greco & Payne, 1994).
- ❖ **Voie  $\Delta 5$**  (homme) : tout d'abord, la conversion de la prégnénolone en déhydro-épiandrostérone (DHEA) est catalysée par la double activité de CYP17A1. La DHEA est ensuite transformée en androstènediol par la  $17\beta$ HSD. Puis, l'androstènediol est converti en testostérone par la  $3\beta$ HSD (Flück et al., 2003; Huhtaniemi et al., 1970).

Il est à noter que le passage d'une voie à une autre est possible à chaque étape de la stéroïdogénèse grâce à l'action de la  $3\beta$ HSD. La testostérone ainsi formée est le substrat de l'aromatase (CYP19A1) qui catalyse sa conversion irréversible en  $17\beta$ -œstradiol (E2), l'œstrogène prédominant et le plus actif (voir Chapitre 2 I.).

### 3. Les tubes séminifères

Les tubes séminifères sont des structures hautement organisées qui assurent la fonction exocrine du testicule, la spermatogénèse, mais qui interviennent également dans la biosynthèse d'E2 (voir Chapitre 2 I.). Ils sont délimités par les cellules myoïdes périvitubulaires, notamment responsables de la synthèse de composants de la matrice extracellulaire et assurant ainsi le maintien de la structure du tube séminifère (Thompson et al., 1995). Ces cellules reposent sur la lame basale, principalement composée de laminine et de collagène de type IV (Kahsai et al., 1997). Les tubes séminifères sont composés de différents types cellulaires : des cellules somatiques, les cellules de Sertoli, et les cellules de la lignée germinale à différents stades de maturation, les spermatogonies, spermatocytes et spermatides (Figure 5).

L'ensemble de ces cellules constitue l'épithélium séminifère. Chaque tube séminifère s'ouvre en son centre sur la « lumière » dans laquelle sont libérés les spermatozoïdes produits avant d'être acheminés au *rete testis* grâce à la contraction des cellules myoïdes périvitubulaires (Maekawa et al., 1996).



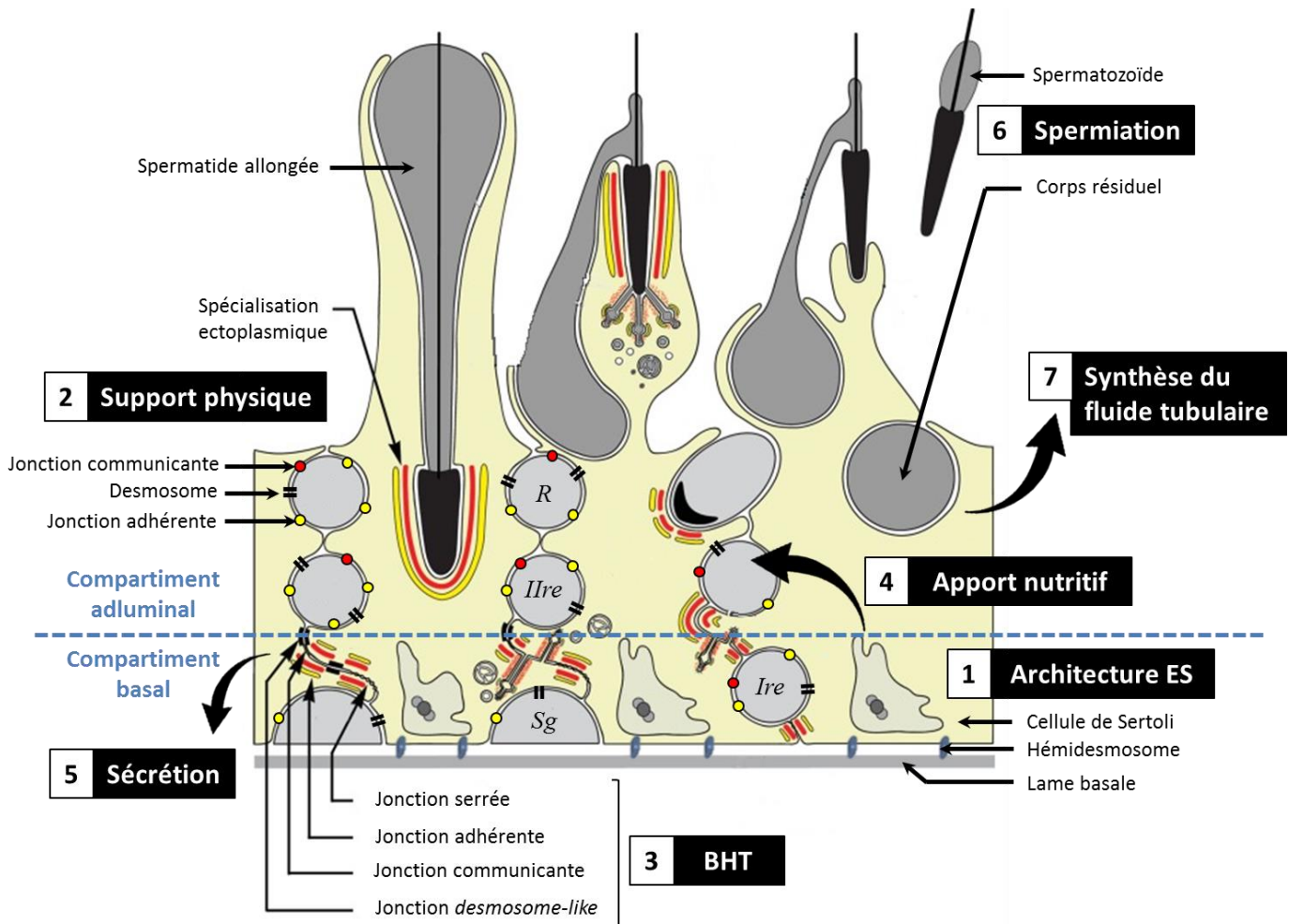
**Figure 5: Structure des tubes séminifères**

(modifié d'après [http://people.eku.edu/ritchisong/308\\_notes\\_7.htm](http://people.eku.edu/ritchisong/308_notes_7.htm))

### i. Les cellules de Sertoli

Décrites pour la première fois en 1865 par Enrico Sertoli (Sertoli, 1865), les cellules de Sertoli sont de grandes cellules somatiques pyramidales et polarisées qui s'étendent sur toute l'épaisseur de l'épithélium séminifère. Elles sont à la fois en contact avec les cellules de Sertoli adjacentes et avec 30 à 50 cellules germinales (Skinner, 1991). Les cellules de Sertoli assurent plusieurs fonctions essentielles au bon déroulement de la spermatogenèse, notamment des fonctions structurales et trophiques (Figure 6).





**Figure 6 : Fonctions des cellules de Sertoli**

(Modifié d'après l'illustration originale de Hess and Vogl, 2014)

Les cellules de Sertoli assurent le maintien de l'architecture de l'épithélium séminifère (ES) grâce à leur ancrage à la lame basale par les hémidésmosomes (1). Par ailleurs, les cellules de Sertoli constituent le support physique des cellules germinales (*Sg*, spermatogonie ; *Ire*, spermatocyte primaire ; *Ire*, spermatocyte secondaire ; *R*, spermatide ronde) grâce à différentes structures de jonction mises en place au cours du développement des cellules germinales (appelées spécialisations ectoplasmiques dans le cas des spermatozoïdes allongés) (2). La barrière hémato-testiculaire (BHT) établie entre cellules de Sertoli adjacentes sépare l'ES en deux compartiments, le compartiment basal et le compartiment adluminal, créant ainsi un microenvironnement spécialisé nécessaire au développement des cellules germinales post-méiotiques (3). Les cellules de Sertoli sont responsables de la synthèse et de l'apport de nutriments aux cellules germinales situées dans le compartiment adluminal (4) ainsi que de la sécrétion de certains facteurs (hormones, facteurs de croissance...) (5). Elles jouent un rôle dans la spermiation (6) et synthétisent le fluide tubulaire nécessaire au transport des spermatozoïdes (7).

### ❖ Fonctions structurales

Attachées à la lame basale du tube séminifère par des hémidesmosomes, les cellules de Sertoli jouent tout d'abord un rôle dans le maintien de la structure de l'épithélium séminifère (Figure 6.1).

Par ailleurs, ces cellules somatiques constituent le support physique des cellules germinales (Figure 6.2). Les spermatogonies et les spermatocytes adhèrent aux cellules de Sertoli par l'intermédiaire de différents types de jonction et de protéines d'adhésion tels que les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes, et les desmosomes (Mruk & Cheng, 2004). L'adhésion des spermatides allongées aux cellules de Sertoli est quant à elle assurée par des structures de jonction particulières appelées spécialisations ectoplasmiques (Wong et al., 2008).

Enfin, le bon déroulement de la spermatogenèse nécessite la mise en place d'un microenvironnement spécialisé. Ce dernier est établi par un ensemble de jonctions existant entre cellules de Sertoli adjacentes, qui forme la barrière hémato-testiculaire (BHT) (Figure 6.3). L'établissement de la BHT résulte principalement de la formation de jonctions serrées mais implique également des jonctions communicantes, des jonctions adhérentes et des jonctions *desmosome-like* (Mruk & Cheng, 2015). La BHT sépare l'épithélium séminifère en deux compartiments : le compartiment basal constitué des spermatogonies et des spermatocytes préleptotènes, et le compartiment adluminal contenant les spermatocytes à des stades plus avancés et les spermatides. La BHT isole les cellules germinales les plus matures de la circulation sanguine et lymphatique. Ainsi, la BHT permet le passage sélectif de composants (provenant du tissu interstitiel) du compartiment basal vers le compartiment adluminal, notamment afin de protéger les cellules germinales haploïdes du système immunitaire (Cheng et al., 2010).

### ❖ Fonction trophique

Les cellules germinales les plus matures étant isolées de la circulation sanguine par la BHT, les cellules de Sertoli sont responsables de la synthèse et de l'apport d'éléments nutritifs (acides aminés, glucides, lipides, et vitamines) à ces cellules. Ainsi, les cellules de Sertoli ont une fonction trophique pour les cellules germinales (Figure 6.4) (Griswold, 1995).

### ❖ Autres fonctions

Les cellules de Sertoli sont également responsables de la sécrétion d'un certain nombre de facteurs nécessaires au bon déroulement de la spermatogenèse (hormones, facteurs de croissances, protéases et anti-protéases, précurseurs énergétiques tels que le lactate et le pyruvate) (Figure 6.5) (Mather et al., 1983). De plus, les cellules de Sertoli interviennent dans la migration des cellules germinales au sein de l'épithélium séminifère (Mruk & Cheng, 2004; Russell, 1977; Smith & Braun, 2012), ainsi que dans la phagocytose des cellules germinales dégénérantes (Chemes, 1986).

Par ailleurs, les cellules de Sertoli sont impliquées dans la spermiation (Figure 6.6) (O'Donnell et al., 2011) et synthétisent le fluide tubulaire nécessaire au transport des spermatozoïdes (Figure 6.7) (Richburg et al., 1994).

## ii. Les cellules germinales et la spermatogenèse

La spermatogenèse consiste en la différenciation des cellules germinales (spermatogonies, spermatocytes et spermatides) aboutissant à la formation des spermatozoïdes. Ce processus complexe est mis en place à la puberté et se poursuit tout au long de la vie. Il peut être divisé en 3 phases : une première phase de prolifération, suivie de la phase de méiose puis de la phase de spermiogenèse (Figure 7).

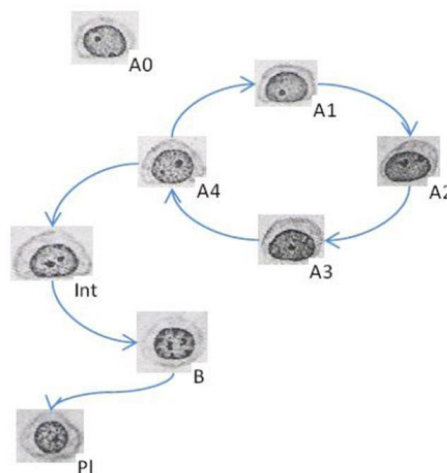


**Figure 7 : Les différentes phases de la spermatogenèse**  
(d'après Dyn et Fawcett, 1971)

### ❖ Phase 1 – Prolifération

La spermatogenèse est initiée par une phase de prolifération des spermatogonies. Ces cellules germinales localisées dans le compartiment basal du tube séminifère sont des cellules diploïdes. On distingue plusieurs populations de cellules spermatogoniales fonctionnellement distinctes qui permettent le maintien ou le renouvellement du stock de spermatogonies ainsi que l'engagement dans des phases de « maturation » aboutissant à la formation des spermatocytes primaires. A l'heure actuelle, deux modèles sont généralement admis pour expliquer le déroulement de la phase de prolifération spermatogonale chez le rat, le modèle de Clermont & Bustos-Obregon et le modèle de Huckins.

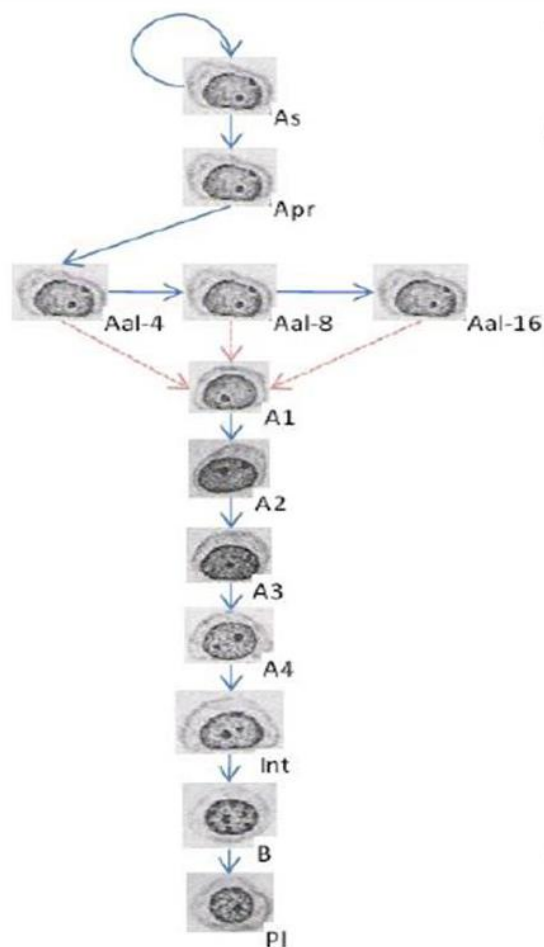
D'après le modèle de Clermont & Bustos-Obregon, il existe deux types de spermatogonies. Les spermatogonies « de réserve », aussi appelées spermatogonies A0, sont des cellules isolées qui assurent le maintien du stock de cellules spermatogoniales et ne prolifèrent pas en condition physiologique. Les spermatogonies « de renouvellement », c'est-à-dire les spermatogonies A1, A2, A3 et A4, permettent quant à elles d'initier la spermatogenèse. Au travers d'une série de mitoses, les spermatogonies A1 se divisent en spermatogonies A2, qui se divisent à leur tour en spermatogonies A3, elles-mêmes se divisant pour former les spermatogonies A4. Les spermatogonies A4 sont capables de se diviser en spermatogonie A1, formant de cette manière une boucle d'amplification, ou en une spermatogonie intermédiaire, poursuivant ainsi le processus de spermatogenèse. Les spermatogonies intermédiaires évoluent en spermatogonies de type B qui se divisent en spermatocytes primaires à l'issue d'une dernière mitose (Figure 8) (Clermont & Bustos-Obregon, 1968).



**Figure 8: Modèle de prolifération spermatogonale de Clermont et Bustos-Obregon (1968)**

A0, spermatogonie « de réserve » isolée ; A1-A4, spermatogonies « de renouvellement » A1 à A4 ; Int, spermatogonie intermédiaire ; B : spermatogonie de type B ; PI : spermatocyte préleptotène.

**Selon un second modèle proposé par Huckins**, les spermatogonies de types A isolées (*A single*, *As*) subissent des divisions homonymes afin d'assurer leur auto-renouveaulement. Le processus de spermatogenèse est initié par une division hétéronyme incomplète à l'issue de laquelle sont formées deux spermatogonies appariées par un mince pont cytoplasmique (*A paired*, *Apr*). Les spermatogonies *Apr* se divisent successivement et forment des chaînes de 4, 8 puis 16 clones de spermatogonies A alignées (*Aal*). Ces spermatogonies *Aal* se différencient ensuite en spermatogonies *A1* qui, au travers d'une série de mitoses, se divisent en spermatogonies *A2*, *A3*, puis *A4*. Les spermatogonies *A4* se divisent ensuite en spermatogonies intermédiaires, qui se divisent à leur tour une dernière fois pour former les spermatocytes primaires (**Figure 9**) (Huckins, 1971).



**Figure 9 : Modèles de prolifération spermatogonale de Huckins (1971)**

*As*, spermatogonie A isolée ; *Apr*, spermatogonie A appariée ; *Aal*, spermatogonie A alignée ; *A1-A4*, spermatogonies A1 à A4 ; *Int*, spermatogonie intermédiaire ; *B* : spermatogonie de type B ; *PI* : spermatocyte préleptotène.

## ❖ Phase 2 – Méiose

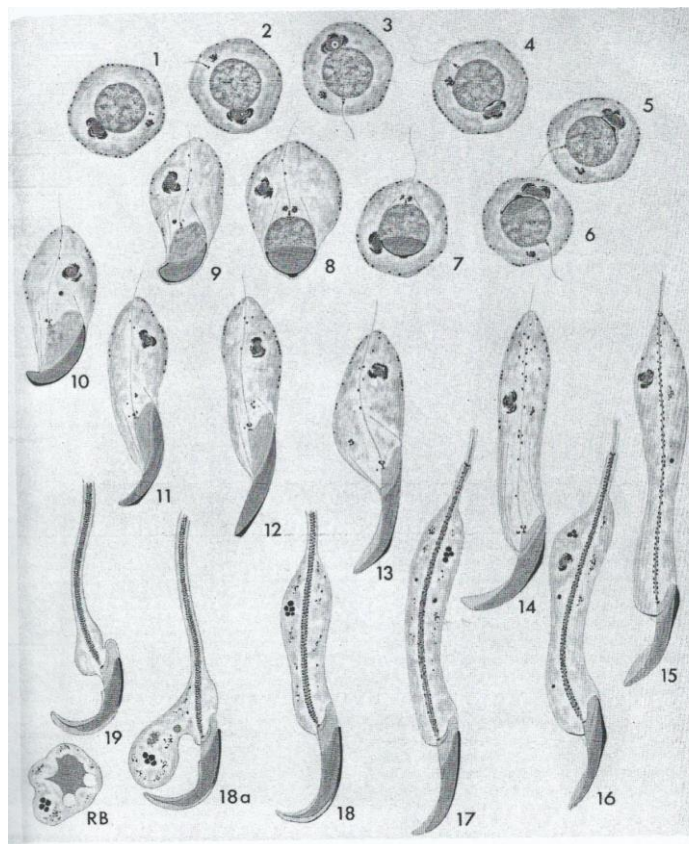
La méiose constitue la seconde phase de la spermatogenèse. Composée de deux divisions successives (réductionnelle et équationnelle), la méiose permet l'obtention de quatre cellules germinales haploïdes, les spermatides, à partir d'une cellule germinale diploïde, le spermatocyte primaire (Figure 5).

Les spermatocytes primaires formés à l'issue de la première phase de la spermatogenèse entrent immédiatement en phase préleptotène de la méiose (réplication des chromosomes). Ils entament ensuite la prophase de la première division méiotique (prophase I), composée des stades leptotène, zygotène, pachytène et diplotène (Griswold, 2016). La condensation des chromosomes débute au stade leptotène, avant l'appariement des chromosomes homologues qui s'effectue grâce à la mise en place des complexes synaptonémaux au stade zygotène. Ces derniers permettent la recombinaison chromosomique (*crossing-over*) qui se déroule au cours du stade pachytène (Griswold, 2016). Enfin, le stade diplotène marque la disparition des complexes synaptonémaux entraînant la séparation des chromosomes homologues, excepté au niveau des chiasmata. A cette longue prophase I font rapidement suite la métaphase I (migration des chromosomes au niveau de la plaque équatoriale), l'anaphase I (séparation des chromosomes homologues) et la télophase I, incomplète (formation seulement partielle du noyau). Les cellules germinales issues de la première division de méiose sont ainsi des cellules haploïdes avec des chromosomes à deux chromatides, les spermatocytes secondaires (Griswold, 2016). Ces derniers entament directement la seconde division de méiose. Ne nécessitant ni la réplication de l'ADN, ni la recombinaison des chromosomes, la seconde division de méiose progresse rapidement et est d'environ 14h chez le rat (Clermont et al., 1959). Elle conduit à la séparation des chromatides sœurs et résulte ainsi en cellules germinales haploïdes avec des chromosomes à une chromatide, les spermatides rondes.

## ❖ Phase 3 – Spermiogenèse

La spermiogenèse constitue la dernière phase de la spermatogenèse, elle consiste en la différenciation des spermatides rondes issues de la méiose en spermatozoïdes. Ainsi, cette phase terminale est composée d'évènements majeurs qui modifient grandement la morphologie cellulaire : la formation de l'acrosome, la compaction du noyau, la formation du flagelle, et la réduction cytoplasmique. L'ensemble de ces évènements s'effectue en plusieurs étapes bien définies. Le nombre d'étapes composant la spermiogenèse varie selon l'espèce considérée et s'élève au nombre de 8 chez l'homme, 16 chez la souris, et 19 chez le rat (Leblond & Clermont, 1952).

Chez le rat, l'initiation de la spermiogenèse correspond aux étapes 1 à 3, au cours desquelles l'appareil de Golgi synthétise les vésicules pro-acrosomiques. A l'étape 4, leur fusion forme la vésicule acrosomiale qui évoluera progressivement au cours des étapes 5 à 8 pour former l'acrosome, une grande structure plaquée sur le noyau. Cette structure essentielle pour la fécondation contient des enzymes lysosomiales. Au cours de la formation de l'acrosome, un changement de polarité de la spermatide s'effectue. La compaction du noyau débute ensuite durant les étapes 9 à 11 et s'accélère au cours du remplacement progressif des variants testiculaires d'histone tels que l'histone H1t par les protéines de transition pendant les étapes 12 et 13, elles-mêmes remplacées par les protamines au cours des étapes 16 à 19. Dans le même temps, la formation du flagelle initiée à partir du centriole distal au cours des étapes 2 et 3 se poursuit et les cellules deviennent progressivement des spermatides allongées (Leblond & Clermont, 1952). Par la suite, la réorganisation des mitochondries en manchon mitochondrial autour de l'axonème forme la pièce intermédiaire du futur spermatozoïde. Enfin, à l'étape 19, les composants cytoplasmiques en excès sont éliminés pour constituer un corps résiduel qui sera phagocyté par les cellules de Sertoli (Figure 10) (Breucker et al., 1985).



**Figure 10 : Spermiogenèse chez le rat**  
1-19 : étapes de la spermiogenèse ; RB : corps résiduel  
(Russel et al, 1993)

### ❖ Phase additionnelle – Maturation post-testiculaire

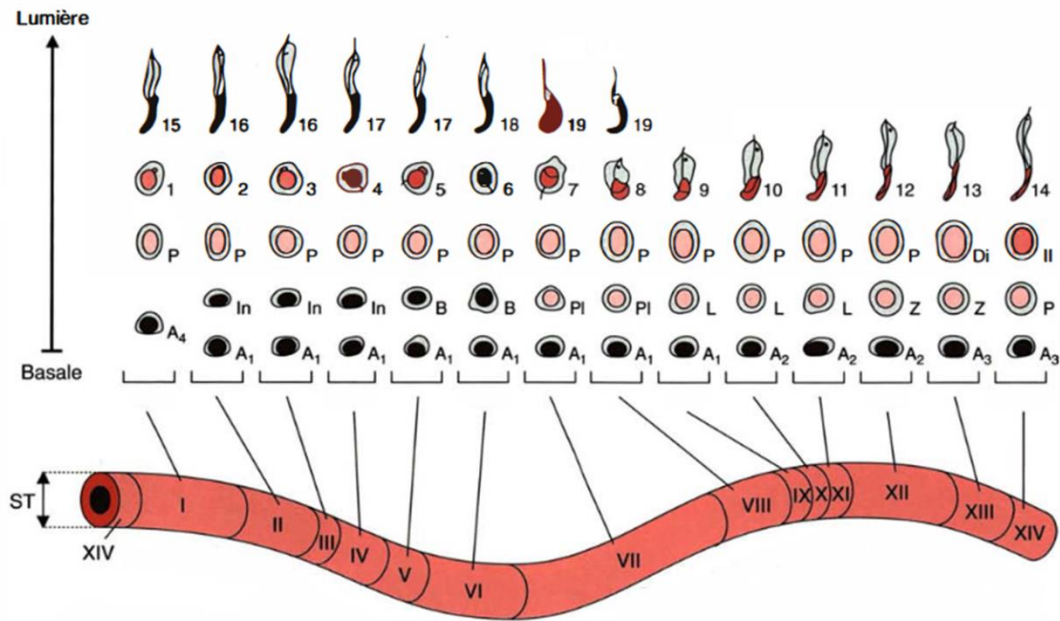
A l'issue de la dernière étape de la spermiogenèse, les spermatides allongées se détachent des cellules de Sertoli (spermiation) et sont alors appelées spermatozoïdes (O'Donnell et al., 2011). Ces derniers sont libérés dans la lumière des tubes séminifères et sont acheminés jusqu'au *rete testis* grâce au fluide testiculaire sécrété par les cellules de Sertoli et à la contraction des cellules myoïdes pérیتubulaires (Maekawa et al., 1996; Richburg et al., 1994). En effet, à ce stade, les spermatozoïdes ne sont pas mobiles, ils acquièrent cette propriété au cours de leur maturation post-testiculaire dans l'épididyme (Sullivan & Miesusset, 2016).

### iii. Organisation spatio-temporelle de la spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus cyclique. Un cycle spermatogénique correspond à la durée nécessaire pour qu'une spermatogonie entrant en méiose parvienne au stade de spermatozoïde mature. La durée de la spermatogenèse est fixe pour une espèce donnée mais varie selon l'espèce considérée. Elle est de 35 jours chez la souris, 52 jours chez le rat, et 74 jours chez l'homme (Clermont, 1972).

Au sein de l'épithélium séminifère, les cellules germinales, en étroite association avec les cellules de Sertoli, sont disposées en couches superposées : les spermatogonies sont situées en périphérie du tube séminifère au niveau de la lame basale et les spermatides sont proches du centre du tube séminifère en bordure de la lumière (Figure 5). Chaque association spécifique définit un stade de l'épithélium séminifère, notamment caractérisé par l'état de différenciation des cellules germinales et par le niveau de maturation des spermatides. Ces stades sont au nombre de 12 (I à XII) chez la souris, 14 (I à XIV) chez le rat et 6 (I à VI) chez l'homme. La succession de ces stades définit un cycle de l'épithélium séminifère (Leblond & Clermont, 1952) (Figure 11) qui constitue la « vague de spermatogenèse ». Ainsi, la durée d'un cycle de l'épithélium séminifère correspond à l'intervalle de temps séparant l'entrée de deux générations de spermatogonies dans le cycle, elle est de 8,6 jours chez la souris et 12,5 jours chez le rat. Cette organisation temporelle permet la production continue de spermatozoïdes.

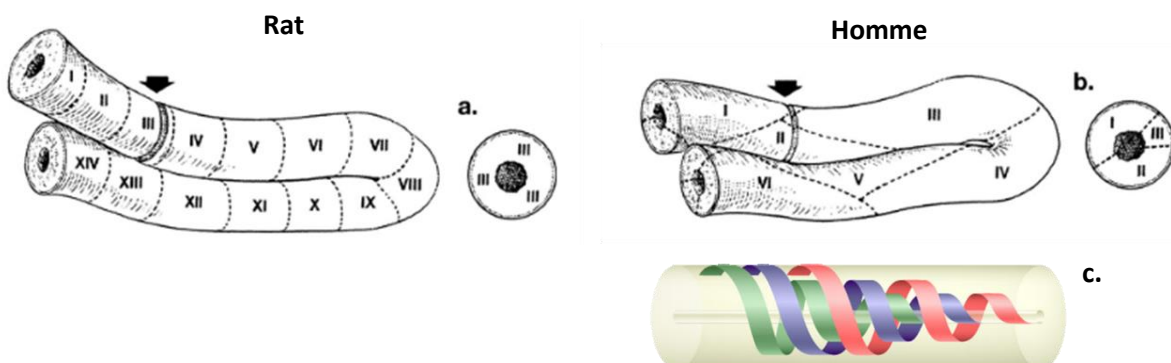




**Figure 11 : Stades de l'épithélium séminifère chez le rat (I-XIV)**

ST, tube séminifère ; A1-A4, spermatogonie A1 à A4 ; In, spermatogonie intermédiaire ; B, spermatogonie de type B ; Pl, spermatocyte préleptotène ; L, spermatocyte leptotène ; Z, spermatocyte zygotène ; P, spermatocyte pachytène ; Di, spermatocyte diplotène ; II, spermatocyte secondaire ; 1-19, spermatide aux stades 1 à 19 de la spermiogenèse. (D'après Jégou et al., 1995)

On distingue deux types d'organisation spatiale des stades le long de l'axe longitudinal d'un tube séminifère (Figure 12). Chez les rongeurs, les stades se succèdent de manière linéaire. Ainsi, un seul stade est visible sur une section transversale de tube séminifère de rat. Chez l'homme en revanche, les stades sont organisés de manière hélicoïdale, progressant de la périphérie vers la lumière du tube séminifère. De ce fait, il est possible d'observer trois stades sur une section transversale de tube séminifère humain (Silber, 2010).



**Figure 12 : Organisation spatiale des stades de l'épithélium séminifère**

Organisation linéaire chez le rat (a.) et hélicoïdale chez l'homme (b. et c.).

I-XIV représentent les stades de l'épithélium séminifère ; la flèche représente le plan de coupe (D'après Silber, 2010 et <http://www.embryology.ch/francais/cgametogen/spermato04.html>)

## II. Régulation de la spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus complexe finement régulé par les hormones produites par le complexe hypothalamo-hypophysaire (régulation endocrine), mais aussi par des facteurs locaux produits par les cellules somatiques et les cellules germinales (régulation paracrine et autocrine). Par ailleurs, le bon déroulement de la spermatogenèse est dépendant de l'apoptose cellulaire.

### 1. Régulation endocrine de la spermatogenèse

La régulation endocrine de la spermatogenèse est assurée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG) (Figure 13). Chez le mâle, cet axe comprend le complexe hypothalamo-hypophysaire, un ensemble fonctionnel situé à la base du cerveau composé de l'hypothalamus de l'hypophyse (ou glande pituitaire), ainsi que le testicule. La sécrétion pulsatile de *Gonadotropin-Releasing Hormone* (GnRH) par l'hypothalamus stimule la sécrétion de deux gonadotrophines hypophysaires : la *Luteinizing Hormone* (LH) et la *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH). Au niveau de la gonade, la LH et la FSH régulent la physiologie testiculaire en se fixant à leurs récepteurs transmembranaires spécifiques LHR et FSHR, principalement localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli respectivement (Ramaswamy & Weinbauer, 2014).

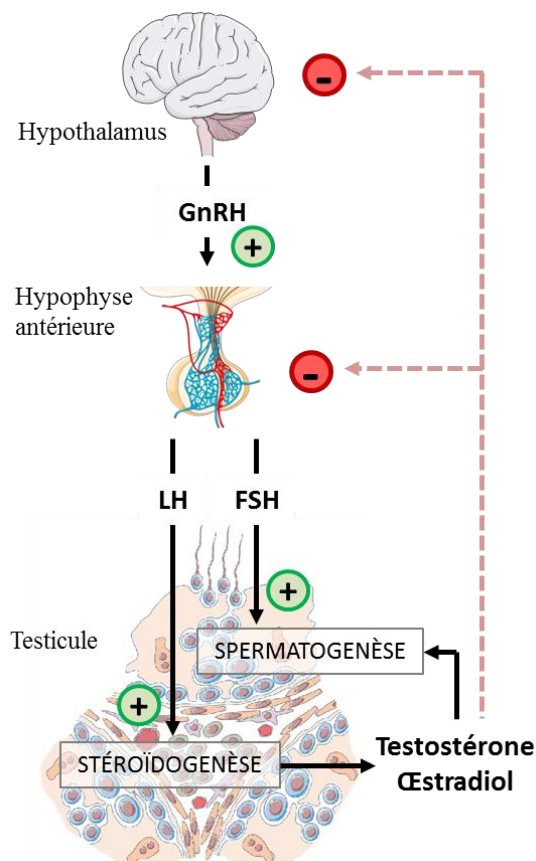


Figure 13 : Régulation endocrine de la spermatogenèse par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

La GnRH sécrétée par l'hypothalamus stimule (+) la sécrétion des gonadotrophines par l'hypophyse antérieure. Dans les tubes séminifères, la FSH stimule la spermatogenèse par l'intermédiaire des cellules de Sertoli. Dans le compartiment interstitiel, la LH stimule la stéroïdogénèse leydigienne et augmente les niveaux de testostérone et d'œstradiol. Ces stéroïdes sexuels exercent un effet paracrine sur la spermatogenèse et mettent en place une boucle de rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire qui inhibe (-) la production des gonadotrophines hypophysaires.

GnRH : *Gonadotropin-Releasing Hormone* ; FSH : *Follicle-Stimulating Hormone* ; LH : *Luteinizing Hormone*

L'implication du complexe hypothalamo-hypophysaire dans la régulation des fonctions testiculaires a été mise en évidence par des expériences d'hypophysectomie chirurgicale ou chimique, et plus récemment par des expériences de mutagenèse et d'inactivation de gènes (*knock-out*). Chez le rat un traitement avec un antagoniste de la GnRH inhibe la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires, et induit une augmentation de l'apoptose des cellules germinales (Billig et al., 1995; Hikim et al., 1995). Ces études démontrent le rôle clé de la LH et la FSH dans la régulation de la spermatogenèse.

L'hypophysectomie de souris adultes induit une diminution importante du nombre de spermatocytes pachytènes et de spermatides rondes. Cependant, un apport exogène en FSH permet de restaurer le nombre de cellules germinales chez ces animaux (O'Shaughnessy, 2014; O'Shaughnessy et al., 2010). Certaines études attribuent ce résultat au rôle anti-apoptotique de la FSH. En effet, chez les souris hypophysectomisées, la FSH diminue l'apoptose des spermatocytes pachytènes et des spermatides rondes (Russell et al., 1993). De plus, l'administration d'anticorps anti-FSH lors de la mise en place de la première vague de spermatogenèse induit une augmentation de l'apoptose des cellules germinales (Meachem et al., 2005; Ruwanpura et al., 2008). Par ailleurs, chez le rat prépubère, un traitement à la FSH stimule la prolifération des spermatogonies (McLachlan et al., 2002; Meachem et al., 1996; Walczak-Jedrzejowska et al., 2007). Chez la souris, une mutation de la sous-unité  $\beta$  de la FSH et le KO de FSHR entraînent une diminution du volume testiculaire associé à une diminution du nombre de cellules de Sertoli et de spermatozoïdes. Cependant, les animaux demeurent fertiles dans les deux cas (Dierich et al., 1998; O'Shaughnessy et al., 2012). Ainsi, il apparaît que la FSH joue un rôle important dans le déroulement de la spermatogenèse, en régulant le nombre de cellules de Sertoli, la prolifération des spermatogonies et l'entrée en méiose.

Chez la souris, une mutation de la sous-unité  $\beta$  de la LH et le KO de LHR induisent une chute des niveaux sérique et testiculaire de testostérone, associée à un arrêt de la spermatogenèse au stade spermatides rondes (Lei et al., 2001). Par ailleurs, la LH est indispensable à l'initiation de la spermatogenèse. En effet, une mutation « gain de fonction » dans le récepteur à la LH induit une initiation précoce de la spermatogenèse chez des souris prépubères (McGee & Narayan, 2013). Au contraire, la privation de LH chez le rat prépubère induit une importante diminution du nombre de spermatocytes pachytènes et une absence de spermatide (Chemes and Raj, 1979). Ainsi, les effets de la LH sur la spermatogenèse sont liés à son effet direct sur la stéroïdogénèse. Notamment, les effets de la LH sont relayés par la testostérone produite par les cellules de Leydig et partiellement aromatisée en  $17\beta$ -estradiol, qui exerce une régulation paracrine sur la spermatogenèse (voir Chapitre 1, II. 2.). En plus de leur effet paracrine sur le testicule, la testostérone et le  $17\beta$ -estradiol agissent au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire et exercent un rétrocontrôle négatif sur la production des gonadotrophines hypophysaires (Hayes et al., 2001, 2000).

## 2. Régulation paracrine et autocrine de la spermatogenèse

Outre la régulation endocrine exercée par l'axe HPG, la spermatogenèse est régulée de façon paracrine et autocrine par de nombreux facteurs produits localement par les cellules testiculaires somatiques et les cellules germinales. Parmi les facteurs paracrines et autocrines intervenant dans la régulation de la spermatogenèse, les stéroïdes (notamment les androgènes et les œstrogènes) jouent un rôle clé, ainsi que les facteurs de croissance et les cytokines.

### i. Les stéroïdes

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes, notamment impliqués dans le développement et le maintien des caractères sexuels masculins primaires et secondaires. La testostérone est la principale hormone androgénique. Son action est médiée par le récepteur aux androgènes (AR), un récepteur nucléaire. La voie génomique classique est généralement considérée comme le mécanisme d'action principal des androgènes : la liaison de la testostérone à AR induit la translocation du complexe ligand-récepteur au noyau où il se lie aux éléments de réponse aux androgènes situés dans les régions promotrices des gènes cibles afin de réguler leur expression (Verhoeven et al., 2010). Dans le testicule, AR est exprimé dans les cellules de Leydig, les cellules myoïdes périvitubulaires et les cellules de Sertoli (Vornberger et al., 1994).

Chez la souris mâle, le *knock-out* de AR (ARKO) entraîne de sévères anomalies de l'appareil reproducteur (féminisation des organes génitaux externes, cryptorchidie) et un arrêt de la spermatogenèse au stade spermatocyte pachytène (Zhou, 2010). Un constat similaire est effectué chez les hommes présentant un syndrome d'insensibilité aux androgènes (Griffin, 1992). Par ailleurs, un apport exogène en testostérone et en dihydroxytestostérone chez des souris hypogonadotropes permet la mise en place de la spermatogenèse et la production de spermatozoïdes féconds (Singh et al., 1995). Ces résultats indiquent que le bon déroulement de la spermatogenèse requiert l'implication de la testostérone.

Cependant, l'effet de la testostérone sur les cellules germinales est indirect, puisque ces cellules n'expriment pas AR. L'invalidation sélective d'AR dans les différents types cellulaires testiculaires a permis de mettre en évidence le rôle des cellules testiculaires somatiques dans la régulation de la spermatogenèse par la testostérone. Notamment, le *knock-out* sélectif d'AR dans les cellules myoïdes périvitubulaires (PTM-ARKO) et les cellules de Sertoli (SC-ARKO) rend les souris infertiles. En particulier, une diminution du nombre de spermatogonies est observée chez les souris PTM-ARKO (Welsh et al., 2009). Par ailleurs, de telles études démontrent que les cellules de Sertoli sont la principale cible cellulaire de la signalisation androgénique dans le contexte de la régulation de la spermatogenèse par

la testostérone. En effet, le *knock-out* sélectif de AR dans les cellules de Sertoli (SC-ARKO) chez la souris induit un arrêt de la spermatogenèse au stade spermatocyte pachytène ou diplotène (Chang et al., 2004; De Gendt et al., 2004). De plus, les souris SC-ARKO présentent une altération de la BHT (Meng et al., 2005; Willems et al., 2010), et des défauts d'adhésion causent le détachement prématuré des spermatides rondes des cellules de Sertoli (Holdcraft and Braun, 2004; O'Donnell et al., 1996, 1994). Ainsi impliquée dans le maintien et le remodelage de la BHT, la méiose, et la spermiogenèse, la testostérone est un facteur clé de la régulation de la spermatogenèse.

De nombreuses études se sont également intéressées aux effets des œstrogènes, produits localement par l'aromatase de la testostérone effectuée par les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules germinales (voir Chapitre 2, I.), sur la régulation de la spermatogenèse. Il apparaît aujourd'hui clairement que les œstrogènes sont impliqués dans le développement du testicule et la régulation des fonctions testiculaires, notamment de la spermatogenèse (Carreau et al., 2007; Cooke et al., 2017). Les mécanismes d'action des œstrogènes ainsi que leur rôle dans le testicule sont développés dans le Chapitre 2 dédié à la signalisation œstrogénique (voir Chapitre 2, II.).

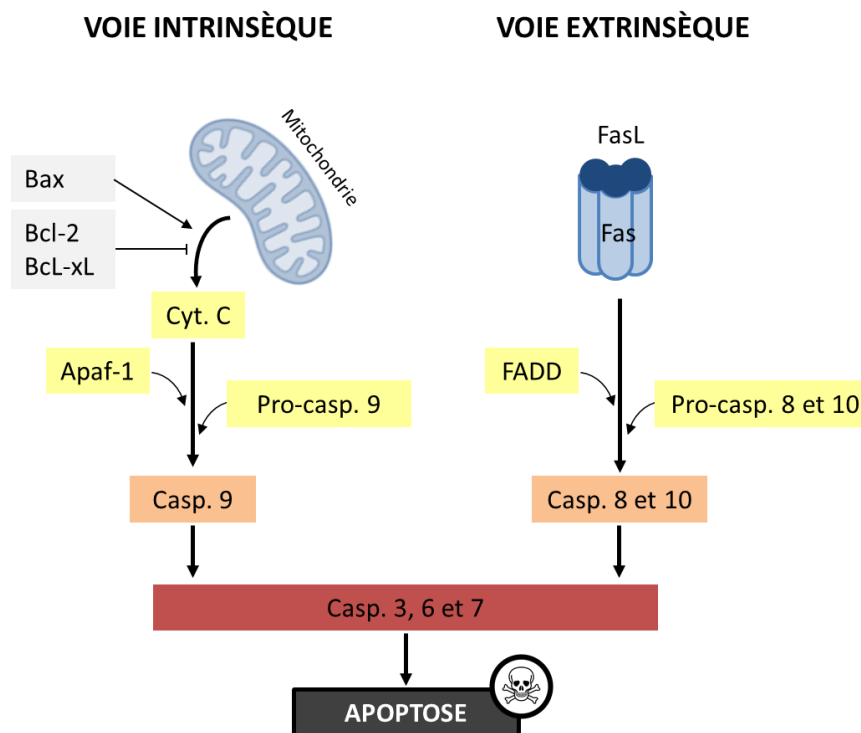
## ii. Les facteurs de croissance et les cytokines

De nombreux facteurs de croissance et des cytokines interviennent dans la régulation paracrine/autocrine de la spermatogenèse. Ces molécules sont produites localement, par les cellules somatiques testiculaires et/ou les cellules germinales.

Dans le testicule post-natal, de tels facteurs interviennent dans la progression de la spermatogenèse. En particulier, la prolifération des spermatogonies est régulée positivement par le *Stem Cell Factor* (SCF) (Allard et al., 1996), l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) (Wahab-Wahlgren, 2003), l'activine (Mather et al., 1990), l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF) (Söder et al., 1992), et négativement par l'inhibine (van Dissel-Emiliani et al., 1989). La différenciation des spermatogonies est quant à elle régulée par l'interleukine 1 (IL-1) (Parvinen et al., 1991; Pöllänen et al., 1989). Par ailleurs, la méiose est sous le contrôle du *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) et du Nerve Growth Factor (NGF), qui bloquent la deuxième division méiotique au stade de métaphase II (Damestoy et al., 2005; Perrard et al., 2007).

### 3. L'apoptose des cellules germinales

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée. Dans les cellules de mammifères, deux voies majeures sont impliquées dans le processus d'apoptose : la voie extrinsèque (voie des récepteurs de la mort) et la voie intrinsèque (voie mitochondriale) (Figure 14). La voie extrinsèque fait intervenir des récepteurs de la mort tels que Fas. La liaison du ligand Fas-L aux récepteurs Fas induit la trimérisation du récepteur et le recrutement d'une protéine adaptatrice (*Fas-Associated protein with Death Domain* ; FADD). Cet événement permet le recrutement des pro-caspases 8 et 10, l'activation des caspases initiatrices 8 et 10, puis celle des caspases 3, 6 et 7. La voie intrinsèque est initiée par la libération du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol. Cet événement est sous le contrôle des membres pro- (Bax) et anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL) des protéines de la famille Bcl-2. La liaison du cytochrome C à une protéine adaptatrice (Apoptotic peptidase activating factor 1 ; Apaf-1) induit le recrutement de la pro-caspase 9, l'activation de la caspase initiatrice 9, puis des caspases 3, 6 et 7 (Elmore, 2007). Ainsi, l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque résulte en l'activation des caspases 3, 6 et 7, dites caspases effectrices, responsables de la mort cellulaire programmée.



**Figure 14 : Voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque**

Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1 ; Casp. : Caspase ; Cyt. C : Cytochrome C ;  
FADD : Fas-Associated Death Domain ; Pro-casp. : Pro-caspase

Outre les facteurs endocrines et paracrines évoqués précédemment, le bon déroulement de la spermatogenèse est dépendant de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. En effet, chez des souris n'exprimant pas Bax (protéine pro-apoptotique) ou surexprimant Bcl-2 et Bcl-xL (protéines anti-apoptotiques), l'absence d'apoptose induit une accumulation de cellules germinales pré-méiotiques, et les animaux sont infertiles (Rodriguez et al., 1997; Russell et al., 2002).

Une vague d'apoptose massive survient au cours de la première vague de spermatogenèse et est essentielle à la mise en place de cette dernière (Moreno et al., 2006; Rodriguez et al., 1997). De manière moins importante qu'au cours de la période prépubère, une apoptose physiologique a également lieu chez l'adulte (Blanco-Rodriguez & Martinez-Garcia, 1996; Brinkworth et al., 1995). Ce processus apoptotique contrôle l'expansion clonale des cellules germinales afin d'assurer le maintien d'un ratio optimal entre le nombre de cellules de Sertoli et le nombre de cellules germinales (Orth et al., 1988; Print & Loveland, 2000). Par ailleurs, l'apoptose permet l'élimination des cellules germinales présentant des anomalies telles que des cassures de l'ADN ou des défauts de réarrangement chromosomiques au cours de la méiose (Blanco-Rodriguez et al., 2003; Rodriguez et al., 1997).

### III. Mise en place de la spermatogenèse chez le rat

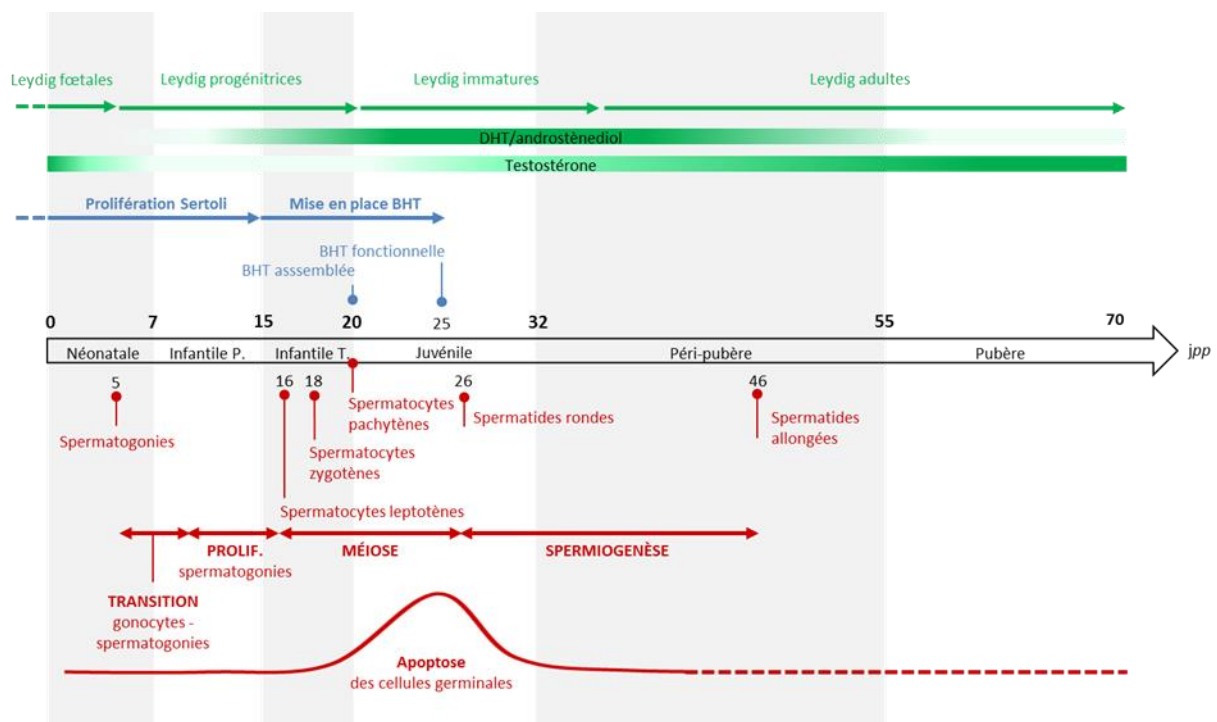
La spermatogenèse est un processus complexe et finement régulé qui débute au moment de la puberté. Le bon déroulement de la spermatogenèse à l'âge adulte résulte de deux phases de développement primordiales pour l'acquisition des fonctions testiculaires au moment de la puberté. Une première phase du développement testiculaire a lieu au cours de la vie fœtale (Rouiller-Fabre et al., 2003). Brièvement, chez le rat les cellules germinales primordiales apparaissent au 8<sup>ème</sup> jour *post-coitum* (*jpc*). Ces cellules prolifèrent et migrent au niveau de la crête génitale pour former la gonade indifférenciée qui apparaît à 12 *jpc*. Les cellules germinales primordiales sont alors appelées gonocytes. La différenciation de la gonade indifférenciée en testicule est initiée à 13,5 *jpc*. Les cellules de Sertoli se différencient, prolifèrent et s'agrègent autour des gonocytes pour former les cordons séminifères, futurs tubes séminifères (Orth, 1982). A 14,5 *jpc*, les cellules de Leydig se différencient et, à partir de 15,5 *jpc*, synthétisent la testostérone et l'*insulin-like hormone 3* (INSL3), responsables du développement de l'appareil reproducteur masculin et de la descente testiculaire (Kubota et al., 2002). L'intense prolifération des gonocytes cesse à 18 *jpc* (soit quelques jours avant la naissance), ce qui marque l'entrée de ces cellules en quiescence.

Une seconde phase de développement se déroule durant la période prépubère. Elle peut être divisée en 5 périodes incluant, dans l'ordre chronologique, les périodes néonatale, infantile, juvénile, prépubère et pubère. La succession de ces périodes est similaire chez l'homme et chez le rat, mais ces dernières surviennent à des âges différents selon l'espèce considérée. Chez le rat, la période prépubère débute dès les premiers jours de la vie (Tableau I) (Picut et al., 2015).

**Tableau I : Comparaison du développement post-natal chez l'homme et le rat (Picut et al, 2015)**

Période	Rat	Homme
Néonatale	0-7 jpp	0-28 jours
Infantile	8-20 jpp	1-23 mois
Juvénile	21-32 jpp	2-12 ans
Péri-pubère	33-55 jpp	12-16 ans
Pubère	56-70 jpp	

Cette phase de développement post-natal consiste en la maturation des différents types cellulaires testiculaires et permet la mise en place progressive de la structure et des fonctions testiculaires. Ces événements aboutissent notamment à la mise en place de la première vague de spermatogenèse et sont ainsi essentiels pour la fertilité de l'individu adulte (Figure 15).



**Figure 15 : Mise en place de la spermatogenèse chez le rat**

Les événements représentés en vert, bleu et rouge concernent respectivement les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Ces événements sont essentiels à la mise en place de la spermatogenèse et conditionnent la fertilité de l'individu adulte. BHT : barrière hémato-testiculaire ; DHT : dihydrotestostérone ; jpp : jours post-partum



## 1. Période néonatale (0-7 jpp)

Chez le rat, la période néonatale s'étale de la naissance au 7<sup>ème</sup> jour *post-partum* (jpp). L'importante prolifération des cellules de Sertoli initiée au cours de la vie fœtale se poursuit durant la période néonatale. A partir de 5 jpp, les gonocytes fœtaux sortent de leur phase de quiescence et entament leur transition en spermatogonies capables de prolifération (voir Chapitre 1, I. 3. ii.) (Huckins and Clermont, 1968). Ces deux évènements sont induits par la FSH, dont les niveaux sériques sont élevés au début de la période néonatale mais déclinent progressivement en raison du rétrocontrôle négatif qu'exerce l'inhibine produite par les cellules de Sertoli sur l'axe HPG (Picut et al, 2015). Le nombre important de cellules de Leydig fœtales au début de la période néonatale est responsable des niveaux de testostérone relativement élevés à la naissance. Cependant, à partir de 5 jpp, les cellules de Leydig fœtales régressent et sont progressivement remplacées par les cellules de Leydig progénitrices. Les cellules de Leydig progénitrices se développent à partir de cellules souches périvitubulaires. Elles expriment le récepteur à la LH (LHR) et produisent des métabolites de la testostérone : l'androstènediol et la dihydrotestostérone (DHT) (Ye et al., 2017).

## 2. Période infantile (8-20 jpp)

La période infantile s'étend de 8 à 20 jpp. Elle peut être subdivisée en deux périodes : la période infantile précoce (8-14 jpp) et la période infantile tardive (15-20 jpp).

### i. Période infantile précoce (8-14 jpp)

La période infantile précoce consiste majoritairement en l'intensification de la phase de prolifération cellulaire mise en place au cours de la période néonatale. Notamment, la transition des gonocytes fœtaux en spermatogonies se poursuit, et ces dernières débutent leur phase de prolifération. A 10 jpp, les gonocytes fœtaux ne sont plus visibles (Malkov et al., 1998; Picut et al., 2015). En parallèle, la prolifération des cellules de Sertoli se poursuit. Leur expansion rapide est limitée par la faible augmentation du diamètre des tubes séminifères. Dans les tubes séminifères, la densité cellulaire maximale est ainsi atteinte à la fin de la période infantile précoce, les cellules de Sertoli et les spermatogonies forment l'épithélium séminifère pseudo-stratifié (Picut et al, 2015). Dans le compartiment interstitiel, le remplacement des cellules de Leydig fœtales par les cellules de Leydig progénitrices se poursuit, induisant une chute des taux de testostérone, mais une augmentation des niveaux d'androstènediol et de DHT (Ye et al, 2017).

## ii. Période infantile tardive (15-20 jpp)

La période infantile tardive marque la fin de la phase de prolifération cellulaire initiée en période néonatale et poursuivie au cours de la période infantile précoce. A 15 jpp, l'intense prolifération des cellules de Sertoli cesse, marquant le début de la mise en place de la BHT, dont l'assemblage se termine à la fin de la période infantile (20 jpp) (Mok et al., 2011). L'établissement de la BHT permet celui du micro-environnement nécessaire au bon déroulement la spermatogenèse qui débute en parallèle. L'entrée des cellules germinales en méiose a lieu, les spermatocytes leptotène, zygotène et pachytène précoce (premiers stades de la prophase I de méiose) apparaissent respectivement à 16 jpp, 18 jpp et 20 jpp (Malkov et al., 1998). L'entrée en méiose est induite par les forts taux de DHT produits par les cellules de Leydig progénitrices (Ye et al, 2017). Ainsi, la période infantile tardive marque la transition de l'indépendance à la dépendance de la spermatogenèse vis-à-vis des androgènes. La structure du tube séminifère évolue en une structure en double rosette caractéristique de cette période, et la lumière se développe au centre du tube séminifère à partir de 18 jpp (Picut et al, 2015). Dans le compartiment interstitiel, le développement des cellules de Leydig progénitrices se poursuit, et leur nombre maximal est atteint à 20 jpp.

## 3. **Période juvénile (21-32 jpp)**

La période juvénile constitue une période cruciale pour le développement des cellules de Leydig et la maturation de l'axe HPG. Les cellules de Leydig progénitrices, présentes en grand nombre au début de la période juvénile se différencient progressivement en cellules de Leydig immatures sous l'influence de la LH (Ye et al, 2017). Les cellules de Leydig immatures sont capables de produire la testostérone. Ainsi, le taux de testostérone, faible depuis le milieu de la période néonatale, augmente tout au long de la période juvénile. Au début de la période juvénile, le faible taux de testostérone produit par les cellules de Leydig immatures est suffisant pour exercer un important rétrocontrôle négatif sur l'axe HPG, extrêmement sensible à la testostérone, ce qui induit une diminution du taux de LH et FSH. Cependant, à partir de 25 jpp, la sensibilité de l'axe HPG au rétrocontrôle exercé par la testostérone diminue, permettant ainsi une augmentation du niveau de gonadotrophines parallèle à celle du niveau de testostérone. Cela constitue une caractéristique clé de la maturation de l'axe HPG (Picut et al, 2015).

Dans les tubes séminifères, la vague d'apoptose physiologique qui accompagne la première vague de la spermatogenèse (voir Chapitre 1 II. 3.) atteint un pic au cours de la période juvénile. En effet, le niveau d'activation des caspases 3, 8 et 9 est maximal à 25 jpp (Moreno et al., 2006) et coïncide avec

l'importante apoptose des spermatogonies et des spermatocytes pachytènes (Jahnukainen et al., 2004; Moreno et al., 2006). Par ailleurs, la BHT mise en place au cours de la période infantile devient pleinement fonctionnelle à 25 *jpp* (Mok et al, 2011). Cet évènement coïncide avec l'apparition des premières cellules germinales haploïdes, les spermatocytes secondaires et les spermatides rondes, visibles dès 26 *jpp* (Malkov et al, 1998). La période juvénile marque le début de l'augmentation du diamètre des tubes séminifères, avec le retrait des cellules de Sertoli et des spermatogonies en une seule couche le long de la lame basale. Les tubes séminifères perdent ainsi leur architecture en double rosette (Picut et al, 2015).

#### **4. Période péri-pubère (33-55 *jpp*)**

A 35 *jpp*, au début de la période péri-pubère, le nombre de cellules de Leydig immatures est à son maximum. Tout au long de cette période, les cellules de Leydig immatures se différencient en cellules de Leydig adultes, qui sont ainsi les cellules de Leydig majoritaires à la fin de la période péri-pubère (Picut et al., 2015; Teerds & Huhtaniemi, 2015). Les cellules de Leydig adultes sont des cellules matures, qui constituent une population de cellules stable avec une très faible capacité de prolifération, mais une importante capacité de régénération (Teerds & Huhtaniemi, 2015).

Ces cellules sont capables de produire la testostérone, dont le taux continue d'augmenter au cours de cette période. A la fin de la période péri-pubère, la testostérone devient l'androgène majoritairement produit par le testicule. Concernant la spermatogenèse, l'évènement majeur de la période péri-pubère est le début de la spermiogenèse. Les spermatides rondes formées au cours de la période juvénile subissent d'importants changements morphologiques et débutent leur élongation (voir Chapitre 1, I. 3. ii.). Les premières spermatides de stade 19 (dernier stade de la spermiogenèse) apparaissent à 46 *jpp*. A la fin de la période péri-pubère, les premiers spermatozoïdes sont libérés dans la lumière des tubes séminifères (Malkov et al, 1998 ; Picut et al, 2015).

#### **5. Période pubère (56-70 *jpp*)**

La plupart des caractéristiques du testicule adulte, notamment les caractéristiques histologiques, sont présentes dès le début de la période pubère (56 *jpp*) (Campion et al., 2013; Picut et al., 2015). Cependant, la maturité sexuelle n'est atteinte qu'après la phase de maturation post-testiculaire des spermatozoïdes. Celle-ci a lieu au cours de la période pubère, qui s'étend jusqu'à 70 *jpp*. A cet âge, le nombre de spermatozoïdes présents dans l'épididyme ainsi que la mobilité de ces spermatozoïdes atteignent des niveaux comparables à ceux observés chez les animaux plus âgés (90 *jpp*). Ainsi, les rats mâles sont considérés sexuellement matures, et ainsi adultes, à partir de 70 *jpp* (Campion et al, 2013).

## Chapitre 2 | La signalisation œstrogénique

Le second chapitre de cette introduction est consacré à la signalisation œstrogénique. Ce terme désigne l'ensemble des voies de signalisation induites par les œstrogènes et/ou leurs récepteurs. Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes qui jouent un rôle important dans le développement et le maintien de la physiologie de nombreux systèmes, tels que les systèmes cardiovasculaire, musculo-squelettique, immunitaire ainsi que le système reproducteur (Vrtačnik et al., 2014). Par ailleurs, les œstrogènes sont impliqués dans un nombre important de maladies, notamment certains cancers tels que le cancer du sein (Patel et al., 2018). Le groupe des œstrogènes comprend le 17 $\beta$ -œstradiol (E2), l'œstrogène prédominant et le plus actif, ainsi que l'œstrone et l'œstriol.

### I. Biosynthèse des œstrogènes

Les œstrogènes sont synthétisés par l'aromatase, un complexe enzymatique composé du cytochrome P450 aromatase (codé par le gène *Cyp19a1*) associé à la NADPH cytochrome P450 réductase. La réaction d'aromatation catalysée par ce complexe enzymatique est responsable de la conversion irréversible des androgènes (testostérone et androstènedione) en œstrogènes (17 $\beta$ -œstradiol et œstrone) (Carreau et al., 1999). Chez les mammifères, l'aromatase est exprimée dans de nombreux tissus incluant le cerveau (notamment le complexe hypothalamo-hypophysaire), le tissu adipeux, les os et les gonades (Simpson, 2003). Chez le rat adulte, l'aromatase au niveau testiculaire a tout d'abord été localisée dans les cellules de Leydig (Genissel et al., 2001; Kurosumi et al., 1985). Cependant, il apparaît aujourd'hui clairement que l'expression de l'aromatase dans le testicule n'est pas restreinte au tissu interstitiel. En effet, cette enzyme est détectée dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales, aussi bien au niveau des transcrits (Bois et al., 2010; Bourguiba et al., 2003a, 2003b, 2003c; Levallet et al., 1998; Silandre et al., 2007) que de la protéine (Carpino et al., 2001; Levallet et al., 1998). Il faut toutefois noter que la localisation cellulaire de l'aromatase dans le testicule évolue avec l'âge. En effet, alors que cette enzyme est majoritairement exprimée dans les cellules de Sertoli au début de la période prépubère (jusqu'à environ 20 *jpp*), l'aromatase est localisée dans les cellules de Leydig, les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes et allongées chez le rat adulte (Bois et al, 2010 ; Carpino et al, 2001). Par ailleurs, dans les cellules germinales du rat adulte, le niveau de transcription du gène et l'activité de l'aromatase varient selon le degré de maturation des cellules. Le niveau des transcrits de l'aromatase décroît avec le degré de maturation des cellules germinales. L'activité de l'aromatase évolue quant à elle en sens inverse, et est ainsi trois fois plus importante dans les spermatozoïdes que dans les spermatocytes pachytènes (Levallet et al, 1998).

## II. Récepteurs aux œstrogènes

L'existence des récepteurs aux œstrogènes (ERs) a été démontrée dès les années 1960 (Jensen, 1962). Le premier ER (aujourd'hui connu sous le nom d'ESR1, ou ER $\alpha$ ) fût identifié plus de 20 ans plus tard dans des cellules de carcinome mammaire humain (Greene et al., 1986). Un second ER présentant une forte homologie avec ESR1 (aujourd'hui connu sous le nom d'ESR2, ou ER $\beta$ ) fût décrit 10 ans plus tard dans les cellules épithéliales de la prostate chez le rat (Kuiper et al., 1996). A la même époque, un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G (aujourd'hui connu sous le nom de GPER) fût identifié dans des cellules de carcinome mammaire humain (Carmeci et al., 1997). D'abord considéré comme un récepteur orphelin (dénommé GPR30), ce récepteur est aujourd'hui reconnu comme un ER du fait de sa capacité à lier l'E2 (Thomas et al., 2005) et à induire la signalisation œstrogénique (voir Chapitre 2 III.) (Filardo et al., 2007, 2002; Revankar et al., 2005). Ainsi, il existe deux types d'ER : les récepteurs nucléaires dits « classiques » ESR1 et ESR2, ainsi que le récepteur transmembranaire couplé aux protéines G, GPER.

### 1. Les récepteurs nucléaires – ESR1 et ESR2

Les récepteurs ESR1 et ESR2 appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui comprend les récepteurs aux stéroïdes, aux hormones thyroïdiennes, à la vitamine D, à l'acide rétinoïque, ainsi que certains récepteurs dits « orphelins » pour lesquels aucun ligand physiologique n'est encore connu. Les récepteurs nucléaires possèdent une structure commune composée de 5 domaines fonctionnels : un domaine N-terminal (NTD, ou domaine A/B), un domaine de liaison à l'ADN (DBD, ou domaine C), une région charnière (ou domaine D), un domaine de liaison au ligand (LBD, ou domaine E) et un domaine C-terminal (CTD, ou domaine F) (Figure 16). Les fonctions de ces domaines sont détaillées ci-après (Weikum et al., 2018).



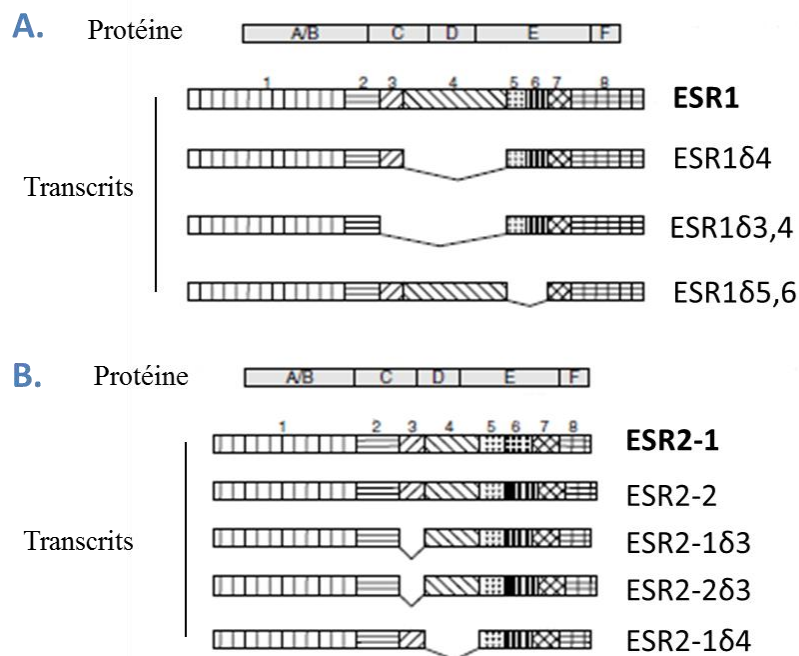
**Figure 16 : Structure générale des récepteurs nucléaires ESR1 et ESR2**

A/B : domaine N-terminal contenant la fonction de transactivation indépendante du ligand AF-1 ; C : domaine de liaison à l'ADN (DBD) ; D : région charnière contenant un site NLS (signal de localisation nucléaire) ; E : domaine de liaison du ligand (LBD) contenant la fonction de transactivation dépendante du ligand (AF-2) et un site NLS ; F : domaine C-terminal.

- ❖ **Le domaine N-terminal** est impliqué dans le recrutement de cofacteurs transcriptionnels et participe ainsi à la régulation de l'expression des gènes cibles. Le NTD possède par ailleurs une fonction d'activation de la transcription indépendante de la liaison du ligand : AF-1. Enfin, le NTD est la cible de modifications post-traductionnelles du récepteur (phosphorylation, SUMOylation, acétylation) qui modulent l'activité de ce dernier.
- ❖ **Le DBD** est un domaine extrêmement conservé qui participe à la dimérisation du récepteur et à sa fixation sur l'ADN. Le DBD possède deux structures en doigt de zinc qui permettent la fixation du récepteur à des séquences d'ADN spécifiques situées dans les régions promotrices des gènes cibles. Dans le cas des ERs, il s'agit d'une séquence appelée « élément de réponse aux œstrogènes » (ERE) constituée de deux demi-sites palindromiques séparés par 3 nucléotides non spécifiques (n) : AGGTCAnnnTGACCT (Klinge, 2001).
- ❖ **La région charnière** fait le lien entre le DBD et le LBD et participe au changement de conformation du récepteur suite à la fixation du ligand. Cette région comprend un site de liaison pour la protéine chaperonne hsp (*heat shock protein*) 90 ainsi qu'un site NLS (*Nuclear Localisation Signal*), démasqué lors de la fixation du ligand et permettant la translocation du complexe récepteur-ligand au noyau. La région charnière constitue également une cible des modifications post-traductionnelles du récepteur.
- ❖ **Le LBD** est composé de 12 hélices  $\alpha$  séparées par des feuillets  $\beta$  qui forment une cavité hydrophobe permettant l'insertion du ligand. C'est ce domaine qui confère sa spécificité au récepteur. Par ailleurs, le LBD contient une fonction d'activation dépendante du ligand, AF-2, et est impliqué dans la dimérisation du récepteur.
- ❖ **Le domaine C-terminal** est un domaine peu conservé dont la fonction n'est pas clairement établie à l'heure actuelle. Cependant, la délétion de ce domaine perturbe l'activité transcriptionnelle du récepteur ESR1 (K. Kim et al., 2003). Ainsi, une étude suggère que le CTD joue un rôle dans les spécificités de reconnaissance du ligand et est impliqué dans les différences d'activité transcriptionnelle qui existent entre ESR1 et ESR2 (Skafar & Zhao, 2008).

Les récepteurs ESR1 et ESR2 possèdent une structure similaire et partagent un degré d'homologie variable selon le domaine considéré. En effet, ces deux récepteurs présentent 95% d'homologie au niveau de leur DBD et 60% au niveau de leur LBD, alors que les autres domaines sont plus divergents (Mosselman et al., 1996).

Les gènes *Esr1* et *Esr2*, codant pour ces récepteurs, contiennent tous deux 8 exons séparés par 7 introns. Cependant, la présence de différents codons d'initiation au sein de ces gènes ainsi que les mécanismes d'épissage alternatifs sont à l'origine de plusieurs variants de chaque ER. Chez l'Homme, la forme dite « sauvage » d'ESR1 est une protéine de 66 kDa, mais un nombre important de variants ont été identifiés (Taylor et al., 2010), dont des formes tronquées de la protéine ESR1 de 46 kDa (Flouriou, 2000) et de 36 kDa (Wang et al., 2005) qui présentent ou non les fonctions AF1 et/ou AF2. De même, plusieurs variants d'ESR2 ont été décrits. Certains de ces variants sont de type saut d'exon, comme c'est le cas pour la plupart des variants d'ESR1, mais les variants d'épissage les plus fréquents pour ESR2 impliquent une séquence entièrement différente pour l'exon 8, ainsi que des duplications d'exon et l'insertion de matériel génétique supplémentaire (Taylor et al., 2010). Différents variants d'ESR1 et ESR2 sont également décrits chez le rat (Ishii et al, 2010). En particulier, une étude menée au sein de notre laboratoire a identifié trois transcrits variants d'*Esr1* et quatre transcrits variants d'*Esr2* dans le testicule de rat adulte (Figure 17) (Bois et al., 2010).



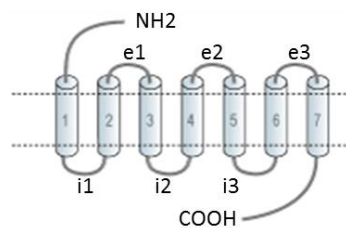
**Figure 17 : Variants d'*Esr1* (A.) et *Esr2* (B.) identifiés dans le testicule de rat adulte**

A-F : domaines fonctionnels de la protéine ; 1-8 : exons ;  $\delta$  : variant délété de l'exon  
(D'après Bois et al, 2010)

## 2. Le récepteur transmembranaire – GPER

Le récepteur GPER appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Sa structure comprend 7 domaines transmembranaires connectés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires (Figure 18) (Barton et al., 2018). Le gène *Gper* codant pour ce récepteur ne contient qu'un exon et produit chez le rat une protéine de 375 acides aminés possédant un poids moléculaire de 42 kDa (Chimento et al., 2010).

Des études immunocytochimiques ont permis de déterminer la localisation subcellulaire de ce récepteur. Principalement retrouvé au niveau de la membrane plasmique (Funakoshi et al., 2006), GPER est également localisé au niveau de la membrane de certains organites tels que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Revankar et al., 2005).



**Figure 18 : Structure du récepteur transmembranaire GPER**

1-7 : domaines transmembranaires ; e1-e3 : boucles extracellulaires ; i1-i3 : boucles intracellulaires

(d'après <https://www.alomone.com/p/anti-g-protein-coupled-estrogen-receptor-1/AER-050>)

## III. Mécanismes d'action des œstrogènes et de leurs récepteurs

Des mécanismes d'action complexes interviennent dans la signalisation œstrogénique. Ces mécanismes peuvent être séparés en quatre voies (Figure 19) (Hall et al., 2001; Hewitt & Korach, 2018; Vrtačnik et al., 2014) :

- la voie génomique directe (Figure 19. ①.a)
- la voie génomique indirecte (Figure 19. ①.b)
- la voie non-génomique (Figure 19. ②)
- la voie indépendante du ligand (Figure 19. ③)

De plus, les œstrogènes peuvent agir directement sur des cellules cibles, sans l'intermédiaire de récepteurs, et d'autres voies de signalisation sont capables de moduler la signalisation œstrogénique.



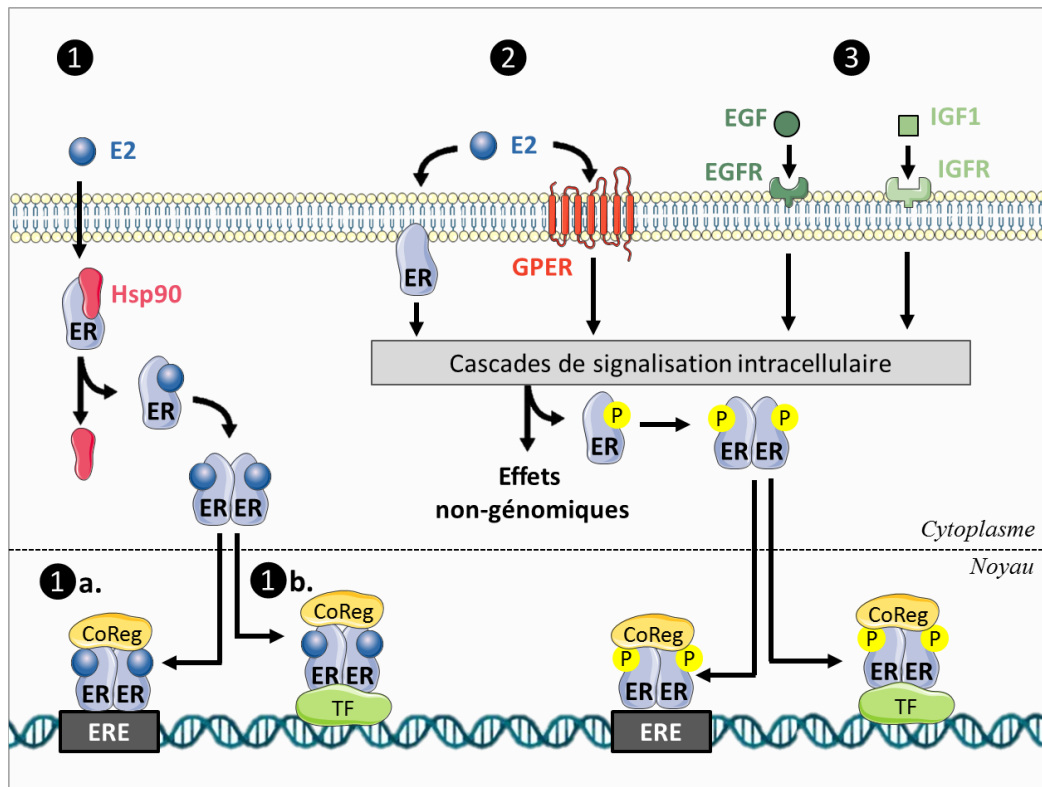


Figure 19 : La signalisation œstrogénique

① **Voie génomique.** La liaison du ligand à un récepteur nucléaire (ER) entraîne la dissociation de la protéine chaperonne hsp90, la dimérisation du récepteur et sa translocation au noyau. La fixation de ce dimère et le recrutement de co-facteurs transcriptionnels (CoReg) permettent la régulation de l'expression de gène cible. La liaison du dimère de récepteur s'effectue selon **a. la voie génomique directe**, au niveau d'une séquence appelée « élément de réponse aux œstrogènes » (ERE), ou **b. la voie génomique indirecte**, grâce à une interaction protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription (TF). ② **Voie non génomique.** La liaison du ligand au récepteur transmembranaire GPER ou à un pool de récepteurs nucléaires localisés à la membrane plasmique induit des réponses non génomiques rapides au travers de l'activation de cascades de signalisation intracellulaire. ③ **Voie indépendante du ligand.** La liaison de l'*epidermal growth factor* (EGF) ou de l'*insulin-like growth factor* (IGF) à leur récepteur (EGFR et IGFR respectivement) induit l'activation de cascades de signalisation responsables de la phosphorylation (P) des récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires ainsi activés régulent l'expression de gènes cibles *via* les mécanismes impliqués dans les voies génomiques directe et indirecte.

## 1. Voie génomique

La voie génomique implique les récepteurs nucléaires ESR1 et ESR2. En absence de ligand, ces récepteurs sont associés à la protéine chaperonne hsp90 et localisés dans le noyau ou le cytoplasme (Fliss et al., 2000). La fixation du ligand au LBD du récepteur entraîne des changements de conformation du récepteur et la dissociation de la protéine chaperonne. Ces modifications permettent la dimérisation du récepteur sous forme d'homodimère (ESR1/ESR1 ou ESR2/ESR2) ou d'hétérodimère (ESR1/ESR2) (Cowley et al., 1997). Les récepteurs dimérisés sont ensuite transloqués au noyau afin d'assurer la régulation l'expression des gènes cibles des œstrogènes (Figure 19. ①).

De nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, méthylation, sumoylation) sont capables de réguler l'activité des ERs. Celles-ci peuvent intervenir avant ou après la liaison à l'ADN, et modifient les paramètres de stabilité, de dimérisation, de recrutement de co-facteurs ou encore l'activité transcriptionnelle des ERs (Maggi, 2011). L'existence de différentes modalités de liaison du complexe ligand-récepteur à l'ADN distingue la voie génomique directe et la voie génomique indirecte.

#### i. Voie génomique directe

Dans le cas de la voie génomique directe (Figure 19.1.a), le dimère se fixe directement à l'ADN par l'intermédiaire du DBD, au niveau d'un ERE présent dans la région promotrice du gène cible. Ceci induit l'activation des domaines de transactivation AF-1 et AF-2 (Métivier et al., 2001) et permet le recrutement de co-facteurs transcriptionnels participant à la régulation de l'expression du gène cible (McKenna et al., 1999; Nilsson et al., 2001).

#### ii. Voie génomique indirecte

On estime cependant que 35% des gènes cibles des œstrogènes ne possèdent pas de séquence ERE (Marino et al., 2006; Vrtačnik et al., 2014). Le mécanisme par lequel les œstrogènes agissent pour réguler l'expression de ces gènes est connu sous le nom de voie génomique indirecte (Figure 19.1.b). En effet, la liaison du dimère d'ERs à l'ADN est dans ce cas indirecte, et nécessite des interactions protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription au niveau de leurs éléments de réponse respectifs (Göttlicher et al., 1998). L'un des exemples les mieux décrits est celui de l'interaction des ERs avec le complexe c-Fos/c-Jun au niveau du site AP-1 (*activator protein 1*) (O'Lone et al., 2004). Par ailleurs, la voie génomique indirecte peut également impliquer l'interaction des ERs avec la protéine Sp-1 (*stimulating protein 1*), elle-même se fixant à l'ADN au niveau de séquence riches en GC (O'Lone et al., 2004). Certaines études suggèrent que la voie génomique indirecte serait le principal mécanisme d'action du récepteur ESR2 (Maneix et al., 2015; Zhao et al., 2010).

## 2. Voie non-génomique

L'existence d'effets rapides des œstrogènes, survenant en quelques secondes à quelques minutes, suppose l'existence de mécanismes d'action ne nécessitant pas la transcription des gènes et la synthèse de protéines. Cette voie non-génomique implique des récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique (Figure 19.2). Il peut s'agir du récepteur transmembranaire GPER, mais également de récepteurs nucléaires adressés à la membrane plasmique par palmitoylation (Acconcia et al., 2005) et ancrés grâce à des interactions protéines-protéines avec la protéine Shc (Song et al., 2004) ou des protéines membranaires telles que les cavéolines (Pastore et al., 2019; Razandi et al., 2002). La fixation du ligand à ces récepteurs membranaires induit une réponse rapide au travers de la modulation de la concentration en messagers secondaires (calcium intracellulaire, AMPc, oxyde nitrique) et de l'activation de certaines voies de signalisation (MAPK, PI3K/Akt/PKB) (Zhang et al., 2009). Les réponses rapides induites par la voie non-génomique de la signalisation œstrogénique modulent la prolifération, la différenciation et l'apoptose d'une manière qui semble être spécifique du type cellulaire (Viñas et al., 2012).

Par ailleurs, l'activation de ces mécanismes non-génomiques peut affecter la régulation transcriptionnelle (Li et al., 2010). Ce phénomène de « *cross-talk* » entre les voies génomiques et non-génomiques implique l'existence de certains points de convergence entre ces deux voies et complexifie les mécanismes de la signalisation œstrogénique (Björnström & Sjöberg, 2005).

## 3. Voie indépendante du ligand

L'ensemble des voies présentées précédemment impliquent la liaison du ligand au récepteur. Cependant, ESR1 et ESR2 peuvent être activés en absence d'œstrogène ou d'autres types d'agonistes de ces récepteurs (Bennesch & Picard, 2015). Cette activation indépendante du ligand est principalement induite par la phosphorylation des ERs nucléaires au niveau de résidus spécifiques, le plus souvent des résidus sérine et tyrosine. Celle-ci résulte de l'activation d'autres voies de signalisation, notamment les voies impliquant des facteurs de croissance tels que l'*epidermal growth factor* (EGF) ou l'*insulin-like growth factor 1* (IGF1) (Hewitt et al., 2017). La fixation de l'EGF et de l'IGF1 à leurs récepteurs (EGFR et IGF1R) induit l'activation des cascade de signalisation cellulaire PI3K/Akt et MAPK (ERK1/2, p90-RSK), responsables de la phosphorylation de ESR1 et/ou ESR2 (Anbalagan & Rowan, 2015; Bunone et al., 1996; Campbell et al., 2001; Clark et al., 2001; Lannigan, 2003; Yamnik & Holz, 2010). Les ER nucléaires ainsi activés régulent l'expression de gènes cibles *via* les mécanismes impliqués dans les voies génomiques directe et indirecte décrites précédemment (voir Chapitre 2 III. 1.) (Figure 19.3).

#### 4. Effet des œstrogènes indépendant des récepteurs

Les œstrogènes peuvent exercer une action directe sur les cellules cibles, selon un mécanisme n'impliquant pas de récepteur. En effet, les œstrogènes sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes telles que la phosphatase alcaline ou la *c-jun*-N-terminal kinase, atténuant ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ; ROS) (Haas et al., 2012; Richardson et al., 2012). En conséquence, les œstrogènes peuvent avoir un rôle antioxydant.

#### 5. Modulation de la signalisation œstrogénique par la voie PPAR $\gamma$

Les nombreuses voies mises en jeu dans la signalisation œstrogénique ainsi que l'existence de points de convergence entre ces voies rendent l'étude des mécanismes d'action des œstrogènes complexe. Cela est d'autant plus vrai que ces mécanismes sont susceptibles d'impliquer d'autres voies de signalisation. Comme nous l'avons vu, c'est le cas de la voie indépendante du ligand dans laquelle l'activation des ERs nucléaires résulte de l'activation des voies des facteurs de croissance (EGF et IGF1). De la même manière, des voies de signalisation impliquant notamment d'autres récepteurs nucléaires sont capables de moduler la signalisation œstrogénique (Siersbaek et al., 2018). En particulier, le dialogue entre les récepteurs ESR1 et *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) inhibe la signalisation œstrogénique (Qin et al., 2003; Suzuki et al., 2006).

PPAR $\gamma$  appartient à la famille des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes, dont font également partie les récepteurs PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta/\delta$ . Les PPARs sont des récepteurs nucléaires, ils partagent ainsi les caractéristiques structurelles de cette superfamille (voir Chapitre 2 II. 1.). Il existe plusieurs isoformes de PPAR $\gamma$ , issues de l'usage de différents promoteurs et de mécanismes d'épissage alternatif. Deux isoformes nommées PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2 sont décrites chez les rongeurs (Zhu et al., 1995), et une troisième isoforme nommée PPAR $\gamma$ 3 a été identifiée chez l'homme (Fajas et al., 1998).

D'abord décrit comme un récepteur orphelin dans les années 1990, plusieurs ligands de PPAR $\gamma$  sont aujourd'hui identifiés. Les principaux ligands endogènes de PPAR $\gamma$  sont les acides gras polyinsaturés et leurs métabolites tels que la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 (15d-PGJ<sub>2</sub>) (Forman et al., 1995; Li et al., 2019). Par ailleurs, plusieurs composés synthétiques de la famille des thiazolidinédiones (des antidiabétiques oraux qui augmentent la sensibilité aux effets métaboliques de l'insuline) présentent une forte affinité pour PPAR $\gamma$  (Iwata et al., 2001). La nature de ces ligands endogènes et synthétiques souligne le rôle important de ce récepteur dans le métabolisme et l'homéostasie des lipides et du glucose.

Cependant, PPAR $\gamma$  intervient dans de nombreux autres processus physiologiques et pathologiques (Hernandez-Quiles et al., 2021). En effet, PPAR $\gamma$  est impliqué dans la régulation des réactions inflammatoires, de l'apoptose ainsi que de la prolifération cellulaire dans des tissus et des organes variés tels que la glande mammaire, le colon, les reins, la prostate ou le testicule, au sein desquels il jouerait un rôle important dans la carcinogenèse (Chinetti et al., 1998; Hase et al., 2002; Inoue et al., 2001; Mueller et al., 1998; Sarraf et al., 1998).

Classiquement, l'activation de PPAR $\gamma$  par la fixation d'un ligand au niveau du LBD induit des changements de conformation et sa dimérisation avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR). La translocation de cet hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR au noyau et sa fixation à l'ADN au niveau de séquences spécifiques appelées « éléments de réponse aux PPAR » (PPRE) et le recrutement de co-activateurs permet d'initier l'expression de gènes cibles (Hernandez-Quiles et al., 2021).

Néanmoins, certaines études décrivent un autre mécanisme d'action de PPAR $\gamma$ , qui revêt un intérêt particulier dans le cas de la modulation de la signalisation œstrogénique (Suzuki et al., 2006 ; Qin et al., 2003). Ces études ont été menées dans la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain MCF-7, couramment utilisée comme modèle pour l'étude de la signalisation œstrogénique (Comşa et al., 2015; Lee et al., 2015). En effet, les cellules MCF-7 expriment de forts niveaux de ESR1 (ainsi que de faibles niveaux de ESR2 et GPER) (Buteau-Lozano et al., 2002; Horwitz et al., 1975), et leur prolifération est stimulée par l'E2 (Lippman & Bolan, 1975). Cependant, la prolifération des cellules MCF-7 induite par l'E2 est inhibée par la 15d-PGJ<sub>2</sub> (agoniste endogène de PPAR $\gamma$ ) (Suzuki et al., 2006). De plus, dans ces cellules transfectées par le gène rapporteur codant la luciférase placé sous le contrôle d'un ERE, un traitement avec la 15d-PGJ<sub>2</sub> ou des agonistes synthétiques de PPAR $\gamma$  (GW1929 ou ciglitazone) inhibe l'activité de la luciférase en présence d'E2. Cela reflète l'inhibition de la voie génomique directe de la signalisation œstrogénique par les agonistes de PPAR $\gamma$  (Suzuki et al., 2006). Ce résultat est confirmé par l'analyse de l'expression de gènes positivement régulés par l'E2, tels que *trefoil factor 1 (TFF1/PS2)* et *progesterone receptor (PR)*, respectivement sous le contrôle de la voie génomiques directe (Brown et al., 1984) et indirecte (Read et al., 1988) de la signalisation œstrogénique. En effet, la 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibe l'effet stimulateur de l'E2 sur l'expression des gènes *TFF1/PS2* et *PR* (Suzuki et al., 2006). D'autre part, l'expression protéique du récepteur ESR1 diminue dans les cellules MCF-7 traitées avec la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la ciglitazone, mais l'effet de ces agonistes de PPAR $\gamma$  est bloqué en présence d'un inhibiteur du protéasome (Qin et al., 2003). Ainsi, le récepteur PPAR $\gamma$  exerce un effet inhibiteur sur la signalisation œstrogénique en induisant la dégradation du récepteur ESR1 par le protéasome.

## IV. La signalisation œstrogénique dans le testicule

### 1. Expression des récepteurs aux œstrogènes dans le testicule

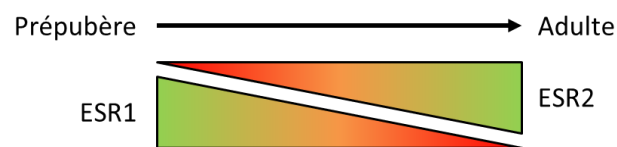
Une récente étude utilisant la méthode de PCR digitale en gouttelettes (ou *digital droplet PCR*, ddPCR) a permis d'établir le profil d'expression génique des trois ER au sein de différents tissus chez le rat adulte. Dans le testicule, les niveaux des transcrits d'ESR1, ESR2 et GPER sont quantifiables, bien que cette étude souligne une importante variabilité dans la proportion que représente l'expression de chaque ER. En effet, l'expression d'ESR1 représente un peu moins de 80% de l'expression totale des ERs, tandis que celles de GPER et ESR2 représentent respectivement environ 20% et moins de 1% de celle-ci (Hutson et al., 2019). Ces résultats sont en accord avec des expériences d'hybridation *in situ* qui indiquent un niveau important d'ESR1 mais faible d'ESR2 dans le testicule de rat adulte (Pelletier et al., 2000). Par ailleurs, les techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont permis une analyse plus fine, au niveau du transcrit ou de la protéine respectivement, de la localisation cellulaire des différents ERs au sein du testicule.

Chez le rat adulte, la localisation d'ESR1 était initialement considérée restreinte aux cellules de Leydig (Fisher et al., 1997; Mowa & Iwanaga, 2001; Shughrue et al., 1998), mais d'autres études ont mis en évidence sa présence dans les cellules germinales. Ainsi, il est généralement admis qu'ESR1 est exprimé dans les spermatoocytes pachytènes (Chimento et al., 2010; Pelletier et al., 2000) et les spermatides rondes (Chimento et al., 2011; Pelletier et al., 2000). En outre, une étude indique que le niveau de transcrits d'ESR1 au sein des tubes séminifères est six fois plus important que dans le tissu interstitiel chez le rat adulte (Bois et al., 2010).

La plupart des études rapportent également la présence des transcrits et de la protéine ESR2 dans les cellules de Leydig (Mowa & Iwanaga, 2001; Saunders et al., 1998), les spermatogonies (Van Pelt et al., 1999) les spermatoocytes pachytènes (Chimento et al., 2010; Van Pelt et al., 1999) et les spermatides rondes (Chimento et al., 2011; Shughrue et al., 1998; Van Pelt et al., 1999). De plus, d'importants niveaux d'ESR2 sont détectés dans les cellules de Sertoli chez le rat adulte (Bois et al., 2010; Pelletier et al., 2000; Saunders et al., 1998; Shughrue et al., 1998; Van Pelt et al., 1999).

Enfin, d'autres études décrivent la présence de transcrits et de la protéine GPER dans les spermatoocytes pachytènes (Chimento et al., 2010), les spermatides rondes (Chimento et al., 2011), les cellules de Sertoli (Lucas et al., 2010) et les cellules de Leydig (Vaucher et al., 2014).

Cependant, comme observé pour l'aromatase, l'expression des ERs dans le testicule varie au cours du développement. De manière générale, l'expression testiculaire des ERs est plus importante chez le rat adulte que chez les animaux immatures (Dostalova et al., 2017). En particulier, ESR1 est fortement exprimé dans les cellules de Sertoli de rat immature, aussi bien au niveau des transcrits (Bois et al., 2010) que de la protéine (Lucas et al., 2014) tandis que la plupart des études ne rapportent pas sa présence dans ce type cellulaire chez l'adulte. A l'inverse, les transcrits et la protéine ESR2 sont détectés dans les cellules de Sertoli des animaux adultes mais ne sont que faiblement exprimé dans ces cellules au cours des premiers stades de développement (Bois et al., 2010; Lucas et al., 2014; Van Pelt et al., 1999) (Figure 20).



**Figure 20 : Variation de l'expression d'ESR1 et ESR2 dans les cellules de Sertoli au cours du développement chez le rat**

## 2. Rôles de la signalisation œstrogénique dans le testicule

La capacité des cellules testiculaires à produire des œstrogènes ainsi que la présence des ERs dans les différents types cellulaires du testicule suggèrent un rôle important de la signalisation œstrogénique dans la fonction de reproduction chez le mâle, en particulier dans la régulation de la spermatogenèse. Celui-ci a d'abord été mis en évidence grâce à différents modèles de souris transgéniques. Des approches expérimentales (*in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*) de privation ou d'exposition aux œstrogènes, impliquant des agonistes, des antagonistes ou des inhibiteurs de différents acteurs de la signalisation œstrogénique ont permis une compréhension plus fine du rôle et des mécanismes d'action de celle-ci dans le testicule.

### i. Apport des modèles de souris transgéniques

Les principales caractéristiques phénotypiques des différents modèles de souris transgéniques présentés ci-après sont résumées dans le [tableau II](#).

**Tableau II : Caractéristiques des différents modèles de souris transgéniques**

	Fertilité	Testicule	Spermatozoïdes	Réf.
<b>ArKO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fertiles initialement</li> <li>Infertilité progressive</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Développement normal</li> <li>Altération progressive de la spermatogenèse</li> <li>Diminution nb spermatides</li> <li>Cryptorchidie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Normaux initialement</li> <li>Diminution progressive du nb de spermatozoïdes et de leur mobilité</li> </ul>	[1-3]
<b>AROM<sup>+</sup></b>	(F) <ul style="list-style-type: none"> <li>Infertiles (100%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Atrophie TS</li> <li>Arrêt spermatogenèse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Absence</li> </ul>	[4-6]
	(P) <ul style="list-style-type: none"> <li>Infertiles (50%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hypertrophie</li> <li>Tumeur leydigienne</li> <li>Atrophie testiculaire</li> <li>Dégénérescence TS</li> <li>Défaut de réabsorption du fluide épидидymaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NI</li> </ul>	[7]
<b>ESR1KO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Infertiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Désorganisation de l'ES (moins marquée que chez les animaux ESR1KO)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminution importante du nb de spermatozoïdes et de leur mobilité</li> </ul>	[8-11]
<b>NOER</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Infertiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Désorganisation de l'ES (moins marquée que chez les animaux ESR1KO)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminution du nb de spermatozoïdes et de leur mobilité</li> </ul>	[12-14]
<b>ENERKI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sous-fertiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Désorganisation de l'ES (moins marquée que chez les animaux ESR1KO)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminution du nb de spermatozoïdes et de leur mobilité</li> </ul>	[15]
<b>ESR2KO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Infertiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Normal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Normaux</li> </ul>	[16, 17]
<b>ESR1/2KO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Infertiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Idem ESR1KO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Idem ESR1KO</li> </ul>	[18]
<b>GPERKO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fertiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NI</li> </ul>	[19]

**ArKO** : souris invalidées pour le gène *Cyp19a1* codant pour l'aromatase ; **AROM<sup>+</sup>** : souris surexprimant l'aromatase dès la vie fœtale (F) ou à partir de la puberté (P) ; **ESR1KO** : souris invalidées pour le gène *Esr1* ; **NOER** : souris « *nuclear-only ESR1* », localisation membranaire de ESR1 impossible ; **ENERKI** : souris « *Estrogen Non responsive Estrogen Receptor 1 Knock-In* », liaison ligand-récepteur impossible ; **ESR2KO** : souris invalidées pour le gène *Esr2* ; **ESR1/2KO** : souris invalidées pour les gènes *Esr1* et *Esr2* ; **GPERKO** : souris invalidées pour le gène *Gper* ; nb : nombre ; TS : tubes séminifères ; ES : épithélium séminifère ; NI : non investigué.

**Références** : [1] Fisher et al, 1998 ; [2] Robertson et al, 1999 ; [3] Robertson et al, 2001 ; [4] Li et al, 2001 ; [5] Li et al, 2006 ; [6] Li et al, 2008 ; [7] Fowler et al, 2000 ; [8] Eddy et al, 1996 ; [9] Lee et al, 2000 ; [10] Joseph et al, 2010 ; [11] Joseph et al, 2011 ; [12] Adlanmerini et al, 2014 ; [13] Pedram et al, 2014 ; [14] Nanjappa et al, 2016 ; [15] Sinkevicius et al, 2009 ; [16] Krege et al, 1998 ; [17] Antal et al, 2008 ; [18] Dupont et al, 2000 ; [19] Otto et al, 2009

#### ❖ Manipulation de l'expression du gène codant pour l'aromatase

Un modèle de souris transgéniques incapables de produire des œstrogènes a été généré en invalidant le gène codant pour l'aromatase (*Cyp19a1* ; souris ArKO) (Fisher et al., 1998). Les souris mâles ArKO présentent un développement testiculaire normal et sont initialement fertiles. Cependant, ces animaux deviennent progressivement infertiles en raison de l'altération de la spermatogenèse qui survient entre l'âge de 4 mois et un an. Celle-ci est caractérisée par une diminution du nombre de spermatides rondes et allongées, et résulte en une diminution du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité (Robertson et al., 2001, 1999). Ainsi, les œstrogènes semblent être requis pour le bon déroulement des dernières étapes de la spermatogenèse.



Ce dernier point est supporté par le fait qu'un apport exogène en phytoœstrogènes restaure partiellement, mais de façon significative, le nombre de cellules germinales chez les animaux ArKO âgés d'un an (Robertson et al., 2002).

Cependant, différents modèles de souris transgéniques surexprimant l'aromatase (AROM<sup>+</sup>) démontrent l'effet délétère de l'excès d'œstrogènes sur le testicule. Deux modèles de souris AROM<sup>+</sup> ont été générés en plaçant le gène *Cyp19a1* sous le contrôle de deux promoteurs distincts, l'un induisant la surexpression de l'aromatase dès la vie fœtale (Li et al., 2001), l'autre à partir de la puberté (Fowler et al., 2000). Dans les deux cas, la surexpression de l'aromatase induit une conversion plus importante de testostérone en E2, déséquilibrant ainsi le ratio androgènes/œstrogènes (Fowler et al., 2000 ; Li et al., 2001). Lorsque la surexpression de l'aromatase survient dès la vie fœtale, l'ensemble des souris mâles AROM<sup>+</sup> est stérile et présente une atrophie des tubes séminifères en raison de l'arrêt de la spermatogenèse accompagné de la diminution drastique du nombre de cellules germinales. Cependant, tous ces animaux présentent une cryptorchidie bilatérale. Ainsi, si cette dernière semble être due à l'aromatation excessive des androgènes en œstrogènes au cours de la vie fœtale, les effets observés chez l'adulte peuvent quant à eux être imputés à cette position anormale des testicules (Li et al., 2006, 2001; Li & Rahman, 2008). En revanche, lorsque la surexpression de l'aromatase survient à la puberté, environ la moitié des mâles AROM<sup>+</sup> est infertile. Ces animaux présentent une hypertrophie testiculaire uni- ou bilatérale associée au développement de tumeurs à cellules de Leydig (Fowler et al., 2000).

Les modèles de souris transgéniques ArKO et AROM<sup>+</sup> soulignent le rôle des œstrogènes dans le bon déroulement de la spermatogenèse, en particulier lors de l'étape de spermiogenèse, et mettent d'autre part en exergue l'importance de préserver l'équilibre physiologique du ratio androgènes/œstrogènes pour le développement et le maintien de la lignée germinale (Li & Rahman, 2008; Williams et al., 2001).

#### ❖ Manipulation de l'expression des gènes codant pour les ERs

Les œstrogènes agissent par le biais de leurs récepteurs spécifiques, largement distribués dans les différents types cellulaires du testicule. Afin d'étudier plus précisément le rôle et les mécanismes d'action des œstrogènes dans le testicule, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été générés.

Chez les souris mâles invalidées pour le gène *Esr1* (souris ESR1KO), on observe une dégénérescence progressive des tubes séminifères, qui débute à l'âge de 6 semaines et devient marquée à partir de

l'âge de 4 mois (Eddy et al., 1996). De plus, la production spermatique ainsi que la mobilité des spermatozoïdes sont réduites. Ces derniers présentent des anomalies morphologiques et sont par ailleurs incapable de féconder un ovocyte *in vitro* (Eddy et al., 1996). En conséquence, les souris mâles ESR1KO sont infertiles. L'ensemble de ces altérations semble résulter d'un défaut de réabsorption du fluide épидидymaire qui s'accumule dans la lumière des tubes séminifères et cause l'atrophie testiculaire (Eddy et al., 1996; Joseph et al., 2011, 2010; Lee et al., 2000).

Un modèle de souris transgénique développé plus récemment a permis d'étudier spécifiquement le rôle du récepteur ESR1 membranaire. Ces souris « *nuclear-only ESR1* » (NOER) expriment des niveaux normaux d'ESR1 fonctionnel, mais une mutation ponctuelle au niveau d'un site de palmitoylation empêche la localisation membranaire du récepteur (Adlanmerini et al., 2014; Pedram et al., 2014). Les souris mâles NOER présentent des anomalies histologiques de l'épithélium séminifères similaires, bien que moins sévères, à celles observées chez les souris ESR1KO. De même, une diminution importante de la production spermatique et de la mobilité des spermatozoïdes, accompagnée d'une forte augmentation du nombre de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques sont constatées chez ces souris. En conséquence, les souris mâles NOER sont infertiles (Nanjappa et al., 2016). Ainsi, bien que seuls 5 à 10% des récepteurs ESR1 soient adressés à la membrane plasmique, ce modèle souligne l'importance cruciale du *pool* d'ESR1 membranaire dans la fonction de reproduction chez le mâle (Cooke and Walker, 2022).

Par ailleurs, le récepteur ESR1 peut également être activé en absence de ligand (Bennessch & Picard, 2015). Un modèle de souris transgéniques « *Estrogen Non responsive Estrogen Receptor 1 Knock-In* » (ENERKI) a été développé afin de permettre la distinction des modes d'action dépendant et indépendant du ligand d'ESR1. La présence d'une mutation ponctuelle (G525L) dans le LBD d'ESR1 réduit significativement l'interaction de l'E2 avec le récepteur, mais la voie indépendante du ligand demeure fonctionnelle (Sinkevicius et al., 2008). Contrairement aux souris ESR1KO, les souris ENERKI ne présentent pas de défaut de réabsorption du fluide épидидymaire, ce qui indique que le récepteur ESR1 agit selon un mécanisme indépendant du ligand pour réguler cet évènement (Sinkevicius et al., 2009). Ceci est par ailleurs cohérent avec le fait que ce défaut n'est pas observé chez les souris ArKO (Robertson et al., 2001, 1999). De façon plus tardive et initialement moins importante que chez les souris ESR1KO, une désorganisation de l'épithélium séminifère est néanmoins observée chez les souris ENERKI, caractérisée par la vacuolisation des cellules de Sertoli, l'apoptose des spermatocytes et la perte de spermatides rondes et allongées. Cela entraîne une diminution du nombre de spermatozoïdes, et les souris ENERKI présentent une altération modérée de la fertilité (Sinkevicius et al., 2009). Ces résultats indiquent que la voie de signalisation dépendante du ligand médiée par ESR1 est essentielle pour la viabilité des cellules germinales et le bon déroulement de la spermatogenèse.

Plusieurs modèles de souris invalidées pour le gène codant pour ESR2 (ESR2KO) ont permis d'étudier le rôle de ce récepteur dans le testicule (Antal et al., 2008; Krege et al., 1998). La première équipe à avoir généré ce modèle rapporte que les souris mâles ESR2KO sont fertiles et présentent une histologie testiculaire normale (Krege et al., 1998). Cependant, l'existence de plusieurs transcrits d'épissage alternatif, susceptibles de générer des formes tronquées de la protéine ESR2 dépourvue de DBD, complique l'analyse des résultats. Un second modèle de souris ESR2KO, véritablement invalidé pour le gène codant ESR2, génère des souris mâles stériles (Antal et al., 2008). L'origine de cette stérilité n'est pas connue, car ces souris mâles ESR2KO présentent une histologie normale du testicule et de l'épididyme, et que la morphologie des spermatozoïdes ainsi que leur mobilité sont également normales. Les auteurs supposent ainsi l'existence de troubles du comportement sexuel pour expliquer ce résultat (Antal et al., 2008). La spermatogenèse complète observée chez les animaux ESR2KO ainsi que l'absence d'anomalie histologique suggèrent un rôle non-essentiel de ce récepteur dans le testicule.

La double invalidation des gènes codant pour ESR1 et ESR2 résulte en un phénotype proche de celui observé chez les souris ESR1KO, et les animaux sont stériles (Dupont et al., 2000). Ce résultat confirme qu'ESR1 est fonctionnellement plus important qu'ESR2 dans le testicule (Cooke et al, 2017).

Par ailleurs, les souris mâles invalidées pour l'expression du gène codant pour GPER (GPERKO) sont fertiles (Otto et al., 2009). Notons toutefois que cette étude n'inclut pas d'analyse précise de la spermatogenèse chez les souris GPERKO, bien que les auteurs rapportent un développement normal des organes reproducteurs chez ces animaux.

L'ensemble des données issues des différents modèles de souris transgéniques indique le rôle essentiel du récepteur ESR1 dans le testicule, aussi bien au travers de la voie génomique classique que de la voie non-génomique initiée à la membrane plasmique et la voie indépendante du ligand.

D'autres approches expérimentales, développées dans la section suivante, confirment ces données mais soulignent également l'implication des récepteurs ESR2 et GPER dans la signalisation œstrogénique dans le testicule.

## ii. Apport des expériences de privation ou d'exposition aux œstrogènes

Des expériences de privation en œstrogènes réalisées par administration d'inhibiteurs de l'aromatase (CGP47645 ou Létrozole) montrent d'importants défauts de la morphologie testiculaires chez les animaux exposés. Chez le singe adulte, le traitement au CGP47645 induit une diminution marquée du

nombre de spermatides rondes et allongées, du nombre de spermatozoïdes et de la mobilité de ces derniers (Shetty et al., 1998, 1997). De la même façon, l'administration de Létrozole altère l'épithélium séminifère chez les rongeurs adultes (Kondarewicz et al., 2012). Ceci est notamment associé à la libération précoce de cellules germinales immatures dans la lumière des tubes séminifères, la diminution de la division des spermatocytes en spermatides rondes et allongées, et l'augmentation de l'apoptose au sein des tubes séminifères (Kondarewicz et al., 2012; Verma & Krishna, 2017). Ces effets sont similaires à ceux observés chez les souris ArKO (Fisher et al., 1998; Robertson et al., 2001, 1999). Par ailleurs, l'exposition chronique au Létrozole augmente le niveau d'expression protéique d'AR et diminue celui d'ESR1, ESR2 et de l'aromatase (Pilutin et al., 2014). Chez des souris hypogonadotropes (*hpg*), qui présentent en conséquence de très faibles niveaux de stéroïdes sexuels, la spermatogenèse est bloquée au stade spermatocytes pachytènes. Le développement d'un petit nombre de spermatides rondes est observé après un traitement de 35 jours permettant de restaurer le niveau circulant physiologique d'E2, et une spermatogenèse complète est obtenue après un traitement de 70 jours (Ebling et al., 2000).

Cependant, un apport exogène en œstrogènes perturbe le développement testiculaire et la mise en place de la spermatogenèse chez les animaux immatures. Chez le rat, une exposition continue à l'œstradiol benzoate (œstrogène synthétique) dès la période néonatale inhibe le développement testiculaire à partir de 25 *jpp*. La première vague de spermatogenèse débute normalement mais est interrompue au stade spermatocytes pachytènes (Steinberger & Duckett, 1965). Par ailleurs, chez des rats prépubères exposés entre 1 et 15 *jpp*, l'œstradiol benzoate augmente la prolifération des spermatogonies mais inhibe le développement des cellules germinales pré-méiotiques et augmente l'apoptose des cellules germinales (Walczak-Jędrzejowska et al., 2013). Une exposition similaire (2 à 12 *jpp*) au diéthylstilbestrol (œstrogène synthétique ; DES) diminue également le nombre de spermatocytes chez les rats de 18 *jpp* exposés à la plus forte dose (10 µg) tandis que de plus faibles doses (0,1 et 0,01 µg) ont un effet stimulateur sur ce paramètre. A l'âge adulte, seuls les animaux exposés à la forte dose de DES (10 µg) présentent une diminution marquée du poids testiculaire (Atanassova et al., 2000). D'autre part, une étude menée par notre équipe démontre qu'une exposition à l'E2 en période prépubère (15 à 30 *jpp*) perturbe la mise en place de la spermatogenèse chez les rats immatures. A 30 *jpp*, les animaux exposés à l'E2 (20 µg/kg de poids corporel/jour) présentent une diminution du poids testiculaire associé à un retard de la mise en place de la spermatogenèse. Ce dernier est mis en évidence par une diminution du nombre de tubes séminifères possédant une lumière et une diminution de l'expression génique de marqueurs des spermatocytes et des spermatides (Brouard et al., 2016). De la même manière, des rats prépubères exposés plus tardivement (28-56 *jpp*) à l'E2 (100 µg/kg de poids corporel/jour) présentent une diminution du poids

testiculaire. L'analyse du sperme de ces animaux révèle une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes, ainsi qu'une augmentation du nombre de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques (Li et al., 2016).

Ces altérations des paramètres quantitatif et qualitatif des spermatozoïdes sont fréquemment retrouvées chez les animaux exposés aux œstrogènes à l'âge adulte (Gill-Sharma et al., 2001; Hunt et al., 1979, 1978; Liu et al., 2013). Plusieurs études imputent ce phénomène à la perturbation de la spermatogenèse induite par l'apport exogène d'œstrogène. Chez le rat adulte, l'E2 (10 µg/kg de poids corporel/jour) altère la progression de la méiose et inhibe la division des spermatocytes en spermatides (Liu et al., 2013). Par ailleurs, un défaut de spermiation est observé chez des animaux exposés à l'E2 (20 µg/kg de poids corporel/jour). Les auteurs de cette étude attribuent ce défaut de spermiation à la diminution des niveaux de gonadotrophines et de testostérone (D'Souza et al., 2005). Cependant, d'autres travaux indiquent que ce défaut de spermiation est associé à la dérégulation de l'expression de nombreux gènes dont un nombre significatif possèdent un ERE, démontrant ainsi l'implication directe des œstrogènes dans ce phénomène (Balasinor et al., 2010; Kumar et al., 2017, 2016).

Néanmoins, un point intéressant est soulevé ici. Il n'est pas aisé d'étudier *in vivo* l'effet direct des œstrogènes sur le testicule et la spermatogenèse car l'apport exogène en œstrogènes peut réguler l'axe HPG. En effet, une diminution des niveaux de FSH, de LH et de testostérone est fréquemment rapportée chez les animaux exposés aux œstrogènes (D'Souza et al., 2005; Gill-Sharma et al., 2001; Hunt et al., 1979; Jeminiwa et al., 2021). Les œstrogènes peuvent par ailleurs exercer un effet direct sur les cellules de Leydig. Une approche *ex vivo* indique qu'une exposition au DES ( $10^{-6}$  M) inhibe la biosynthèse de testostérone dans des explants testiculaires de rat de 2 *jpp* (Delbès et al., 2005). Dans des cellules de Leydig isolées à partir de testicules de rat adulte, l'E2 ( $10^{-7}$  M) inhibe l'effet stimulateur de la LH sur la stéroïdogénèse au travers d'un mécanisme impliquant l'activation du récepteur transmembranaire GPER (Vaucher et al., 2014). Dans une lignée tumorale de cellules de Leydig de rat (R2C), l'activation de ce récepteur diminue la viabilité des cellules en culture en induisant l'apoptose (Chimento et al., 2013). De plus, les œstrogènes ont un impact sur le développement des cellules des Leydig. Chez le rat, une injection d'œstradiol dipropionate (œstrogène synthétique) à 5 *jpp* inhibe le développement des cellules de Leydig matures dans le testicule des animaux pubères (60 *jpp*) (Dhar & Setty, 1976). Chez le rat adulte traité à l'éthane diméthane sulfonate (EDS), un agent alkylant qui élimine spécifiquement les cellules de Leydig (Teerds & Rijntjes, 2007), l'E2 (0,25 mg/kg) retarde la régénération des cellules de Leydig (Abney, 1999; Chen et al., 2014).

Des approches *ex vivo* et *in vitro* permettent de s'affranchir des effets indirects qu'exercent les œstrogènes sur la spermatogenèse au travers de la régulation de l'axe HPG. Par ailleurs, ces études permettent une étude plus précise des mécanismes d'action des œstrogènes grâce à l'emploi d'agonistes ou d'antagonistes des différents récepteurs ainsi que d'inhibiteurs de différentes voies de signalisation.

Une série d'études conduites sur des cellules de Sertoli isolées à partir de testicule de rats prépubères ont permis de déterminer les multiples actions des œstrogènes au sein de ces cellules (Macheroni et al., 2020). L'activation du récepteur GPER par l'E2 ( $10^{-10}$  M) active des cascades de signalisation intracellulaire (MAPK et PI3K) et inhibe l'apoptose des cellules de Sertoli en stimulant l'expression de BCL2, un facteur anti-apoptotique, et en inhibant celle de BAX, un facteur pro-apoptotique (Lucas et al., 2010; Royer et al., 2012). Par ailleurs, l'E2 induit la translocation des récepteurs ESR1 et ESR2 à la membrane plasmique (Lucas et al., 2008). L'interaction de l'E2 avec ESR1 promeut la prolifération cellulaire au travers de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) qui régule positivement l'expression de la cycline D1 (Lucas et al., 2014). Au contraire, l'interaction de l'E2 avec ESR2 active la voie CREB (*cAMP response element-binding protein*), induit la sortie du cycle en augmentant l'expression d'un inhibiteur du cycle cellulaire (CDKN1B) et promeut la différenciation des cellules de Sertoli en régulant positivement l'expression de facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation cellulaire (GATA-1 et DMRT1) (Lucas et al., 2014). L'ensemble de ces travaux a été conduit sur des cellules de Sertoli issues de rat de 15 *jpp*. Rappelons que chez le rat, c'est à cet âge que survient la transition entre la fin de la période de prolifération des cellules de Sertoli et le début de leur différenciation. De plus, cet événement coïncide avec la diminution progressive de l'expression d'ESR1 et l'augmentation de l'expression d'ESR2 dans ces cellules (Bois et al., 2010; Lucas et al., 2014; Van Pelt et al., 1999). Ainsi, ces études indiquent le rôle crucial des œstrogènes dans la régulation de la prolifération (interaction avec ESR1) et de la différenciation (interaction avec ESR2) des cellules de Sertoli chez le rat prépubère.

La différenciation des cellules de Sertoli est nécessaire au bon déroulement de la spermatogenèse. Au travers de leur effet sur les cellules de Sertoli, les œstrogènes jouent ainsi un rôle dans la spermatogenèse. Cependant, d'autres études mettent en évidence un rôle direct des œstrogènes sur les cellules germinales. En particulier, l'E2 (1  $\mu$ M) stimule la prolifération des gonocytes isolés à partir de testicule de rat de 3 *jpp* (Thuillier et al., 2010). De même, l'E2 ( $10^{-7}$  M) active la cascade de signalisation EGFR/ERK/c-fos au travers des récepteurs GPER et ESR1, et promeut ainsi la prolifération des cellules GC-1, une lignée de spermatogonies murines (Sirianni et al., 2008).

En revanche, l'activation des récepteurs ESR1 et GPER par l'E2 ( $10^{-7}$  –  $10^{-6}$  M) inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose des spermatocytes, aussi bien dans la lignée cellulaire GC-2 (lignée dérivée de spermatocytes murins) (Chimento et al., 2012) que dans des spermatocytes pachytènes isolés à partir de testicule de rat adulte (Chimento et al., 2010). Enfin, dans les spermatides rondes isolées à partir de testicule de rat adulte, l'E2 ( $10^{-6}$  M) exerce des effets pro-apoptotiques au travers de l'activation des récepteurs GPER et/ou ESR1, tandis que l'activation du récepteur ESR2 inhibe l'apoptose et promeut la différenciation de ces cellules (Chimento et al., 2011).

L'ensemble des données issues des études *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* soulignent le rôle crucial de la signalisation œstrogénique dans la mise en place de la spermatogenèse en période prépubère et le maintien de son bon déroulement à l'âge adulte ainsi que la régulation de la stéroïdogénèse. En effet, au travers d'effets directs ou indirects (régulation de l'axe HPG), les œstrogènes régulent la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules de Leydig, des cellules de Sertoli et des cellules germinales, et sont par ailleurs impliqués dans le processus de spermiation.

# Chapitre 3 | Les perturbateurs endocriniens

## I. Contexte et généralités

### 1. Émergence du concept de perturbation endocrinienne

A partir de la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, certains phénomènes observés dans la faune sauvage ont progressivement mené à l'émergence du concept de « perturbation endocrinienne ». Au milieu des années 1950 en Amérique du Nord, les ornithologues observent un déclin important de la population de certains rapaces en raison de la fragilisation de la coquille des œufs et de la stérilité d'un nombre croissant d'individus. Ces deux phénomènes seront par la suite attribués à la contamination des oiseaux par le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), un puissant insecticide massivement utilisé à partir du début des années 1950 (Carson, 1962). Dans les années 1970, la masculinisation des femelles de certaines espèces de gastéropodes marins (notamment de l'espèce *Nucella lapillus*) survient dans les régions côtières à proximité du port de Plymouth (Royaume-Uni). Ce phénomène dit « d'imposexe » rend les femelles atteintes totalement inaptes à la reproduction. En conséquence, un fort déclin de la population de *Nucella lapillus* est observé. Ces effets sont liés à la contamination de l'environnement marin par le tributylétain (TBT), un composé retrouvé dans les peintures anti-salissures utilisées pour protéger la coque des bateaux (Blaber, 1970; Bryan et al., 1987; Gibbs & Bryan, 1996). Dans les années 1980, une étude rapportant d'importantes malformations des organes génitaux chez les jeunes alligators mâles du lac d'Apopka (Floride, États-Unis) incrimine de nouveau le DDT, déversé en grande quantité dans les eaux du lac suite à un accident industriel survenu quelques années plus tôt dans la région (Guillette et al., 1994). Des expérimentations conduites par la suite démontrent que les deux composés cités dans les exemples susmentionnés, le DDT et le TBT, sont respectivement capables d'interagir avec les récepteurs aux œstrogènes (Chen et al., 1997) et d'inhiber l'aromatase (Fent, 1996; Matthiessen & Gibbs, 1998).

Ainsi, le lien entre les altérations de la fonction de reproduction chez différentes espèces animales et la présence dans l'environnement de polluants capables de perturber le fonctionnement du système endocrinien est établi. Dans le même temps, des études épidémiologiques démontrent l'existence de phénomènes similaires dans la population humaine. Dans ce contexte, on peut notamment citer l'exemple du diéthylstilbestrol (DES). Cet œstrogène de synthèse commercialisé en France sous le nom de Distilbène à partir de la fin des années 1940 fût prescrit dans le but de prévenir les avortements spontanés. Cependant, au début des années 1970, une surreprésentation des cas d'infertilité, de malformations génitales, et d'adénocarcinome de l'utérus et du vagin est observée chez de jeunes femmes exposées *in utero* au DES (Herbst et al., 1971; Kaufman et al., 1977).



C'est dans ce contexte que le terme de « perturbateur endocrinien » est introduit pour la première fois en 1991 lors de la conférence de Wingspread. Cette conférence a donné lieu à une déclaration de consensus indiquant notamment que de nombreux composés synthétiques libérés dans la nature par l'Homme, ainsi que certains composés naturels, sont capables de perturber le fonctionnement du système endocrinien des animaux, y compris de l'espèce humaine (Colborn & Clement, 1992).

## 2. Définition et généralités

Il n'existe pas de définition consensuelle du terme « perturbateur endocrinien » (PE). La définition la plus communément admise est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui décrit les PE comme « une substance ou un mélange exogène qui altère les fonctions du système endocrinien et induit en conséquence des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact ou de ses descendants, ou au sein de (sous)-populations » (OMS, 2002).

Certaines caractéristiques des PE compliquent l'identification de ces substances (Gore et al., 2015). En effet, il existe parfois un temps de latence entre l'exposition à un PE et la manifestation d'un trouble. C'est par exemple le cas lors d'une exposition fœtale ou néonatale conduisant au développement d'une maladie à l'âge adulte (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Ainsi, les conséquences d'une exposition peuvent n'être apparentes qu'après plusieurs années, rendant ainsi difficile l'identification de la substance responsable du développement de la maladie.

Par ailleurs, alors qu'en toxicologie il est classiquement admis que « la dose fait le poison » (paradigme de Paracelse), les PE présentent des relations dose-effet non conventionnelles (Figure 21).

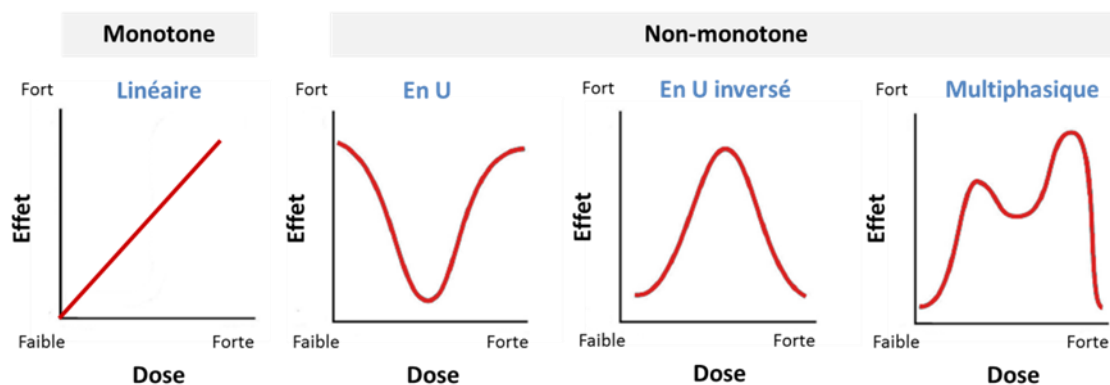


Figure 21 : Relation dose-effet monotone et non-monotone

(modifié, d'après Vandenberg et al., 2012)

Plus précisément, les effets d'une substance suivent généralement deux modèles : un modèle dose-dépendant linéaire (monotone) selon lequel les effets sont fonction de la dose, ou un modèle « tout-ou-rien » selon lequel les effets ne se manifestent qu'au-delà d'un certain seuil. Au contraire, les PE présentent généralement des courbes dose-réponse non-monotones en U (effet maximal à faibles doses et/ou à fortes doses) ou en U inversé (effet maximal aux doses intermédiaires) (Vandenberg et al., 2012). Ainsi, les effets de certains PE sont plus importants à faible dose qu'à forte dose. Ces relations dose-effet non-monotones expliquent l'existence de données contradictoires sur les effets des PE et compliquent l'identification claire des effets néfastes liés à l'exposition aux PE. Par ailleurs, cela implique que le concept de seuil de toxicité sur lequel sont basées les réglementations relatives à l'utilisation de certaines substances pourrait ne pas être applicable dans le cas des PE. De plus, un tel seuil de toxicité est susceptible de varier considérablement selon le paramètre physiologique étudié.

La complexité de ce dernier point est accrue par le fait qu'il soit fréquent d'être exposé simultanément à plusieurs substances en raison de la présence d'un grand nombre de polluants, y compris de PE, dans notre environnement. Les effets des PE en mélange sont difficiles à prévoir, mais il a été démontré que certains PE peuvent avoir des effets additionnels, voire synergiques (Hamid et al., 2021). Ce phénomène, connu sous le nom « d'effet cocktail », implique que certains PE présents individuellement à des doses « inoffensives » dans l'environnement peuvent avoir des effets délétères lorsqu'ils sont retrouvés en mélange (Kortenkamp et al., 2007). Néanmoins, il apparaît important de déterminer l'impact d'un composé isolé afin d'appréhender son effet en mélange (Kortenkamp et al., 2007).

Pour toutes ces raisons, l'identification du caractère PE d'une substance est difficile. Néanmoins, la définition du concept de perturbation endocrinienne a permis de classer plusieurs centaines de composés en tant que PE (reconnu ou potentiel), parmi lesquels on peut citer : des substances naturelles telles que les hormones produites par les mammifères, les phyto-œstrogènes, ou encore certaines toxines produites par des champignons (mycotoxines) ; des hormones de synthèse développées spécifiquement pour moduler le système endocrinien telles que les contraceptifs oraux ou les traitements hormonaux de substitution ; des produits chimiques massivement utilisés dans les secteurs agricoles (insecticides, biocides) et industriels (plastifiants, retardateurs de flammes) en raison de certaines de leurs propriétés physico-chimiques (Tableau III).

**Tableau III : Liste non exhaustive de substances classifiées en tant que PE (reconnu ou potentiel)**

<b>Substances naturelles</b>	<b>Hormones mammifères</b> <b>Phyto-oestrogènes</b> : isoflavones, coumestanes, lignanes <b>Mycotoxines</b> : zéaralénone et ses métabolites
<b>Hormones de synthèse</b>	<b>Contraceptifs oraux</b> : éthynil-œstradiol <b>Traitement hormonaux</b> : diéthylstilbestrol (DES)
<b>Produits chimiques</b>	<b>Pesticides</b> : dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), Lindane, Chlordécone, tributylétain (TBT) <b>Plastifiants</b> : Phthalates, bisphénols, alkylphénols <b>Conservateurs</b> : Parabènes, Triclosan <b>Produits à usage industriel</b> : dioxines (polychlorodibenzodioxine, PCDD), furanes (polychlorodibenzofurane, PCDF) polychlorobiphényles (PCB)

Ainsi, le terme de perturbateur endocrinien désigne un vaste groupe hétérogène de substances, de structure et d'origine variées. Ces composés partagent toutefois des éléments communs : leur effet nocif sur la santé induit par l'altération de l'homéostasie du système endocrinien. En conséquence, les PE peuvent être catégorisés en fonction de leurs mécanismes d'action.

### 3. Principaux mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens

La perturbation du système hormonal induite par les PE est liée à 3 principaux mécanismes d'action : la modification de la concentration en hormones endogènes, l'altération de l'expression des récepteurs hormonaux et l'interaction avec les récepteurs hormonaux (Figure 22) (La Merrill et al., 2020).

#### i. Modification de la concentration hormonale

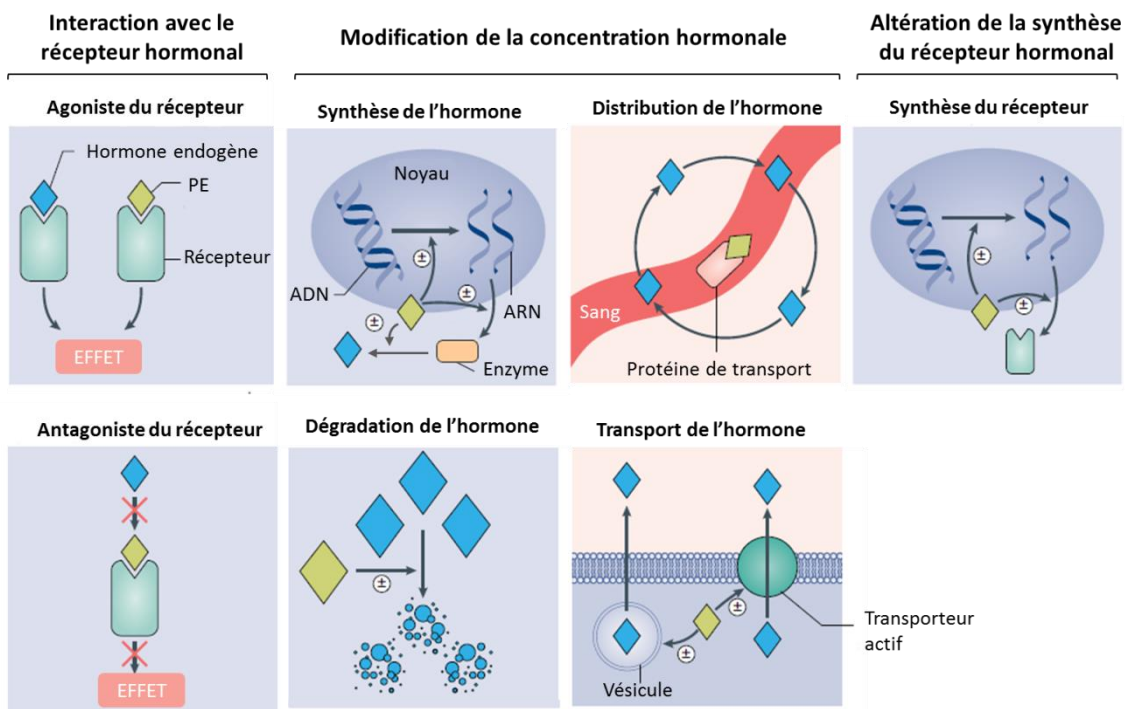
Certains PE sont capables de modifier la concentration des hormones endogènes en altérant leur synthèse, leur excrétion, leur transport ou leur métabolisme. Les PE sont notamment capables de moduler le niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse (Jin et al., 2013) et/ou de perturber le fonctionnement de ces enzymes en stimulant ou en inhibant leur activité (Baravalle et al., 2018), modifiant ainsi le niveau d'hormones produit. Par ailleurs, certaines substances peuvent altérer le taux d'hormone circulant en interférant avec les protéines de transport comme la sex hormone-binding globulin (SHBG) (Sheikh et al., 2016). D'autre part, cette modification de la biodisponibilité hormonale peut aussi résulter d'une altération du métabolisme induite par les PE, notamment au travers de la modulation du catabolisme de ces hormones (La Merrill et al., 2020).

## ii. Altération de l'expression du récepteur hormonal

En plus de l'altération de la concentration hormonale, les PE peuvent modifier l'expression des récepteurs hormonaux en modulant leur internalisation ainsi que leur dégradation (La Rosa et al., 2014). Puisque les actions des hormones sont médiées par les récepteurs hormonaux, l'abondance de ces derniers peut moduler l'ampleur de l'effet de l'hormone (La Merrill et al., 2020).

## iii. Interaction avec les récepteurs hormonaux

De par leur structure, certains PE sont capables d'interagir avec des récepteurs hormonaux. Cette interaction peut être de type agoniste ou antagoniste, et engendre une réponse dépendante de l'affinité du PE pour le récepteur (Toporova & Balaguer, 2020). Dans le cas d'une interaction de type antagoniste, le PE se fixe sur le récepteur hormonal sans l'activer. Il inhibe l'interaction entre l'hormone endogène et son récepteur en « bloquant » le récepteur, ce qui altère son fonctionnement. C'est par exemple le cas des PE anti-androgéniques tels que le flutamide (Viguiert-Martinez et al., 1983). En revanche, dans le cas d'une interaction de type agoniste, la liaison du PE à un récepteur hormonal active sa voie de signalisation. Ainsi, les PE peuvent agir en « mimant » l'action de l'hormone endogène. C'est le cas de certains PE capables d'activer la signalisation œstrogénique : les xénoœstrogènes (Hall & Korach, 2002).



**Figure 22 : Principaux mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens (PE)**

(modifié, d'après l'illustration originale de La Merrill et al., 2020)

#### 4. Perturbateurs endocriniens et fonction de reproduction chez le mâle

Le taux d'incidence global d'infertilité a doublé au cours des dernières décennies, passant de 7-8% dans les années 1960 à 15% plus récemment (Mascarenhas et al., 2012). Concernant le déclin de la santé reproductive des hommes, les premières inquiétudes ont été soulevées par l'étude de Carlsen et collaborateurs qui a révélé une diminution de moitié du nombre de spermatozoïdes entre 1940 et 1990 chez des hommes du monde entier (Carlsen et al., 1992). D'autres études ont par la suite confirmé ces observations en démontrant une diminution à la fois quantitative (oligospermie) et qualitative du sperme (Bay et al., 2006; Sharpe, 2006). Dans le même temps, une augmentation de la survenue de cancers du testicule et d'anomalies congénitales telles que la cryptorchidie (absence de descente testiculaire) et l'hypospadias (ouverture de l'urètre dans la face inférieure du pénis au lieu de son extrémité) a été observée dans plusieurs pays (Ferguson & Agoulnik, 2013; Hutson, 2000) (Figure 23).

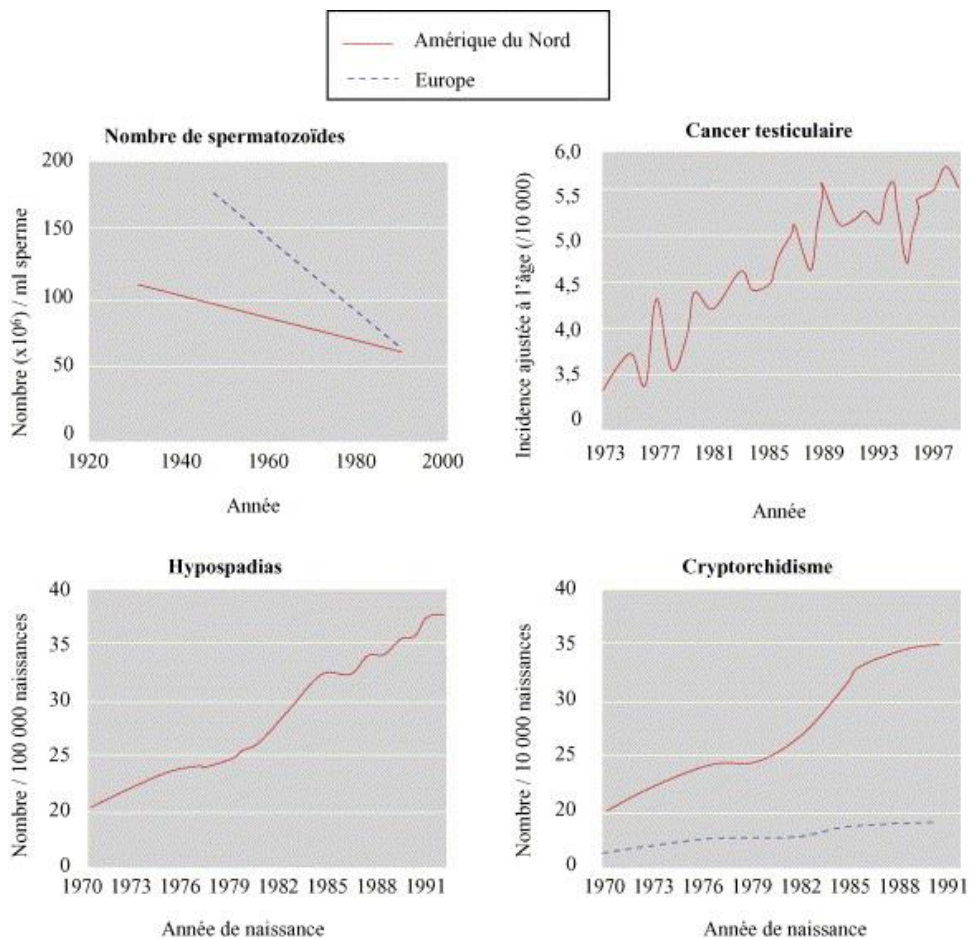


Figure 23 : Évolution du nombre de spermatozoïdes et de l'incidence d'anomalies des organes génitaux masculins (Habert et al., 2006)

L'ensemble de ces anomalies (oligospermie, cryptorchidie, hypospadias et cancer du testicule) peuvent être corrélées. Il apparaît que la cryptorchidie constitue un facteur de risque aux trois autres anomalies, et que l'hypospadias et l'oligospermie prédisposent au cancer du testicule (Skakkebaek et al., 2001). Sur la base de ces constats, le terme de « syndrome de dysgénésie testiculaire » (SDT) a été introduit au début des années 2000 par N. Skakkebaek qui a émis l'hypothèse que ces anomalies pourraient avoir une origine commune et constituer différents symptômes d'un même syndrome (Skakkebaek et al., 2001).

Les malformations des organes génitaux, la cryptorchidie et l'hypospadias, sont présentes dès la naissance, indiquant l'origine fœtale du SDT. Comme nous l'avons vu au cours du premier chapitre de l'introduction, le testicule se forme précocement au cours de la vie fœtale, et se trouve initialement en position abdominale. La descente testiculaire en position scrotale peut être divisée en deux phases, chacune régulée par des hormones clés produites par les cellules de Leydig : une première phase trans-abdominale sous le contrôle d'INSL3, suivie d'une phase inguino-scrotale régulée par les androgènes. Par ailleurs, le développement pénien et la différenciation de l'urètre s'effectuent sous l'influence des androgènes et des œstrogènes (Kalfa et al., 2010). Ainsi, une perturbation de la production ou de l'action de ces hormones pourrait être à l'origine de cryptorchidie et d'hypospadias (Rodprasert et al., 2020). Cette hypothèse est étayée par plusieurs études d'inactivation de gènes conduites sur le modèle souris. En effet, une cryptorchidie bilatérale est observée chez des souris *KO* pour *Insl3* (Nef & Parada, 1999). De plus, des souris *KO* pour le récepteur aux androgènes présentent à la fois une cryptorchidie et un hypospadias (Yeh et al., 2002). Enfin, des souris *KO* pour *ESR1* présentent un hypospadias (Govers et al., 2019), et un phénotype similaire est observé chez des souris *KO* pour l'aromatase (Cripps et al., 2019).

Généralement, les testicules cryptorchides présentent une histologie normale à la naissance. Cependant, chez l'homme, une dégénérescence du tissu testiculaire est observée après la deuxième année de vie en raison, notamment, de la température élevée à laquelle est soumise la gonade du fait de sa localisation anormale. Ainsi, une absence de spermatozoïdes est constatée chez 13% et 80% des hommes pubères présentant une cryptorchidie uni- ou bilatérale respectivement (Urry et al., 1994). Dans la majeure partie des cas, ces patients cryptorchides, mêmes traités précocement (intervention chirurgicale pratiquée avant les 2 ans) présentent une oligospermie, et 10% d'entre eux développeront un cancer du testicule à l'âge adulte (Skakkebaek et al., 2001). Ce type de cancer se manifeste majoritairement chez les jeunes adultes (entre 20 et 30 ans) et résulterait d'anomalies de la différenciation des gonocytes (Jørgensen et al., 1995). Une des hypothèses actuelles est que l'hyperthermie causée par la position du testicule cryptorchide induit une apoptose anormale

permettant à certains gonocytes de persister. Ces gonocytes anormaux sont ainsi maintenus dans la lignée germinale jusqu'à l'âge adulte et, en raison de l'accumulation de mutations, peuvent être à l'origine du cancer testiculaire (Hutson et al., 2013, 2010).

L'incidence croissante de ces anomalies et la détérioration de la santé reproductive chez l'homme ont été associées à l'essor de l'industrialisation que le monde a connu ces dernières décennies et qui a massivement contribué à la contamination de l'environnement par des polluants synthétiques (Rim, 2017; Skakkebaek et al., 2016). Dès les années 1990, l'hypothèse a été émise que l'ensemble de ces altérations pourrait être dû à l'exposition aux PE, et plus particulièrement aux xénoœstrogènes (Sharpe & Skakkebaek, 1993).

## 5. Les xénoœstrogènes

Les xénoœstrogènes sont des PE capables d'interférer avec la signalisation œstrogénique, notamment grâce à leur structure proche de celle de l'E2 qui permet leur interaction avec les ERs. Comme les autres PE, ils peuvent être d'origine naturelle ou artificielle (Wang et al., 2021).

Parmi les xénoœstrogènes naturels, on compte les hormones stéroïdes produites par les mammifères telles que l'œstrone, l'œstriol, ou le  $17\beta$ -œstradiol. De plus, certaines hormones non stéroïdiennes d'origine végétale, les phyto-œstrogènes, possèdent une activité œstrogénique. Parmi les phyto-œstrogènes les plus répandus, on peut citer la génistéine ou le coumestrol. Enfin, certaines toxines produites par des champignons filamenteux (mycotoxines) possèdent également une activité œstrogénique, c'est notamment le cas de la zéaralénone.

Par ailleurs, un grand nombre de xénoœstrogènes sont d'origine artificielle. Il peut s'agir d'hormones de synthèse développées spécifiquement pour leurs propriétés œstrogéniques, telles que le  $17\alpha$ -éthynilestradiol et le DES. D'autres produits chimiques massivement utilisés dans les secteurs agricole et industriel en raison de leurs propriétés physico-chimiques ont par ailleurs été identifiés comme xénoœstrogènes, c'est le cas, entre autres, des pesticides organochlorés, des alkylphénols, des phtalates et des bisphénols.

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse se sont plus particulièrement intéressés à deux types de molécules exogènes à caractère xénoœstrogénique, avéré ou potentiel : le bisphénol A (composé synthétique) et les mycotoxines produites par les champignons appartenant au genre *Fusarium* (composés naturels). Ainsi, les prochaines parties de ce chapitre se focalisent sur chacune de ces molécules, avec un accent particulier mis sur les effets qu'elles engendrent sur le testicule.

## II. Le bisphénol A

### 1. Généralités

Le bisphénol A (BPA ; 4,4'-(propane-2,2-diyl) diphénol) a été synthétisé pour la première fois à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par le chimiste russe Alexandre Dianine. Son activité œstrogénique a conduit à envisager son utilisation en tant qu'œstrogène de synthèse dans les années 1930 (Dodds & Lawson, 1936). Le BPA ne sera cependant jamais utilisé comme tel, le DES lui ayant été préféré en raison de ses propriétés physico-chimiques jugées plus intéressantes (Dodds et al., 1938). A partir du début des années 1960, le BPA est massivement utilisé dans l'industrie du plastique. Ces dernières années, la production mondiale de BPA s'élève à près de 4 millions de tonnes par an.

Le BPA fait aujourd'hui l'objet de nombreux débats politiques et scientifiques au sujet de ses effets délétères sur l'organisme. En ce qui concerne les altérations de la fonction de reproduction masculine, l'histoire débute en 1997 lorsque que vom Saal et collaborateurs mettent en évidence les effets à faible dose du BPA sur les organes reproducteurs mâles (vom Saal et al., 1997).

### 2. Exposition de la population au bisphénol A

Le BPA est utilisé dans la fabrication de polycarbonate de plastique, de résines époxy ou encore de PVC. Il est ainsi retrouvé dans de très nombreux objets de notre quotidien tels que les contenants alimentaires (Peng et al., 2019), le revêtement des tuyaux acheminant l'eau de consommation (Rajasärkkä et al., 2016), les papiers thermiques, notamment utilisés pour les ticket de caisse (Bernier & Vandenberg, 2017), l'air et les poussière domestiques (Graziani et al., 2019), les jouets pour enfant (Andaluri et al., 2018), mais également dans l'équipement médical (Bacle et al., 2019) ou les composites dentaires (Löfroth et al., 2019). La voie d'exposition majeure au BPA est l'ingestion, suivie de la voie transdermique, et dans une moindre mesure l'inhalation.

L'existence de cette grande variété de sources d'exposition explique la présence de quantités mesurables de BPA dans les échantillons de cheveux de plus de 90% de la population en Belgique (Claessens et al., 2022). Si la plupart des études mettent en évidence la présence de BPA dans les urines (Matsumoto et al., 2003), d'autres ont démontré sa présence dans le sang (Vandenberg et al., 2010) ou la salive (Lee et al., 2017). Des niveaux quantifiables de BPA sont également retrouvés dans le liquide amniotique (Engel et al., 2006) ou dans le lait maternel (Dualde et al., 2019). L'ensemble de ces données indique une exposition continue de la population au BPA, de la vie foetale jusqu'à l'âge adulte.



Le niveau d'exposition de la population au BPA a été évalué dans de nombreuses cohortes à travers le monde. Bien que les résultats de ces mesures varient d'une étude à l'autre, il apparaît que l'exposition des enfants est supérieure ou égale à celle des adultes (Tableau IV). Le niveau de BPA mesuré dans les fluides biologiques humains (ici, l'urine) permet de calculer une estimation de l'exposition journalière. Une équipe analysant les résultats d'études de biosurveillance conduites dans une trentaine de pays du monde entier au sein de larges cohortes (impliquant au moins 1000 personnes) sur la période 2000-2017 estime ainsi une exposition journalière au BPA de 30,76 ng/kg de poids corporel/jour pour les adultes et de 60,08 ng/kg de poids corporel/jour pour les enfants (Huang et al., 2017). D'après cette étude, les enfants seraient globalement exposés à des doses de BPA deux fois plus importantes que les adultes.

**Tableau IV : Concentrations urinaires de BPA chez des enfants et des adultes dans différents pays**

Région	Population		Exposition au BPA		Référence
	Âge	Période	ng/mL (µg/g créatinine*)	Echantillons positifs (%)	
Espagne	6-11 ans	2011-2012	- (2,01)	-	(Covaci et al., 2015)
	5-12 ans	2016	0,90 (0,92)	-	(Dualde et al., 2019)
	Adultes	2015	0,90 (0,90)	76%	(Sanchis et al., 2020)
Slovénie	6-11 ans	-	- (1,51)	-	(Sarigiannis et al., 2019)
	Adultes	-	- (0,79)	-	
Italie	4-14 ans	2015-2017	7,06 (6,77)	96%	(Tait et al., 2021)
	Adultes	2014-2018	3,34 (4,18)	-	(Di Napoli et al., 2021)
France	6-10 ans	2014-2016	2,21 (2,87)	100%	(Balicco et al., 2019)
	Adultes		1,99 (2,66)	100%	
Corée du Sud	1-6 ans	2017-2018	0,83 (1,07)	-	(Jo et al., 2020)
	Adultes		0,61 (0,60)	-	
Chine	7 ans	2016-2017	4,66 -	-	(Guo et al., 2020)
	Adulte	2013-2015	1,97 -	100%	(Chen et al., 2021)

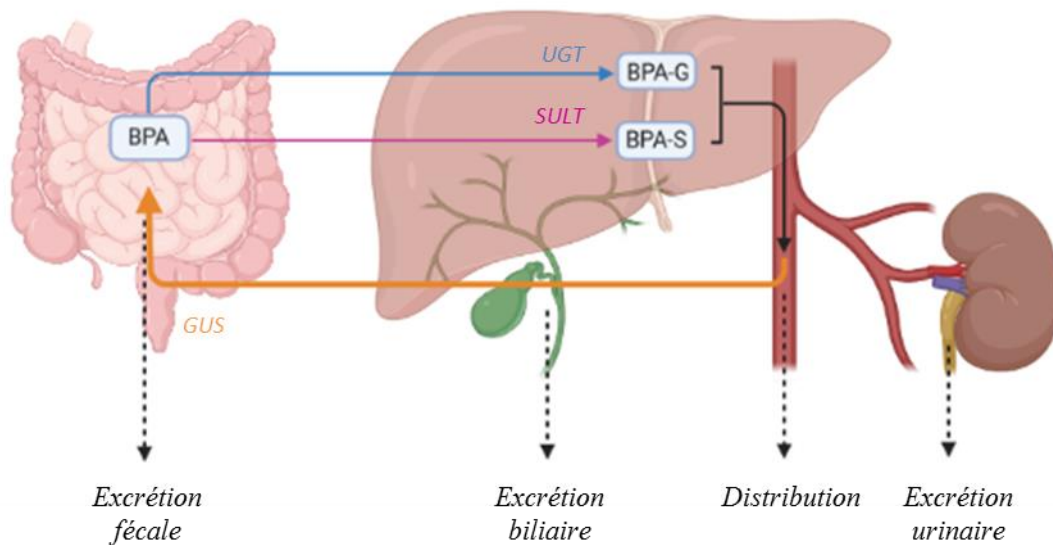
\*L'ajustement de la concentration urinaire à l'excrétion de créatinine permet de tenir compte de la dilution urinaire ; - : non renseigné

### 3. Prise en charge du bisphénol A par l'organisme

L'ingestion constitue la voie d'exposition majeure au BPA. Lorsqu'il est ingéré, le BPA est absorbé par le système digestif et rapidement distribué dans tout l'organisme, avec la même affinité pour l'ensemble des tissus. Il est ensuite pris en charge par les enzymes intestinales et hépatiques responsables de la biotransformation des xénobiotiques : les UDP-glucuronyl-transférase (UGT) et les sulfotransférases (SULT). Ces enzymes métabolisent le BPA en une forme conjuguée inactive, incapable de se lier aux récepteurs des œstrogènes, principalement le BPA-glucuronide (BPA-G), mais

aussi le BPA-sulfate (BPA-S) (Matthews et al., 2001). Cependant, la forme libre (active) du BPA est également retrouvée dans les fluides biologiques humains. Les formes conjuguées sont hydrosolubles et peuvent ainsi être rapidement éliminées dans les urines (Figure 21). En effet, la demi-vie du BPA chez l'Homme est ainsi de 4 à 6 heures (Adamo et al., 2010). Dans les 24h suivant l'administration d'une dose de BPA, environ 93% de celle-ci est retrouvée dans les urines, et seule une fraction mineure du BPA total (inférieure à 1%) est excrétée sous forme libre (Thayer et al., 2015). Dans une moindre mesure, le BPA peut également être excrété dans les fécès.

Chez les rongeurs, la présence d'un cycle entéro-hépatique rend ce processus plus long. En effet, le BPA-G peut être excrété dans la bile puis être retrouvé au niveau des intestins où il est pris en charge par une enzyme de déconjugaison, la  $\beta$ -glucuronidase. Le BPA sous sa forme libre est alors de nouveau absorbé par les intestins et pris en charge par les enzymes de biotransformation avant d'être définitivement éliminé dans les urines (Figure 24). La demi-vie du BPA chez le rat est ainsi estimée à 24 à 48 heures, soit une durée bien plus importante que chez l'Homme (Kurebayashi, 2003; Upmeier et al., 2000).



**Figure 24 : Prise en charge du BPA par l'organisme chez les rongeurs**

Glucuronidation ; Sulfatation ; Cycle entéro-hépatique et déconjugaison

BPA-G : BPA glucuronide ; BPA-S : BPA sulfate ; GUS :  $\beta$ -glucuronidase ;

SULT : sulfotransférases ; UGT : UDP-glucuronyl-transférase

Il est aussi à noter que chez l'Homme, la présence des enzymes de déconjugaison a été observée au niveau du liquide amniotique et du fœtus (Nishikawa et al., 2010). Cela soulève de nombreuses questions quant au niveau d'exposition au cours de la vie fœtale car des études indiquent la capacité du BPA à franchir la barrière placentaire (Vandenberg et al., 2007). D'autre part, les voies de métabolisation des xénobiotiques, notamment la voie de glucuronidation, ne sont pas pleinement fonctionnelles chez le fœtus. Le rapport entre les formes libres et les formes conjuguées de BPA penche alors en faveur de la forme libre (Nishikawa et al., 2010). Le fœtus serait ainsi exposé à une concentration de BPA libre plus importante qu'un organisme adulte.

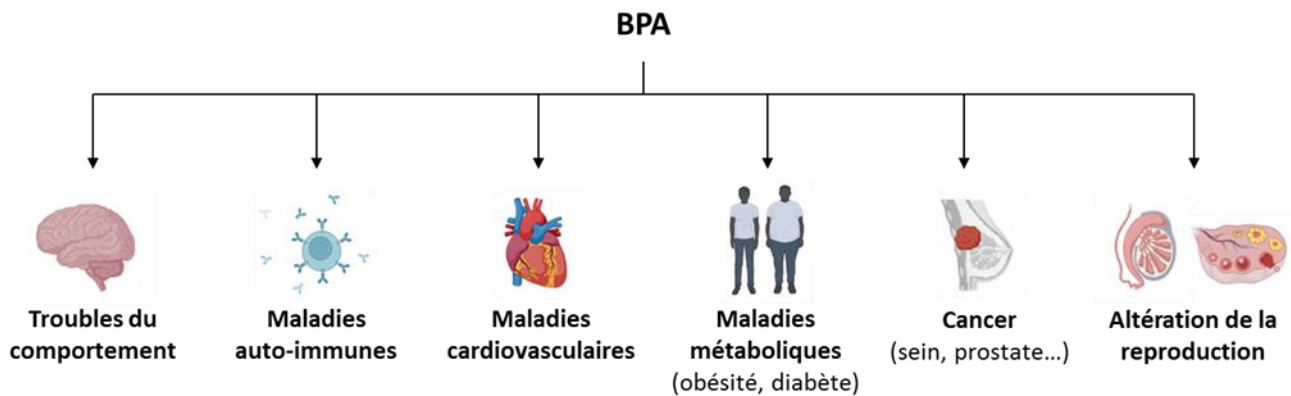
#### **4. Mécanismes d'action du bisphénol A**

Le BPA agit selon de multiples mécanismes d'action qui ne sont pas encore totalement élucidés à l'heure actuelle. Cependant, il apparaît clairement que le BPA est capable de se lier aux différents ERs et ainsi d'activer la signalisation œstrogénique. En effet, le BPA peut se lier aux récepteurs nucléaires ESR1 et ESR2, avec une affinité pour ces récepteurs 10 000 fois inférieure à celle de l'E2, leur ligand endogène (Kuiper et al., 1998). D'autre part, le BPA est capable de se lier au récepteur transmembranaire GPER, avec une affinité pour ce récepteur plus importante que celle pour les récepteurs nucléaires (Thomas and Dong, 2006). Ainsi, le BPA peut activer à la fois les voies génomiques et non-génomiques de la signalisation œstrogénique.

Par ailleurs, le BPA peut interférer avec signalisation œstrogénique en se fixant au récepteur ERR $\gamma$ , un récepteur nucléaire orphelin apparenté aux ERs pour lequel le BPA possède une grande affinité et est capable de préserver l'activité basale constitutive (Liu et al., 2012, 2010, 2007; Matsushima et al., 2007). De même, la liaison du BPA au récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (Riu et al., 2011a, 2011b), dont l'activation induit la dégradation de ESR1 par le protéasome (Qin et al., 2003 ; Suzuki et al., 2006) est susceptible de perturber la signalisation œstrogénique. Enfin, le BPA est capable de se lier au récepteur aux androgènes, pour lequel il possède une activité antagoniste (Molina-Molina et al., 2013; Perera et al., 2017). Ce mécanisme d'action peut expliquer les effets anti-androgéniques du BPA observés dans certaines études (Wang et al., 2017).

#### **5. Effets du bisphénol A sur l'organisme**

L'exposition continue de la population au BPA, de la vie fœtale à l'âge adulte, a soulevé la question de son impact potentiel sur la santé humaine. Depuis plusieurs années, et bien que certains résultats soient encore matière à débat, de nombreuses études ont mis en évidence des effets néfastes du BPA sur l'organisme (Figure 25).



**Figure 25 : Impact du BPA sur la santé humaine**

Des études épidémiologiques impliquent le BPA dans des troubles du comportement (Ejaredar et al., 2017). On constate notamment une augmentation des comportements hyperactifs chez de jeunes enfants exposés *in utero* (Harris et al., 2018; Perez-Lobato et al., 2016). Le BPA exerce également des effets délétères sur le système immunitaire (Koike et al., 2018) et semble être impliqué dans l'augmentation de la survenue des maladies auto-immunes (Kharrazian, 2014; J. Xu et al., 2016). Par ailleurs, certaines études suggèrent une corrélation positive entre le niveau d'exposition au BPA et l'occurrence de maladies cardiovasculaires (Mao et al., 2019). D'autre part, des études récentes décrivent le BPA comme un composé obésogène (Desai et al., 2018; Rubin et al., 2019), et d'autres mettent en évidence son effet sur le développement du diabète (Howard, 2019; Lind & Lind, 2018). Les effets carcinogéniques du BPA ont été largement étudiés (Keri et al., 2007; Seachrist et al., 2016; Shafei et al., 2018), il serait notamment impliqué dans le développement du cancer du sein (Paulose et al., 2015) et du cancer de la prostate (Di Donato et al., 2017).

Les effets du BPA sur la fonction de reproduction ont fait l'objet de nombreuses recherches. Chez la femme, le BPA engendre une puberté précoce et perturbe le cycle menstruel. De plus, le BPA induit des anomalies morphologiques des organes reproducteurs féminins et pourrait donc être associé à des problèmes de fertilité chez la femme. Plus important encore, le BPA est associé à une augmentation des anomalies méiotiques au sein des ovocytes. Cela suggère un lien entre l'exposition au BPA et la survenue de fausses couches, car l'aneuploïdie est considérée comme l'une des causes majeures de fausse couche (Maffini et al., 2006; Peretz et al., 2014; Santoro et al., 2019). Les effets du BPA sur le testicule étant l'objet des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, l'état actuel des connaissances sur le sujet est présenté dans la section suivante.

## 6. Effets du bisphénol A sur les fonctions testiculaires et le spermatozoïde

### i. Études épidémiologiques

Des études épidémiologiques réalisées sur des cohortes d'hommes fertiles ou infertiles suggèrent plusieurs effets du BPA sur la fonction de reproduction chez l'homme. Une étude menée sur des hommes exposés au BPA dans leur environnement professionnel indique une association entre des niveaux élevés de BPA urinaire et une diminution de la concentration spermatique, du nombre total de spermatozoïdes, de leur viabilité et de leur mobilité (Li et al., 2011). Une étude danoise révèle la présence de BPA dans 98% des urines des jeunes hommes testés. Cette étude met par ailleurs en évidence une corrélation entre le taux de BPA et l'augmentation de la concentration sérique en testostérone, LH et œstradiol. De plus, une diminution de la mobilité des spermatozoïdes est observée chez les hommes présentant les taux de BPA les plus élevés (Lassen et al., 2014). Une altération des niveaux circulants d'hormones est retrouvée dans une étude menée sur une cohorte d'hommes infertiles chez laquelle le niveau d'exposition au BPA est positivement corrélé au niveau des hormones produites par les premières étapes de la stéroïdogénèse (prégnénolone, 17 $\alpha$ -prégnénolone et déhydroépiandrostérone) et d'œstradiol (Vitku et al., 2015). Enfin, une étude met en évidence une corrélation entre le taux de BPA urinaire et l'augmentation des dommages à l'ADN dans les spermatozoïdes (Meeker et al., 2010). Ce résultat expliquerait en partie la diminution de la fertilité observée dans les autres études.

En résumé, ces études épidémiologiques soulignent une association entre l'exposition au BPA et l'altération de la fertilité, notamment en raison de la diminution de la quantité et de la qualité spermatique. Néanmoins, ces données sont à interpréter avec précaution, étant donné que l'exposition humaine aux substances reprotoxiques ne se limite pas au BPA, ni même aux perturbateurs endocriniens. Les études expérimentales (*in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*) menées en laboratoire permettent de contrôler les paramètres de l'exposition et de déterminer plus facilement un lien de cause à effet.

### ii. Études expérimentales

#### ❖ Effet du BPA sur la stéroïdogénèse testiculaire.

Dans des testicules fœtaux en culture, le BPA inhibe la sécrétion de testostérone, aussi bien chez l'homme que chez le rat ou la souris (Ben Maamar et al., 2015; N'Tumba-Byn et al., 2012). Cet effet est observé dès la concentration de 10<sup>-8</sup> M dans les testicules fœtaux humain mais seulement à la concentration de 10<sup>-5</sup> M chez le rat et la souris, indiquant des différences de sensibilité au BPA selon l'espèce (N'Tumba-Byn et al., 2012).

Chez le rat prépubère et adulte, plusieurs études *in vivo* rapportent qu'une exposition au BPA induit une diminution des niveaux sériques des hormones gonadotropes (LH et FSH) (Nakamura et al., 2010; Wisniewski et al., 2015). De plus, une étude *in vitro* menée sur des cellules de Sertoli isolées à partir de testicule de rats prépubères indique une augmentation de la production d'inhibine (Monsees et al., 2000). La LH est responsable de l'induction de la stéroïdogénèse testiculaire tandis que l'inhibine exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse antérieure. En modifiant le niveau de ces hormones, le BPA perturbe le fonctionnement de l'axe HPG et altère la stéroïdogénèse testiculaire, induisant une diminution du niveau de testostérone (Winiewski et al., 2015 ; Nakamura et al., 2010 ). Cet effet est également retrouvé dans des cellules de Leydig isolées à partir de testicule de rat (Akingbemi et al., 2004), indiquant l'effet direct du BPA sur la biosynthèse des stéroïdes. En effet, plusieurs études rapportent une inhibition de l'expression génique des enzymes stéroïdogéniques responsables de la biosynthèse de testostérone (Akingbemi et al., 2004; Marghani et al., 2018; Nanjappa et al., 2012).

Par ailleurs, de fortes doses de BPA (supérieures à 1 mg/kg) induisent une diminution du nombre de cellules de Leydig dans le testicule (Lv et al., 2019; Nakamura et al., 2010; Srivastava & Gupta, 2018). Cet effet semble être la conséquence des effets cytotoxiques et pro-apoptotiques de ces fortes doses de BPA. Au contraire, de plus faibles doses de BPA (inférieures à 50 µg/kg) stimulent la différenciation des cellules de Leydig lors du développement testiculaire (Abdel-Maksoud et al., 2019; Chen et al., 2018) ainsi que leur prolifération à l'âge adulte (Nanjappa et al., 2012; Thuillier et al., 2009).

#### ❖ Effet du BPA sur les cellules de Sertoli.

Chez des rats exposés au BPA en période foétale et néonatale, une diminution des niveaux d'AMH est observée (Lv et al., 2019; Nanjappa et al., 2012). Le déficit en AMH indique une inhibition de la différenciation des cellules de Sertoli et peut avoir un impact sur les interactions paracrines entre les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig dans le testicule foetal en développement. La diminution des niveaux d'AMH peut également refléter un effet plus large du BPA sur les cellules de Sertoli. En effet, plusieurs études *in vitro* ont mis en évidence une activité pro-apoptotique du BPA dans les cellules de Sertoli (Iida et al., 2003; Monsees et al., 2000; Qi et al., 2014; Wang et al., 2015).

Par ailleurs, le BPA altère l'intégrité de la BHT. En effet, une étude *in vivo* a montré qu'une exposition néonatale de 5 jours suffisait à modifier l'expression des protéines de jonction sertoliennes chez des rats adultes, en augmentant le niveau de N-cadhérine et en diminuant celui de connexine-43 (Salian et al., 2009). Chez des rats prépubères exposés de 15 à 30 *jpp*, le BPA (50 µg/kg de poids corporel/jour) induit une diminution de l'expression de plusieurs gènes codant pour des

protéines impliquées dans la formation de la BTB (*β-caténine, occludine, caveoline-1*) et du niveau protéique de Caveoline-1 (Brouard et al., 2016).

Ces effets sont également retrouvés dans des études *in vitro* (Fiorini et al., 2004) et *ex vivo* (Goldstein et al., 2016) : le BPA induit une diminution de l'expression protéique de N-cadhérine, d'occludine et de connexine-43, retardant ainsi la (re)formation des jonctions sertoliennes suite à la digestion à la collagénase effectuée lors de la mise en culture (Goldstein et al., 2016).

Enfin, le BPA induit des altérations morphologiques dans les cellules de Sertoli. Une étude *in vitro* rapporte une désorganisation du cytosquelette d'actine suite à une exposition à une forte dose de BPA (Iida et al., 2003). Chez des rats et des souris exposés en période néonatale, le BPA induit la suppression de certaines spécialisations ectoplasmiques des cellules de Sertoli, notamment au niveau des spermatides (Toyama & Yuasa, 2004). Ces effets observés à la puberté ne sont cependant pas retrouvés à l'âge adulte et les animaux sont fertiles.

Les cellules de Sertoli jouent un rôle important dans la spermatogenèse car elles sont le support physique et nutritif des cellules germinales. Ainsi, les effets délétères du BPA sur ces cellules, ainsi que sur la BHT, peuvent contribuer à l'altération de la spermatogenèse.

#### ❖ Effet du BPA sur la spermatogenèse.

Une étude *in vivo* conduite par notre équipe indique que l'exposition au BPA (50 µg/kg de poids corporel/jour) en période prépubère (15 à 30 *jpp*) promeut la progression de la spermatogenèse chez le rat immature (Brouard et al., 2016). Cependant, chez des souris mâles exposées à de plus fortes doses de BPA dès la période néonatale (1 à 21 *jpp*), l'analyse de l'épithélium séminifère à 22 *jpp* révèle une diminution marquée du nombre de spermatides rondes. En effet, les testicules des souris traitées contiennent principalement des spermatogonies et des spermatocytes. Ce résultat, associé à une augmentation des niveaux d'apoptose au sein des cellules germinales, indique des signes d'arrêt de la méiose et suggère que le BPA perturbe la progression méiotique pendant la première vague de spermatogenèse (Xie et al., 2016). Ces données sont soutenues par des études *ex vivo* (culture de tubes séminifères de rat prépubère) indiquant que le BPA altère l'expression de gènes impliqués dans l'initiation ou la progression de la méiose. La spermatogenèse est ainsi bloquée à la transition méiotique entre spermatocytes précoces et spermatocytes tardifs (Ali et al., 2014 ; Goldstein et al., 2016). De plus, le BPA altère l'appariement et la recombinaison chromosomique qui ont lieu au cours de la méiose (Ali et al., 2014). Chez des rats exposés à l'âge adulte, le BPA retarde l'initiation de la méiose dans les stades méiotiques précoces et induit une

accumulation d'anomalies chromosomiques ainsi que la persistance des cassures double brin de l'ADN dans les stades méiotiques tardifs (C. Liu et al., 2014).

Plusieurs études *in vivo* et *ex vivo* indiquent un effet pro-apoptotique du BPA sur les cellules germinales, aussi bien en période fœtale qu'en période prépubère ou à l'âge adulte (Abdel-Maksoud et al., 2019; Kamińska et al., 2018; Karnam et al., 2015; Urriola-Muñoz et al., 2014). Dans le testicule fœtal, le BPA ( $10^{-5}$  M) induit l'apoptose des gonocytes, chez l'homme et chez le rat (Ben Maamar et al., 2015; Eladak et al., 2018). Une étude menée sur des rats adultes exposés à de fortes doses de BPA suggère que les spermatocytes et les spermatides sont les cellules les plus sensibles au BPA (Tiwari & Vanage, 2013).

#### ❖ Effet du BPA sur le spermatozoïde.

Des études *in vivo* et *in vitro* démontrent qu'une exposition au BPA altère la production et la qualité spermatique. En particulier, chez les rongeurs, le BPA induit une diminution du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité (associée à une diminution des niveaux d'ATP dans les spermatozoïdes) (Karnam et al., 2015; Srivastava & Gupta, 2018) ainsi qu'une augmentation du nombre de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques (Wisniewski et al., 2015) et des dommages à l'ADN (Tiwari & Vanage, 2013). En outre, le BPA induit une réaction acrosomique précoce alors que cet événement est déterminant dans le succès de la fécondation de l'ovocyte (Rahman et al., 2015).

#### ❖ Bilan des effets du bisphénol A sur les fonctions testiculaires et le spermatozoïde

En perturbant la stéroïdogenèse testiculaire et les fonctions sertoliennes, en désorganisant l'architecture testiculaire ou en altérant la progression de la méiose, le BPA compromet le bon déroulement de la spermatogenèse. L'ensemble de ces éléments ainsi que les effets directs du BPA sur les spermatozoïdes résultent en une diminution de la production et de la qualité spermatique, ce qui affecte le degré de fertilité de l'individu exposé au BPA, mais aussi celle de sa descendance. En effet, des études ont mis en évidence des perturbations trans-générationnelles de la fonction reproductive suite à une exposition au BPA de la génération F0 (Dabeer et al., 2019; Salian et al., 2009). Cela s'explique par la capacité du BPA à augmenter les niveaux globaux de méthylation de l'ADN et ainsi modifier l'épigénome des animaux exposés (Susiarjo et al., 2013).



## 7. Émergence de l'utilisation d'analogues au bisphénol A

Le nombre croissant de travaux étudiant les effets du BPA sur divers paramètres biologiques ainsi que l'accumulation de preuves de ses effets néfastes pour l'organisme ont conduit les agences sanitaires à réglementer son utilisation (Figure 26). Le BPA a été classé au rang de substance toxique pour la première fois en 2008 par le Canada, qui interdit son utilisation dans les biberons et devient ainsi le premier pays à légiférer sur le sujet. L'interdiction du BPA dans les biberons sera ensuite adoptée par la France (2010) et l'Union Européenne (2011) avant d'être étendue à l'ensemble des contenants alimentaires en France (2015). Dans le même temps, en 2015, la dose journalière admissible est abaissée de 50 à 4 µg/kg de poids corporel par jour par l'Union Européenne. En 2018, la limite de migration spécifique, c'est-à-dire la quantité maximale de BPA autorisée à être transférée d'un matériau (par exemple un contenant alimentaire) aux denrées alimentaires, est abaissée à 0,05 mg/kg d'aliment. Enfin, le BPA a été banni des papiers thermiques par l'Union Européenne en 2020.

L'ensemble de ces mesures a été pris en conséquence de l'évolution du statut sanitaire du BPA au sein de l'Union Européenne ces dernières années. Si le principe de précaution a d'abord prévalu, le BPA a ensuite été officiellement reconnu comme substance reprotoxique en 2016 puis comme perturbateur endocrinien en 2017.

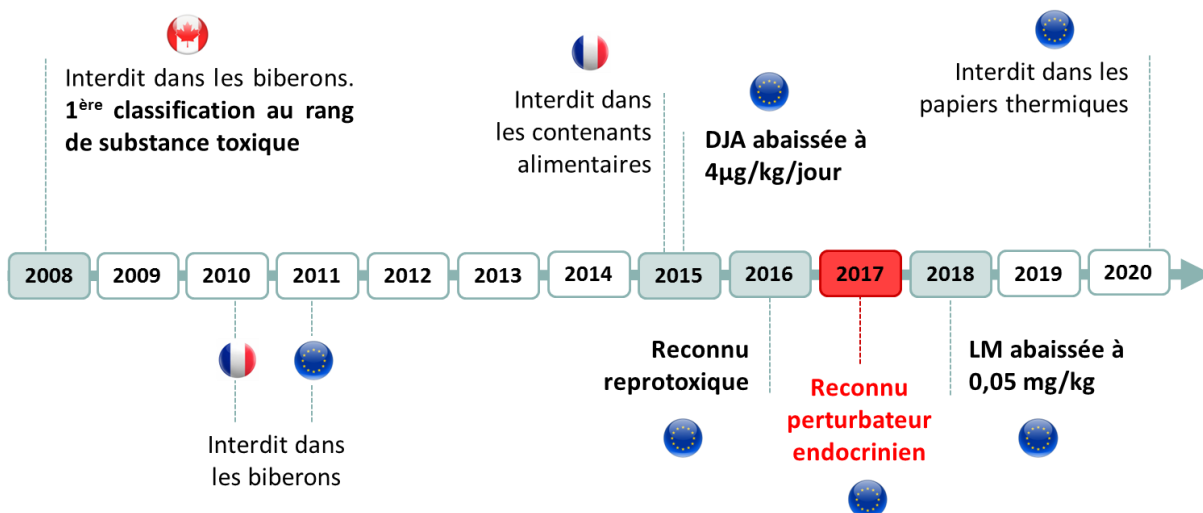


Figure 26 : Évolution de la législation relative à l'utilisation du BPA, quelques dates clé

DJA : dose journalière admissible ; LM : limite de migration

Ces récentes évolutions de la législation relative à l'utilisation du BPA en Europe ont conduit les grands groupes industriels à remplacer le BPA par ses analogues (Russo et al., 2019), dont il existe un grand nombre. Parmi les plus utilisés, on retrouve le bisphénol B (BPB), le bisphénol C (BPC), le bisphénol E (BPE), et à plus grande échelle le bisphénol F (BPF) et le bisphénol S (BPS). Ces molécules sont des analogues structuraux du BPA, c'est-à-dire qu'ils ne diffèrent du BPA que par un atome ou groupe d'atomes et possèdent ainsi des propriétés physico-chimiques proches (Figure 27).

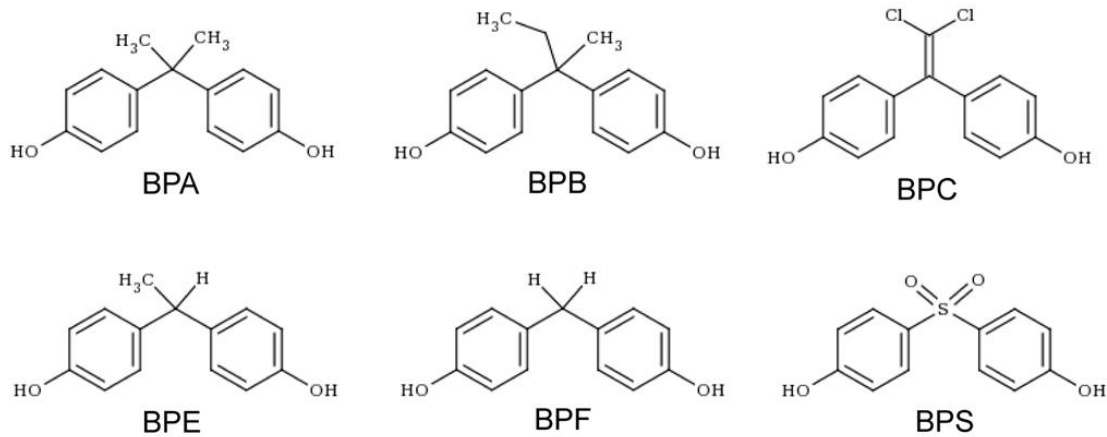


Figure 27 : Structures du BPA et de ses principaux analogues

La plupart des études démontre des effets des analogues similaires à ceux du BPA. L'activité anti-androgénique du BPC a été démontrée *in vitro* (Gray et al., 2019) ainsi que celle du BPF et du BPS (Roelofs et al., 2015). Le BPF et le BPS perturbent également la stéroïdogénèse *in vitro* (Feng et al., 2016; Sidorkiewicz et al., 2018) et altèrent la spermatogénèse du fait de leurs effets délétères sur les spermatogonies (Liang et al., 2017) et les spermatoocytes (Sidorkiewicz et al., 2018). Le BPF et le BPS induisent en outre une augmentation des niveaux de méthylation de l'ADN (Sidorkiewicz et al., 2018), laissant penser que des effets trans-générationnels de ces molécules peuvent être retrouvés. De plus, les études *in vivo* chez les rongeurs démontrent qu'une exposition au BPB, au BPF ou au BPS induit une altération de la morphologie testiculaire associée à une diminution du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité à l'âge adulte (John et al., 2019; Ullah et al., 2018b). Chez le rat, une exposition fœtale ou en période prépubère à ces molécules perturbe la régulation de l'axe HPG et engendre une diminution des niveaux de LH, FSH et testostérone ainsi qu'une augmentation des niveaux d'œstradiol (Ullah et al., 2019, 2018a). Chez la souris, une exposition fœtale au BPE induit une perturbation du développement des cellules germinales et une diminution du nombre de spermatozoïdes chez l'adulte identiques au BPA (Shi et al., 2018).

Par ailleurs, des études rapportent que certains analogues ont des effets plus importants que le BPA vis-à-vis de certains paramètres biologiques. En particulier, le BPB induit une diminution des niveaux de testostérone et une augmentation des niveaux d'œstradiol. Si l'activité anti-androgénique du BPB est du même ordre que celle du BPA, son activité œstrogénique est quant à elle plus élevée (Serra et al., 2019). De même, une étude *ex vivo* sur le testicule fœtal (humain et rongeur) met en évidence l'activité anti-androgénique accrue du BPS par rapport au BPA (Eladak et al., 2015). L'ensemble de ces résultats met en évidence que les analogues au BPA ne sont pas des alternatives sûres, d'autant plus que certaines études démontrent un effet accru de certains analogues par rapport au BPA, laissant supposer que les analogues pourraient exercer des effets délétères à plus faible dose que le BPA.

Le taux d'exposition aux analogues du BPA est pour le moment plus faible qu'au BPA lui-même. En Espagne, le biomonitoring au sein d'une cohorte de 120 mères rapporte par exemple la présence de BPA dans 83% des échantillons de lait maternel, contre 22% des cas pour le BPF et seulement 1,1% des cas pour le BPS (Dualde et al., 2019). Cependant, le recrutement de cette cohorte et le prélèvement des échantillons ont été effectués en 2015, tandis que des données actuelles indiquent que le taux d'exposition de la population aux analogues du BPA est en hausse constante ces dernières années (Russo et al., 2019). Néanmoins, certains pays n'appliquent pas de réglementation relative à l'utilisation du BPA (Rotimi et al., 2021). De plus, bien que son usage soit limité en Europe, le BPA continue d'être utilisé dans certains produits, justifiant la poursuite des recherches sur les effets de cette molécule.

### III. Les mycotoxines

#### 1. Généralités

Les mycotoxines (du grec « *Mycos* », champignon, et du latin « *Toxicum* », poison) sont des substances toxiques naturelles produites par certains champignons dits toxigènes. Plus précisément, les mycotoxines sont des métabolites secondaires issus de la dégradation de métabolites primaires tels que les sucres, les lipides ou les acides aminés par le champignon. Contrairement aux métabolites primaires qui participent à la nutrition et à la croissance de l'organisme, les mycotoxines ne sont pas nécessaires à la survie du champignon.

Les mycotoxines sont produites par une large gamme de champignons, appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. A ce jour, plus de 300 mycotoxines ont été

identifiées, mais seules une trentaine d'entre elles présentent un profil toxicologique réellement préoccupant. Les mycotoxines représentent un enjeu sanitaire à l'échelle mondiale car elles sont à l'origine d'intoxications connues sous le nom de mycotoxicoses qui peuvent affecter gravement la santé animale et humaine. Ainsi, les mycotoxines ont été décrites comme « *des métabolites fongiques qui, lorsqu'elles sont ingérées, inhalées, ou absorbées par la peau, causent des maladies ou la mort chez l'Homme ou chez les animaux* » (Pitt, 1996).

La zéaralénone (ZEA) et le déoxynivaléol (DON), deux mycotoxines produites par les champignons appartenant au genre *Fusarium* comptent à la fois parmi les mycotoxines les plus abondantes et celles possédant les profils toxicologiques les plus préoccupants (Garon et al., 2006; Ma et al., 2018).

## 2. Exposition de la population à la zéaralénone et au déoxynivaléol

Les champignons toxigènes se développent sur les plantes en culture ou après la récolte, au cours de leur stockage. Ainsi, les mycotoxines contaminent la chaîne alimentaire. L'Homme peut être contaminé par l'ingestion directe de céréales ou de produits transformés à base de céréales (pain, pâtes, bière), mais aussi de manière indirecte par la consommation de produits d'origine animale (lait, œufs, viande) issus d'animaux eux-mêmes contaminés par les céréales ou le fourrage composant leur alimentation (Figure 28) (Knutsen et al., 2017).

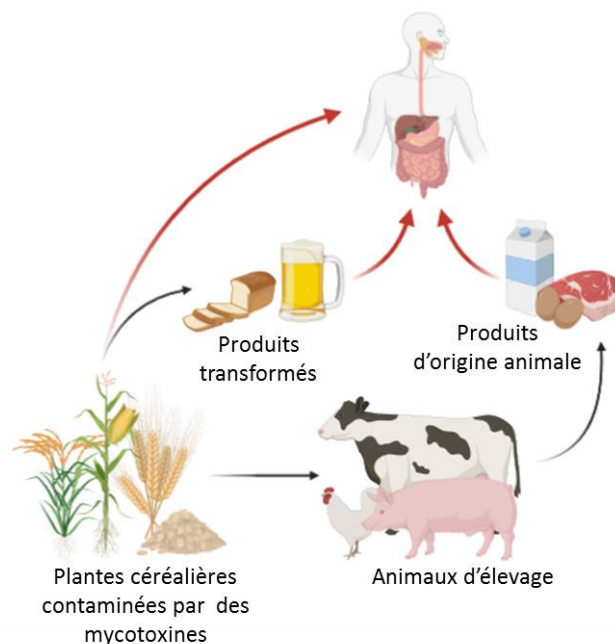


Figure 28 : Contamination de la chaîne alimentaire par la ZEA et le DON

Le développement des champignons toxigènes étant en partie lié aux conditions climatiques, la prévalence des mycotoxines diffère selon la région du globe considérée. D'après des données recueillies entre 2005 et 2012, la ZEA contamine 13 à 56% des céréales, le DON 16 à 78% (Tableau V) (Schatzmayr & Streit, 2013).

**Tableau V: Prévalence de la ZEA et du DON dans les céréales**  
(d'après les données de Schatzmayr & Streit, 2013)

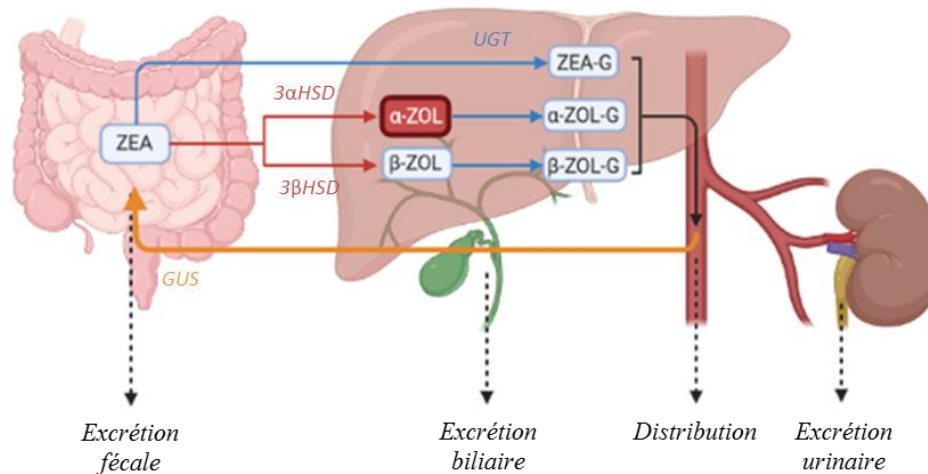
Région du globe	Céréales contaminées (%)	
	ZEA	DON
Afrique	28%	66%
Amérique du Nord	37%	68%
Amérique du Sud	38%	16%
Asie de l'Est	56%	78%
Asie du Sud	25%	21%
Asie du Sud-Est	37%	29%
Europe centrale	26%	59%
Europe de l'Est	13%	33%
Europe méridionale	21%	51%
Europe septentrionale	22%	64%
Moyen-Orient	15%	34%
Océanie	20%	34%

L'exposition journalière à la ZEA varie de 0,8 à 29 ng/kg de poids corporel pour les adultes et de 6 à 55 ng/kg de poids corporel chez les enfants. En ce qui concerne le DON, le niveau d'exposition des adultes est compris entre 0,28 et 0,57 µg/kg de poids corporel et celui des enfants entre 0,45 et 0,93 µg/kg de poids corporel (Leblanc et al., 2005). Ces données mettent en évidence une exposition plus importante des enfants par rapport à celle des adultes.

### 3. Prise en charge de la zéaralénone et du déoxynivalénol par l'organisme

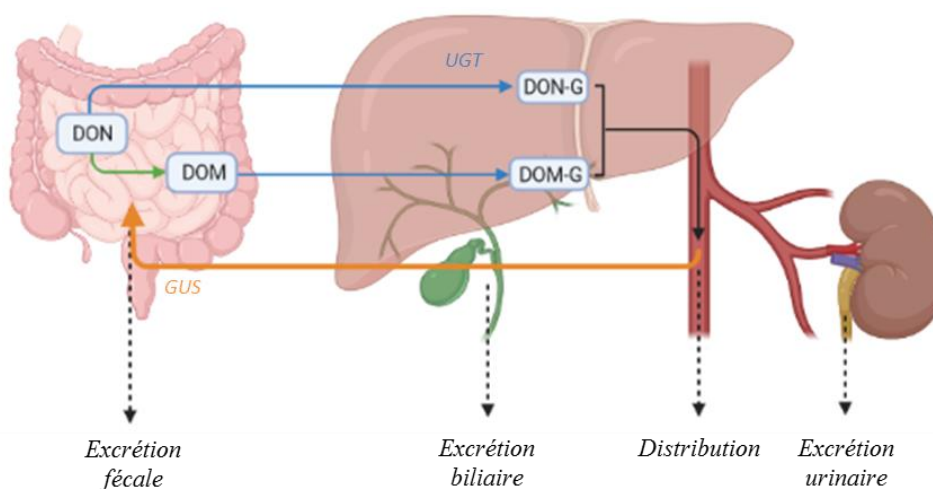
Comme évoqué précédemment, l'ingestion constitue la voie d'exposition principale aux mycotoxines. Une fois absorbée au niveau de l'intestin, la ZEA subit une première transformation dans le foie. Celle-ci consiste en une hydroxylation catalysée par la 3αHSD ou la 3βHSD, résultant respectivement en la formation de α- ou β-zéaralenol (α- et β-ZOL). L'α-ZOL est le métabolite majeur produit *in vitro* par des cultures d'hépatocytes de rongeurs (Ueno et al., 1983). Ces deux métabolites, l'α- et le β-ZOL, présentent un profil toxicologique différent de celui de la ZEA car ils possèdent respectivement une plus grande et une plus faible affinité pour les ER (Król et al., 2018).

La seconde voie métabolique impliquée dans la biotransformation de la ZEA est la voie de prise en charge classique des xénobiotiques. La ZEA et ses métabolites précédemment formés sont conjugués à l'acide glucuronique sous l'action de l'UGT. Cette conjugaison a également lieu dans le foie et résulte en la formation de ZEA-glucuronide (ZEA-G),  $\alpha$ -ZOL-G et  $\beta$ -ZOL-G. Ces métabolites conjugués sont hydrosolubles et peuvent être éliminés dans les urines (Figure 28) (Zinedine et al., 2007).



**Figure 29 : Prise en charge de la ZEA par l'organisme chez les rongeurs**  
 Glucuronidation ; Hydroxylation ; Cycle entéro-hépatique et déconjugaison

De même, la métabolisation du DON s'effectue en 2 étapes. Le DON est tout d'abord métabolisé en dé-époxy DON (DOM) par les micro-organismes intestinaux ou conjugué à l'acide glucuronique dans le foie sous l'action de l'UGT pour former le DON-G. Ces deux métabolites sont moins toxiques que le DON et leurs propriétés hydrosolubles permettent leur élimination rapide dans les urines (Figure 30) (Warth et al., 2013).



**Figure 30 : Prise en charge du DON par l'organisme chez les rongeurs**  
 Glucurination ; Déépoxydation ; Cycle entéro-hépatique et déconjugaison

Cependant, comme pour le BPA (voir chapitre 3, II. 3.), la demi-vie plasmatique de la ZEA et du DON varie selon l'espèce considérée en raison de l'existence d'un cycle entéro-hépatique, notamment chez les rongeurs, permettant la déconjugaison des métabolites glucuronidés par la  $\beta$ -glucuronidase.

#### 4. Mécanismes d'action de la zéaralénone et du déoxynivalénol

La ZEA est un xénoœstrogène, capable de se lier aux récepteurs aux œstrogènes. En effet, la ZEA peut se lier au récepteurs nucléaires ESR1 et ESR2, activant ainsi la voie génomique de la signalisation œstrogénique (Kuiper et al., 1998). De plus, la ZEA est capable de se lier au récepteur transmembranaire GPER et d'activer les cascades de signalisation intracellulaire (Thomas and Dong, 2006). Ainsi, la ZEA perturbe la signalisation œstrogénique en se liant directement aux récepteurs aux œstrogènes, bien que son affinité pour ces derniers soit nettement inférieure à celle du ligand endogène, l'œstradiol.

Par ailleurs, comme nous l'avons évoqué dans la section précédente, la ZEA est un substrat de la  $3\beta$ HSD. Or, cette enzyme joue un rôle clé dans la stéroïdogénèse. En entrant en compétition avec les hormones stéroïdes pour leur site de fixation, la ZEA peut perturber le fonctionnement de la stéroïdogénèse et altérer le niveau d'hormones produit (Benzoni et al., 2008; Zinedine et al., 2007).

Le DON agit principalement par son mécanisme d'action ribotoxique. En effet, le DON est capable de se fixer à la sous-unité ribosomale 60S et d'interférer avec sa fonction peptidyl transférase. Ainsi, le DON est un puissant inhibiteur de la synthèse protéique (Cundliffe & Davies, 1977; Ueno, 1978). Par ailleurs, le DON promeut la dégradation de l'ARN ribosomal 28S, induisant ainsi la réponse au stress ribotoxique en activant la voie MAPK (Iordanov et al., 1997; Moon & Pestka, 2002; Pan et al., 2013; Shifrin & Anderson, 1999).

Cependant, un petit nombre d'études *in vitro* suggère l'existence d'autres mécanismes d'action du DON. Notamment, une étude menée dans la lignée cellulaire H295R (couramment utilisée pour étudier les effets de substances sur la stéroïdogénèse) démontre que le DON est capable de moduler l'expression de la plupart des gènes codant pour les enzymes stéroïdogéniques, et ainsi d'altérer le niveau de production des hormones stéroïdes (Ndossi et al., 2012). Il est intéressant de noter que ce dernier point constitue précisément l'une des caractéristiques majeures des perturbateurs endocriniens (voir Chapitre 3 I.3.i.). La capacité du DON à agir comme un agoniste des ER nucléaires a aussi été étudiée, mais aucune activité œstrogénique de cette mycotoxine n'a été rapportée (Demaegdt et al., 2016). En revanche, une faible activité œstrogénique du 3-acétyl-déoxynivalénol (3-acétylDON) et du 15-acétyl-déoxynivalénol (15-acétylDON), deux métabolites du DON formés par

les plantes, a été mise en évidence. Par ailleurs, cette étude démontre la capacité du DON à agir comme un antagoniste de PPAR $\gamma$ 2 (Demaegdt et al., 2016). Or, l'activation de PPAR $\gamma$ 2 est connue pour inhiber la signalisation œstrogénique en induisant la dégradation d'ESR1 par le protéasome (Qin et al., 2003 ; Suzuki et al., 2006). Ces travaux nous ont ainsi conduits à émettre l'hypothèse que le DON pourrait indirectement moduler la signalisation œstrogénique au travers de son effet inhibiteur de l'activité de PPAR $\gamma$ 2.

## **5. Effets de la zéaralénone et du déoxynivalénol sur l'organisme**

La ZEA est un xœstrogène. De ce fait, une exposition à la ZEA a pour principale conséquence des altérations du système reproducteur, notamment chez la femme. En effet, une exposition accrue à la ZEA est suspectée d'être à l'origine de la survenue précoce de la puberté chez des jeunes filles à Porto-Rico dans les années 80 (Sáenz de Rodríguez, 1984; Sáenz de Rodríguez et al., 1985). La ZEA est également suspectée d'être impliquée dans le développement de cancers, notamment le cancer du sein (Kuciel-Lisieska et al., 2008), mais cet effet carcinogène est sujet à controverse (Belhassen et al., 2015; Pillay et al., 2002).

L'exposition aiguë (forte dose, court terme) au DON est principalement associée à des signes de détresse abdominale (inflammation intestinale, hémorragie gastro-intestinale), de la diarrhée, des vomissements, mais aussi des malaises (Forsyth et al., 1977; Pestka, 2010; Young et al., 1983). En particulier, le DON possède une puissante capacité émétique, et est pour cette raison également connu sous le nom de « vomitoxine ». Ainsi, le tractus gastro intestinal constitue la principale cible du DON, bien que d'autres effets soient également rapportés lors d'exposition chronique (faible dose, long terme). En particulier, certaines études suggèrent l'existence d'effets délétères du DON sur le système immunitaire (Liao et al., 2018).

## **6. Effets de la zéaralénone et du déoxynivalénol sur les fonctions testiculaires et le spermatozoïde**

### **i. Études épidémiologiques**

Les effets de la ZEA sur la fonction de reproduction chez le mâle sont peu documentés, et cela est d'autant plus vrai pour le DON. En effet, la plupart des travaux étudiant les effets de la ZEA concernent la fonction de reproduction chez la femelle tandis que ceux portant sur les effets du DON se concentrent sur son impact au niveau du tractus gastro-intestinal. Ainsi, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude épidémiologique s'intéressant aux effets de ces mycotoxines sur la santé reproductive chez l'homme. Récemment, des études expérimentales ont toutefois permis d'évaluer leurs effets sur la fonction de reproduction chez le mâle.



## ii. Études expérimentales

### ❖ Effets de la ZEA et du DON sur la stéroïdogénèse testiculaire.

Des études *in vivo* ou *in vitro* menées sur des lignées cellulaires ou des cellules de Leydig isolées à partir de testicule de rongeurs rapportent des effets de la ZEA sur la stéroïdogénèse. Cela se traduit tout d'abord par un effet direct sur les cellules de Leydig. En effet, des études *in vitro* démontrent que la ZEA diminue la viabilité de la lignée cellulaire leydigienne MA-10 (Savard et al., 2016). De même, la ZEA inhibe la prolifération de cellules de Leydig isolées à partir de testicules de rats en induisant leur apoptose (Wang et al., 2014). *In vivo*, une exposition à la ZEA en période gestationnelle bloque la différenciation des cellules de Leydig fœtales chez le rat (Pan et al., 2020).

Par ailleurs, la ZEA est capable de modifier l'expression des gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse. La plupart des études rapportent une diminution de l'expression de ces gènes, aussi bien après une exposition fœtale qu'en période prépubère ou à l'âge adulte (Eze et al., 2019; Pan et al., 2020; Savard et al., 2016; Zhou et al., 2018). Cela résulte en une altération des niveaux circulants d'hormones stéroïdes, notamment une diminution de la concentration sérique de progestérone, de testostérone et d'E2 (Long et al., 2017; Yang et al., 2007). Il faut toutefois noter que ces études impliquent de fortes doses de ZEA et qu'une étude *in vitro* menée sur des cellules de Leydig isolées à partir de testicule de souris adultes démontre un effet stimulateur de faibles doses de ZEA sur l'expression génique de *Star* et de *3βhsd* (Q. Liu et al., 2014).

Peu d'études se sont intéressées aux effets du DON sur la stéroïdogénèse testiculaire. Néanmoins, certaines études indiquent que le DON aurait des effets semblables à ceux de la ZEA. En effet, des études *in vitro* menées sur la lignée cellulaire MA-10 démontrent que le DON diminue la viabilité de ces cellules ainsi que l'expression du gène *Star* et inhibe en conséquence la biosynthèse de testostérone (Eze et al., 2019; Savard et al., 2016). Ces résultats sont également retrouvés *in vivo* dans une étude conduite chez le rat adulte qui indique que le DON diminue le niveau circulant de testostérone (Sprando et al., 2005). De la même façon, chez des souris adultes exposées au DON, une diminution du niveau de testostérone sérique est observée, associée à la diminution de l'expression de plusieurs gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse (Z. Cao et al., 2020).

### ❖ Effets de la ZEA et du DON sur les cellules de Sertoli.

Des études *in vitro* conduites sur des lignées cellulaires sertoliennes ou sur des cellules de Sertoli isolées à partir de testicules de rat rapportent une inhibition de la prolifération et une diminution de la viabilité cellulaire suite à un traitement à la ZEA (Wang et al., 2018; M.-L. Xu et al., 2016; Zheng et al., 2018a, 2018b). Cet effet semble être la conséquence d'une part de l'induction de l'apoptose, liée à la diminution de l'expression de facteurs anti-apoptotiques et à l'augmentation de celle de

facteurs pro-apoptotiques (Cai et al., 2019), et d'autre part de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Wang et al., 2018; Zheng et al., 2018b).

De plus, la ZEA perturbe la structure des cellules de Sertoli en altérant l'organisation du cytosquelette d'actine (Zheng et al., 2018a). Par ailleurs, une étude *in vitro* sur des cellules de Sertoli isolées à partir de testicule de rat prépubère indique qu'une exposition à la ZEA induit une diminution de l'expression de N-cadhérine et de vimentine, démontrant ainsi un effet de cette mycotoxine sur la BHT (Zheng et al., 2016). Les résultats inverses sont observés chez la souris adulte : une exposition à une forte dose de ZEA induit l'augmentation de l'expression de la N-cadherine, la vimentine et la Claudin-11. Cependant, les auteurs suggèrent que cela reflète une réponse compensatoire suite à l'altération de l'intégrité de la BHT par la ZEA (Long et al., 2017).

Peu d'études ont évalué l'effet du DON sur les cellules de Sertoli. A des concentrations de l'ordre du micromolaire, le DON diminue la viabilité des cellules de Sertoli isolées à partir de testicule prépubère d'âne en induisant leur apoptose (Song & Zhang, 2021). Chez la souris adulte, une exposition au DON diminue l'expression de protéines impliquées dans la formation de la BHT (Occludine, Connexine-43 et N-cadhérine), altérant ainsi l'intégrité de celle-ci (Cao et al., 2020).

#### ❖ Effets de la ZEA et du DON sur la spermatogenèse.

Des études *in vivo* décrivent des effets délétères de la ZEA sur la spermatogenèse, se traduisant par l'apoptose des cellules germinales et l'inhibition de la progression méiotique (Jee et al., 2010; K. Kim et al., 2003; Zatecka et al., 2014; Zhou et al., 2020). Chez le rat, une exposition néonatale à la ZEA diminue le diamètre des tubes séminifère et a un impact négatif sur les cellules germinales (Filipiak et al., 2010). De même, des études *in vivo* menées chez le rat adulte démontrent qu'une unique injection d'une forte dose de ZEA suffit à induire l'apoptose des cellules germinales et provoquer la dégénérescence de l'épithélium séminifère. Ces études ont par ailleurs permis d'identifier les spermatogonies et les spermatoctes comme les cibles principales de la ZEA (Jee et al., 2010; I.-H. Kim et al., 2003). De plus, chez la souris adulte, la ZEA diminue l'expression d'un facteur clé de la différenciation des spermatogonies (VEGFA) et altère la progression de la méiose dans les spermatoctes (Zatecka et al., 2014). Ces résultats sont retrouvés dans d'autres études *in vivo* qui indiquent que la ZEA perturbe la progression de la méiose et inhibe la spermatogenèse, aussi bien lors d'une exposition fœtale (Men et al., 2019) qu'en période prépubère (Gao et al., 2019). Cependant, ces effets sont observés pour des doses de ZEA élevées alors que certaines études indiquent que les effets délétères de la ZEA sur les cellules germinales dépendent à la fois de la durée de l'exposition et de la dose utilisée (Filipiak et al., 2010 ; Men et al., 2019 ; Pang et al., 2017).

Ainsi, l'exposition de rat ou de souris à de faibles doses de ZEA (4 à 40 µg/kg bw/j) en période prépubère n'altère pas le nombre de cellules germinales (Filipiak et al., 2010; Pang et al., 2017).

Les données disponibles sur le DON rapportent des effets sur la spermatogenèse similaires à ceux de la ZEA, à savoir une dégénérescence de l'épithélium séminifère liée notamment à l'apoptose des cellules germinales (Yang et al., 2019). Une étude *in vivo* conduite chez le rat ou la souris adulte démontre qu'une exposition à de fortes doses de DON perturbe la progression de la méiose et diminue le nombre de spermatides (Sprando et al., 2005, 1999).

#### ❖ Effets de la ZEA et du DON sur les spermatozoïdes.

La ZEA et le DON à des concentrations de l'ordre du micromolaire diminuent la mobilité de spermatozoïdes de lapin (Tvrdá et al., 2021) et de porc (Tassis et al., 2020) *in vitro*. Cette diminution de la mobilité est associée à une augmentation des dommages à l'ADN dans des spermatozoïdes de souris exposés au DON (Hallaj Salahipour et al., 2019) et des spermatozoïdes de porc exposés à la ZEA (Tsakmakidis et al., 2006, 2008).

Dans des études *in vivo*, ces deux mycotoxines induisent une diminution de la concentration spermatique et de la mobilité des spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation du nombre de gamètes présentant des anomalies chez la souris (Cao et al., 2020 ; Yang et al., 2019 ; Zatecka et al., 2014), et le rat (Sprando et al., 2005).

#### ❖ Bilan des effets de la zéaralénone et du déoxynivalénol sur les fonctions testiculaires et le spermatozoïde

Globalement, la ZEA et le DON perturbent la stéroïdogénèse testiculaire, désorganisent la structure des cellules de Sertoli et de la BHT et altèrent la progression de la méiose, compromettant ainsi le bon déroulement de la spermatogenèse. L'ensemble de ces éléments ainsi que les effets directs de ces mycotoxines sur les spermatozoïdes résultent en une diminution de la production et de la qualité spermatique. Ainsi, il apparaît que le DON affecte la fonction de reproduction chez le mâle de manière similaire à la ZEA, un xénoestrogène naturel.





---

# OBJECTIFS

---



L'objectif de cette thèse est d'explorer le rôle de la signalisation œstrogénique dans le testicule, et la perturbation de la signalisation œstrogénique par des molécules exogènes à caractère xœstrogénique avéré ou potentiel. Ce travail se situe ainsi à l'interface de deux thématiques étroitement liées, car la compréhension des effets physiologiques des œstrogènes et de leurs mécanismes d'action permet de mieux appréhender l'impact des xœstrogènes sur la signalisation œstrogénique.

Dans ce contexte, une précédente thèse effectuée dans notre laboratoire s'est intéressée aux effets du 17 $\beta$ -œstradiol (E2) et d'un xœstrogène synthétique, le bisphénol A (BPA), sur la mise en place de la spermatogenèse chez le rat. Les animaux prépubères ont été exposés pendant 15 jours (exposition de 15 à 30 *jpp*) à de faibles doses d'E2 (20  $\mu$ g/kg de poids corporel/jour), de BPA (50  $\mu$ g/kg de poids corporel/jour) ou à la combinaison de ces deux molécules. A l'issue de l'exposition, l'analyse des testicules des rats de 30 *jpp* indique que l'E2 retarde la mise en place de la spermatogenèse chez les animaux immatures, tandis que le BPA promeut sa progression (Brouard et al., 2016). Cette étude révèle ainsi un effet différentiel de l'E2 et du BPA sur l'établissement de la première vague de spermatogenèse et désigne la période prépubère comme une fenêtre de sensibilité accrue aux œstrogènes et au xœstrogènes. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité de cette étude.

Tout d'abord, l'approche *in vivo* menée chez le rat a été reconduite afin d'évaluer l'impact de l'E2 et du BPA sur le testicule lorsque la spermatogenèse est déjà mise en place ; puis, de déterminer dans quelle mesure l'effet de ces substances sur la mise en place de la spermatogenèse chez les animaux prépubères peut affecter le testicule à l'âge adulte. Ces travaux, initiés précédemment, ont été poursuivis et valorisés dans le cadre de cette thèse.

Par la suite, nous avons cherché à mieux comprendre les effets et les mécanismes d'action de l'E2 et du BPA au cours de la fenêtre de la période prépubère ciblée lors de l'étude *in vivo* (15 à 30 *jpp*). Pour cela, une approche *ex vivo* a été développée grâce à un modèle de culture organotypique de testicule de rat prépubère mis en place dans le cadre de cette thèse.

Par ailleurs, la collaboration initiée entre notre équipe et celle du Pr. David Garon (équipe ToxEMAC, UR 4651 ABTE, Université de Caen Normandie) a récemment introduit un nouvel aspect à notre thématique de recherche portant sur la perturbation de la signalisation œstrogénique. Ainsi, l'étude des effets de la zéaralénone (ZEA) et du déoxynivalénol (DON), sur la signalisation œstrogénique ont été intégrés à ces travaux de thèse. La ZEA et le DON comptent à la fois parmi les mycotoxines les plus abondantes et celles possédant les profils toxicologiques les plus préoccupants (Garon et al., 2006 ; Ma et al., 2018).



La ZEA est un xénoœstrogène naturel reconnu (Kuiper et al., 1998 ; Thomas & Dong, 2006). Cependant, peu d'études documentent les effets de cette mycotoxine sur le testicule. De plus, bien que certaines études révèlent une exposition aux mycotoxines plus importante chez les enfants que chez les adultes (Leblanc et al., 2005), les données expérimentales chez les animaux immatures sont encore plus limitées. Nous avons donc choisi d'étudier l'effet et les mécanismes d'action de la ZEA dans le testicule de rat prépubère grâce à l'approche *ex vivo* développée dans le cadre de cette thèse.

Le DON est décrit comme un puissant inhibiteur de la synthèse protéique (Cundliffe & Davies, 1977 ; Ueno, 1978). Néanmoins, certaines études suggèrent l'existence d'autres mécanismes d'action (Demaegdt et al., 2016 ; Ndossi et al., 2012). Ces données nous ont conduits à émettre l'hypothèse que le DON pourrait moduler la signalisation œstrogénique. Notamment, le DON exerce une activité antagoniste sur le récepteur PPAR $\gamma$  (Demaegdt et al., 2016), dont l'activation induit la dégradation du récepteur ESR1 par le protéasome (Suzuki et al., 2006 ; Qin et al., 2003). Ainsi, la dernière partie de ce travail de thèse consiste à explorer les effets et les mécanismes d'action du DON sur la signalisation œstrogénique grâce à une approche *in vitro* conduite dans les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231, deux lignées cellulaires couramment utilisées dans l'étude de la modulation de la signalisation œstrogénique (Comşa et al., 2015; Hanoux et al., 2018).

Globalement, ce travail de thèse s'articule autour de deux objectifs :

- ❖ **Évaluer l'effet et les mécanismes d'action des œstrogènes (E2) et des xénoœstrogènes (BPA et ZEA) sur le testicule** en poursuivant l'approche *in vivo* initiée précédemment dans notre laboratoire et grâce au développement d'un modèle de culture organotypique de testicule de rat prépubère permettant une approche *ex vivo*.
- ❖ **Déterminer l'effet et les mécanismes d'action du DON sur la signalisation œstrogénique** grâce à une approche *in vitro* conduite dans les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231.

Les résultats de ces travaux sont restitués sous forme d'articles scientifiques, présentés dans la section suivante. Celle-ci est divisée en deux chapitres correspondant aux objectifs définis ci-dessus. Chaque article est précédé d'une brève introduction présentant le contexte et les objectifs spécifiques de l'étude et détaillant l'approche expérimentale employée.





---

# RÉSULTATS

---



# Chapitre 1 | Effets des œstrogènes et des xœstrogènes sur le testicule

## – Avant-propos –

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à l'étude des effets d'un œstrogène ( $17\beta$ -œstradiol) et des xœstrogènes (le bisphénol A, un xœstrogène synthétique, et la zéaralénone, un xœstrogène naturel) dans le testicule. Ces études ont été effectuées sur modèle le rat, préféré au modèle souris en raison de la plus longue durée de la spermatogenèse, qui se rapproche de celle de l'homme (souris : 35 jours, rat : 52 jours, homme : 74 jours) (Clermont, 1972; Clermont & Harvey, 1972). Ce travail est composé de deux approches, *in vivo* et *ex vivo*, dont les résultats sont rapportés dans trois articles qui ont été ou qui seront prochainement soumis à la revue *Reproductive Toxicology* :

- ❖ **Article 1** : Effects of bisphenol A and estradiol in adult rat testis after prepubertal and pubertal exposure (en révision)
- ❖ **Article 2** : Effects of  $17\beta$ -estradiol in prepubertal rat testis
- ❖ **Article 3** : Effects of bisphenol A and zearalenone in prepubertal rat testis

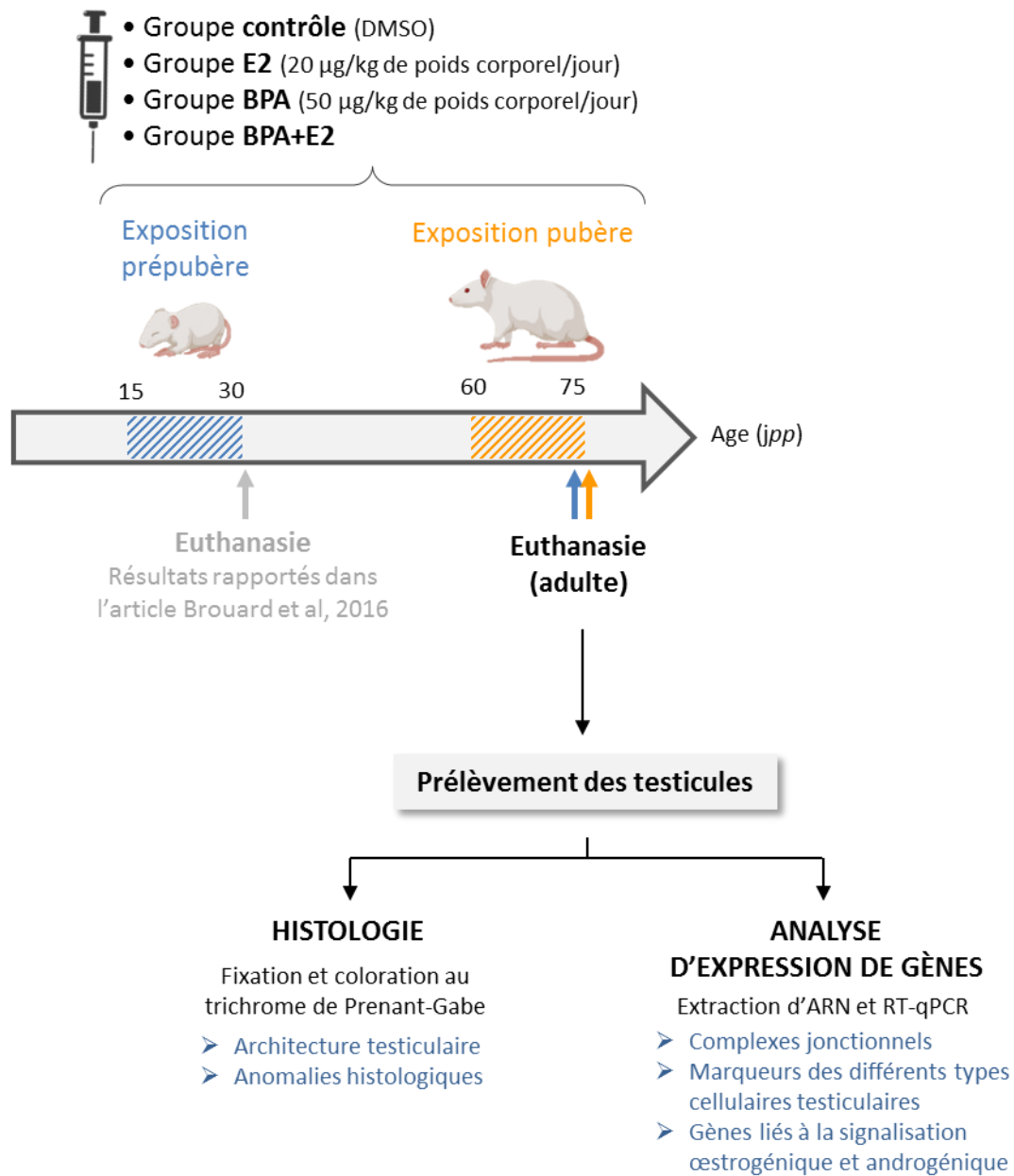


Figure 31 : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude *in vivo* des effets de l'E2 et du BPA sur le testicule chez le rat

## Effects of bisphenol A and estradiol in adult rat testis after prepubertal and pubertal exposure

V. Brouard\*, M. Drouault\*, N. Elie, I. Guénon, V. Hanoux, H. Bouraïma-Lelong, C. Delalande

\* co-premier auteur

Soumis à *Reproductive Toxicology*, en révision

### ❖ Contexte de l'étude

De nombreuses études soulignent les effets délétères des xénoœstrogènes tels que le bisphénol A (BPA) sur les fonctions testiculaires (Adegoke et al., 2020; Cariati et al., 2019; Peretz et al., 2014). Une étude *in vivo* conduite chez le rat a été menée dans le cadre d'une précédente thèse du laboratoire afin d'évaluer les effets de faibles doses de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) (20  $\mu$ g/kg de poids corporel/jour) et de BPA (50  $\mu$ g/kg de poids corporel/jour) sur le testicule. Des rats ont été exposés à l'E2, au BPA, ou à une combinaison de ces deux molécules en période prépubère (15 à 30 *jpp*). Cette fenêtre d'exposition a été ciblée car elle couvre des événements clés pour la fertilité de l'adulte tels que la maturation des cellules somatiques, la mise en place de la barrière hémato-testiculaire (BHT) ainsi que la mise en place de la première vague de spermatogenèse (Malkov et al., 1998 ; Picut et al., 2015). Ces animaux ont été euthanasiés à 30 *jpp* afin d'analyser les effets immédiats d'une exposition prépubère sur le testicule immature. Les résultats de cette étude ont mis en évidence des effets différentiels de l'E2 et du BPA sur les paramètres étudiés. Globalement, alors que l'E2 retarde la mise en place de la spermatogenèse, le BPA promeut sa progression. Par ailleurs, le BPA altère l'intégrité de la BHT (Brouard et al., 2016).

### ❖ Dispositif expérimental

Afin d'évaluer les conséquences d'une exposition prépubère à ces molécules sur le testicule à l'âge adulte, un second groupe a été exposé à l'E2 et/ou au BPA au cours de la même période (15 à 30 *jpp*), mais les effets ont été analysés à 75 *jpp*. Enfin, l'effet de ces molécules sur le testicule a été évalué lorsque la spermatogenèse est déjà mise en place. Des rats ont été exposés en période pubère (60 à 75 *jpp*), et l'analyse a été effectuée immédiatement à la fin de l'exposition dans le but de comparer l'impact de ces traitements sur le testicule en fonction de la i) période d'exposition (période prépubère ou pubère) et ii) du délai entre la période de traitement et l'analyse des effets chez les animaux adultes (immédiat ou après 45 jours). Le dispositif expérimental mis en place pour cette étude est présenté en [figure 31](#).



Après l'euthanasie, les testicules ont été immédiatement prélevés et le niveau d'expression de différents gènes a été évalué par RT-qPCR (gènes codant pour les protéines impliquées dans la formation de la BHT, marqueurs des différents types cellulaires testiculaires, gènes liés à la signalisation œstrogénique et androgénique). Par ailleurs, le travail initié avec le Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie (CMABio3) de l'Université de Caen au cours de ma thèse nous a permis de compléter cette étude par une analyse histologique du testicule (étude de l'architecture testiculaire et des anomalies histologiques).

#### ❖ Résultats majeurs de l'étude

- Le BPA, seul ou combiné à l'E2, diminue l'expression de gènes codant pour les protéines impliquées dans la formation de la BHT dans le testicule adulte après une exposition en période pubère, mais pas après une exposition en période prépubère
- Le BPA et l'E2 n'augmentent pas le nombre de tubes séminifères présentant des anomalies histologiques dans le testicule adulte, quelle que soit la période d'exposition considérée
- Les analyses histologiques et la quantification de l'expression génique de marqueurs des différents types cellulaires testiculaires confirment le bon déroulement de la spermatogenèse dans le testicule adulte, quelle que soit la période d'exposition considérée

#### ❖ Conclusion de l'étude

Cette étude *in vivo* indique que de faibles doses d'E2 et de BPA n'ont qu'un effet limité sur l'architecture testiculaire et ne perturbent pas la spermatogenèse chez le rat adulte, aussi bien après une exposition en période prépubère qu'en période pubère. Cependant, le BPA seul ou combiné à l'E2 semble altérer l'intégrité de la BHT dans le testicule adulte après une exposition en période pubère. Cet effet également observé dans le testicule de rats immatures immédiatement après une exposition en période prépubère (Brouard et al., 2016) n'est pas retrouvé dans le testicule adulte après une exposition en période prépubère. Ainsi, l'effet délétère du BPA sur l'intégrité de la BHT apparaît réversible.





# Effects of bisphenol A and estradiol in adult rat testis after prepubertal and pubertal exposure

Vanessa Brouard<sup>\*,a,1</sup>, Maëva Drouault<sup>\*,a</sup>, Nicolas Elie<sup>b</sup>, Isabelle Guénon<sup>a</sup>, Vincent Hanoux<sup>a</sup>,  
Hélène Bouraima-Lelong<sup>a</sup> and Christelle Delalande<sup>a</sup>

\*co-first author, these authors contributed equally to this work

<sup>a</sup>Normandie Univ, UNICAEN, OeReCa, 14000 Caen, France

<sup>b</sup>Normandie Univ, UNICAEN, SF 4206 ICORE, CMABIO3, 14000 Caen, France

Correspondence should be addressed to C. Delalande, UNICAEN EA2608 OeReCa, Esplanade de la paix, CS 14032, 14032 Caen cedex 5. Email: [Christelle.delalande@unicaen.fr](mailto:Christelle.delalande@unicaen.fr)

<sup>1</sup>Present address: Department of Environmental Toxicology, Evolutionary Biology Centre (EBC), Uppsala University, 752 36 Uppsala, Sweden

## **ABSTRACT**

Over the past few decades, male fertility has been decreasing worldwide. Many studies attribute this outcome to endocrine disruptors exposure such as bisphenol A (BPA), a chemical compound used in plastics synthesis exhibiting estrogenic activity. In order to assess how the window of exposure modulates BPA's effects on the testis, prepubertal (15dpp to 30dpp) and pubertal (60dpp to 75dpp) male Sprague-Dawley rats were exposed to BPA (50 µg/kg bw/day), 17-β-estradiol (E2) (20µg/kg bw/day) as a positive control, or a combination of these compounds. For both periods of exposure, rats were sacrificed and testes were collected at 75dpp. On the one hand, histological analysis and quantification of testis cells markers gene expression by RT-qPCR confirmed the complete spermatogenesis in all groups. On the other hand, pubertal exposure to BPA and BPA+E2 induced a decrease in *caveolin-1* and *connexin-43* gene expression, suggesting a deleterious effect of BPA on the junctional complexes in the blood-testis barrier. As none of these effects were found when the exposure took place at prepubertal age, these results suggested the reversibility of BPA's effects. One should be cautious in transposing this finding to humans and further studies are needed in this regard. However, from a regulatory perspective, this study emphasizes the importance of taking into account different periods of exposure, as they present different sensitivities to BPA exposure.

## **KEYWORDS**

bisphenol A; estradiol; endocrine disruptor; spermatogenesis; seminiferous epithelium; blood testis barrier; *in vivo*.

## 1. Introduction

In regard to human health, endocrine disrupting chemicals are among the most significant toxicants in industrialized countries. The hazardousness of these compounds lies in their ability to interfere with the endocrine system, by mimicking, blocking or altering the action of endogenous hormones. There is a decrease in male fertility worldwide over the past decades (Skakkebaek et al., 2006) and a large body of evidence from epidemiological and animal studies reveals that endocrine disruptors are likely to be involved in this outcome (Sharma et al., 2020). Nowadays, the plastic industry is using a large amount of compounds that are known or suspected to exert an endocrine disrupting activity (WHO, 2012).

Among them, the bisphenol A (BPA) is raising concerns. This synthetic compound used in polycarbonates and epoxy resins is found in a great number of items from our everyday life including food packaging (Peng et al., 2019), kid toys (Andaluri et al., 2018), thermal paper (Bernier and Vandenberg, 2017) or medical equipment (Bacle et al., 2019). These various sources of exposure result in detectable levels of BPA in human biological fluids such as urine (Matsumoto et al., 2003), blood (Vandenberg et al., 2010) and saliva (Lee et al., 2017), as well as amniotic fluid (Engel et al., 2006) and maternal milk (Dualde et al., 2019). This illustrates that humans are continuously exposed to BPA from fetal to adult life. The global estimated BPA daily intake is 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day in adults (Huang et al., 2017). However, considering the people exposed at their workplace, the average occupational exposure is estimated at 5.12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day and could reach 5 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day in the most extreme case (Moreno-Gómez-Toledano et al., 2021; Song et al., 2019; Tian et al., 2018).

BPA's chemical structure allows its binding to nuclear estrogen receptors ESR1 and ESR2, although to a lower extent than 17- $\beta$ -estradiol (E2), the endogenous ligand of these receptors (Kuiper et al., 1998). Moreover, BPA has a similar, if not greater affinity than E2 for the G protein-coupled estrogen receptor (GPER, also known as GPR30), a transmembrane receptor involved in rapid non-genomic events (Thomas and Dong, 2006). Therefore, BPA can disrupt the estrogen signaling pathways leading to deleterious effects on human health. Numerous studies suggest the involvement of BPA in a wide range of pathologies including behavioural disorders, diabetes, obesity, cardiovascular diseases, cancer and reproductive issues (Rochester, 2013). Especially, perinatal exposures to BPA even at low doses (from 0.5 to 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day) have been demonstrated to negatively impact female and male

reproductive physiology (Acaroz et al., 2019; Gámez et al., 2014; Salian et al., 2009; Shi et al., 2018; Toyama and Yuasa, 2004; Ullah et al., 2019, 2018; Xie et al., 2016).

With this knowledge, legislation about BPA's uses has evolved during the past few years. In the European Union (EU), BPA has been officially recognized as an endocrine disruptor and has been banned from plastic baby bottles (Regulation (EU) N°321/2011) and thermal papers (receipt) (Regulation (EU) 2016/2235). However, some countries do not apply similar restrictions (Rotimi et al., 2021) and although its use is limited, BPA is still found in food packaging in the EU. Alongside, the plastic industry is developing alternatives to replace BPA, increasing the production and application of its analogues, such as bisphenol AF, B, E, F and S. However, these alternative compounds share a great structural homology with BPA itself, and were reported to have similar or even more deleterious effects than BPA for male reproductive endpoints (Adegoke et al., 2020).

A previous study conducted by our team aimed to analyze the immediate effects of prepubertal BPA exposure (15 to 30 days *post partum*; *dpp*) on spermatogenesis' establishment in immature rats (Brouard et al., 2016). We clearly demonstrated differential effects of E2 and BPA on spermatogenesis' onset and shown that prepubertal age is a critical window for BPA's effects in rat testis (Brouard et al., 2016). Indeed, key events for adult fertility take place during this period. As these events are finely regulated by the endocrine system, the prepubertal life is a period particularly sensitive to endocrine disruptors' exposure.

In the present study, we followed the same protocol (same doses, same exposure duration) but exposed rats at two different life times, *i.e.* during the prepubertal (15 to 30 *dpp*) and the pubertal (60 to 75 *dpp*) period. After exposure, we investigated the effects of BPA and E2 in the adult (75 *dpp*) testis (Fig. 1). Testicular architecture was assessed by histology and gene expression were quantified by RT-qPCR for the different testicular cell types markers, the blood-testis barrier (BTB) factors, the genes encoding proteins involved in estrogens synthesis and the estrogenic and androgenic signaling pathways. This approach allows the comparison between 1) the direct effect in the adult after a short-term exposure in the pubertal animal (pubertal-exposed group) and 2) the long-term effects in the adult after exposure in the immature animal (prepubertal-exposed group). The data from the adult animals exposed during the prepubertal period expand the scope of our previous work on direct effects after prepubertal exposure and allow us to evaluate a possible reversible effect with time.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Chemicals and reagents**

Bisphenol A, 17 $\beta$ -estradiol, Dimethyl sulfoxide (DMSO), NaCl, TRI Reagent®, reagents and the dyes used for the histological analysis were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Deoxyribose nucleotide triphosphate (dNTP), Random hexamers, Ribonuclease inhibitor (RNasin), Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), GoTaq qPCR Master Mix, DNase I were purchased from Promega (Madison, USA). Primers were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). Roti®Histol was purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Paraffin was purchased from Leica (Wetzlar, Germany). Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) was purchased from Pan Biotech (Aidenbach, Germany).

### **2.2. Animals and study design**

Prepubertal (15 *dpp*) male Sprague-Dawley rats weighting  $29.8 \pm 0.96$  g and pubertal (60 *dpp*) male Sprague-Dawley rats weighting  $401.2 \pm 4.77$  g were obtained from the University Center of Biological Experimental Resources (CURB, Caen, France). Animals were housed at 21°C under a 12 h light/12 h dark cycle in polypropylene cages. The rats were fed *ad libitum* with low phytoestrogen food (SDS-Dietex<sup>®</sup>) from the weaning (21 *dpp*) until the end of the experiment to reduced estrogens intake from the food.

The prepubertal exposure was performed from 15 to 30 *dpp*. This specific window of exposure covers key events for the adult fertility, such as the differentiation of Sertoli cells, the establishment of the blood-testis barrier (BTB), as well as the spermatogenesis' onset (Malkov et al., 1998; Picut et al., 2015). The pubertal exposure was performed from 60 to 75 *dpp* because at 60 *dpp*, rats testis present a complete spermatogenesis (Malkov et al., 1998). Moreover, from 53 *dpp*, testes from Sprague-Dawley rats have no difference with those from older animals, even if Sprague-Dawley rats are sexually mature at 70 *dpp* (Campion et al., 2013). The effects of prepubertal and pubertal exposures were investigated in adult rat testes, at 75 *dpp* (Fig. 1).

### **2.3. Dose selection, preparation and administration**

BPA and E2 were dissolved in DMSO and then diluted in physiologic solution (0.9% NaCl). All animals were exposed to the same level of DMSO (0.7%). For the prepubertal and the pubertal exposure, 8 rats were randomized into 4 groups: control group (DMSO only), BPA



group (50 µg/kg bw/day of BPA), E2 group (20 µg/kg bw/day of E2) and BPA+E2 group (50 µg/kg bw/day of BPA and 20 µg/kg bw/day of E2). For BPA, the dose 50 µg/kg bw/day was used. This dose is respectively 100- and 1000-fold lower than the currently accepted No Observed Adverse Effect Level (NOAEL; 5 mg/kg bw/day), and the Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL; 50 mg/kg bw/day) defined by the US Food and Drug Administration (FDA). Since “low doses” of BPA refer to doses below the LOAEL (Vom Saal and Vandenberg, 2021), the BPA dose used in our study could be considered as a low dose. As in our previous study, E2 was used as an estrogen control at the dose of 20 µg/kg bw/day, which resulted in a delayed spermatogenesis progression in immature rats (Brouard et al., 2016). In addition, a combined exposure to BPA and E2 was performed in order to determine if the effects of these compounds could be additive.

Each day of the exposure (15 days), the animals were weighed and received their treatment by abdominal subcutaneous injections. Equivalent to our previous study, we used the same chemicals concentrations and the treatments were performed at the CURB (Brouard et al., 2016). All experimental procedures were carried out in accordance with the French Ministry of Agriculture regulations and approved by the regional committee of ethics on animal experimentation (CENOMEXA1112-10).

#### **2.4. Tissue collection and organ weights**

After the prepubertal and the pubertal exposures, adult (75 dpp) animals were anesthetized by inhalation of 4% isoflurane in 30% O<sub>2</sub> / 70% N<sub>2</sub>O gas mixture. Testes were immediately removed and weighted. Half of each testis was frozen at -80°C for RNA extraction. The second half of the testis was fixed in 3% paraformaldehyde / PBS (48h), then dehydrated in progressively higher grades of alcohol (70%, 96% and 100% ethanol, 48h each) and in butan-1-ol (1 week), and finally embedded in paraffin.

#### **2.5. Histology and image analysis**

##### **2.5.1 Histology**

Three micrometers testis sections were cut using the Jung RM2035 microtome (Leica). After deparaffinization in Roti®Histol, the samples were rehydrated in low-grade series of ethanol and water, and then stained with Trichrome of Prenant Gabe (1% Hematoxylin solution, 1% eosin Y and 0,2% green light solution).

### 2.5.2 Image acquisition

Whole slide images of the histological sections were digitized at 20X (0.5  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ) using ScanScope®CS slide scanner (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). They were recorded as Tiff tiled image.

### 2.5.3 Image processing

Images processing was conducted with the assistance of CMABio<sup>3</sup> microscopy center (Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, Université de Caen Normandie) using the ilsatik (Berg et al., 2019), QuPath (Bankhead et al., 2017), StarDist (Schmidt et al., 2018) softwares and scikit-image library for python (van der Walt et al., 2014). Precise histological analysis and images processing allow us to:

- determine the percentage of seminiferous tubules presenting structural abnormalities (cell clusters in the lumen) using ImageScope (Aperio, Leica).
- calculate the thickness of the seminiferous epithelium (5 animals per group). The first step was to detect and select only round seminiferous tubules with a lumen in order to analyze only the seminiferous tubules with an axial cut section (2800 seminiferous tubules meeting these criteria were analyzed). Then, for each round seminiferous tubule, the seminiferous epithelium thickness and the respective seminiferous tubule area were measured using ImageJ software (Schneider et al., 2012). The radius of round seminiferous tubules was determined as the mean value of two perpendicular diameters (minor and major axis) divided by two. The seminiferous epithelium area was calculated as:

*Seminiferous epithelium area = round seminiferous tubule area - lumen of seminiferous tubule*

where *lumen of seminiferous tubule = (radius of round seminiferous tubule - seminiferous epithelium thickness)<sup>2</sup> $\times\pi$*  .

- determine the cell density of the seminiferous epithelium by counting the number of cells with StarDist and the Point tool of QuPath. The previously calculated seminiferous epithelium area was used to determine the cell density of the seminiferous epithelium, which was calculated as:

*Cell density = number of cells counted / seminiferous epithelium area*

## 2.6 RNA extraction and RT-qPCR

RNA extraction was performed using TRI Reagent solution according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration was measured by absorbance at 260 nm (A260), RNA integrity was confirmed by electrophoresis, and RNA purity was assessed by determining the A260:A280 ratio using Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Reverse transcription of total RNA (250 ng) was realized with 100 IU of MMLV-RT, 12 IU of RNasin, 100 ng of random primers and 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  of dNTP in a total volume of 20  $\mu\text{l}$  incubated at 37°C for 90 min. The no template control was realized by adding water instead of RNA. The real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed with 5  $\mu\text{l}$  of diluted cDNA (1:10 in RNase free water) using the GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix and 0.25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  of each primer (Table 1). The no template control was realized by adding water instead of cDNA. RT-qPCR was carried out in Stratagene Mx3005P system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The amplification program consists in an initial step of 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C and 60 s at 60°C. At the end of the amplification process, an increase in 0.5°C every 10 s from 50°C to 95°C enabled us to obtain the melting curve which confirmed the uniqueness of each amplicon. The PCR product identity was confirmed by sequencing (Beckman Coulter Genomics, Grenoble, France). PCR efficiency was determined for each set of primers and ranged from 87% to 110% (Brouard et al, 2016). Relative levels of specific mRNA were obtained with the formula  $2^{-(Ct_{ref} - Ct_{gene})}$  with *L19* gene expression as reference (Tena-Sempere et al., 2002).

## 2.7 Statistical analysis

Data were presented as mean  $\pm$  S.E.M. For each group, all extreme values distant from the mean by more than two standard deviations were considered as outlier and removed. The statistical analyses were performed with GraphPad Prism<sup>®</sup>. An one-way ANOVA followed by a Bonferroni test was performed to compare the control group (DMSO) to the treatment groups (BPA, E2 and BPA+E2). If the values did not respect the normality, a Kruskal Wallis test followed by a Dunn's comparison was carried out. The statistical significance was considered to be achieved when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Body and testes weight

Prepubertal rats exposed to BPA presented a significantly higher body weight gain at the end of the treatment (30dpp) and a higher total body weight at the end of the experiment (75 dpp) (Table 2). There was no significant modification of body weight parameters for the rats

exposed at pubertal age (Table 2). The paired testes weight at the end of the experiment was not significantly different between the control and the treatment groups for the prepubertal and pubertal exposure (Table 2). However, the relative testes weight was significantly lower in all the treatment groups for the prepubertal-exposed animals (Table 2). For the group exposed at pubertal age, no significant difference was found between the treatment groups (Table 2).

### **3.2. Histological studies**

The trichrome of Pregnant Gabe staining showed no significant abnormalities in the testicular architecture and a complete spermatogenesis (presence of spermatogonia, spermatocytes, elongated spermatids and spermatozoa) in all treatment groups of the two exposure periods (Fig. 2A). However, cell clusters were observed in the lumen of seminiferous tubules (site of released mature spermatozoa) in all treatments (Fig. 2A; red arrow). The percentages of seminiferous tubules containing this histological abnormality have been quantified and no significant difference between the treated groups and the control group for the prepubertal and pubertal exposure were found (Fig. 2B).

The measurements of seminiferous epithelium thickness showed a significant increase for all treated groups after prepubertal exposure, but no difference was observed when exposure was performed at the pubertal age (Fig. 3A). Furthermore, prepubertal exposure to BPA induced a slight but significant decrease in the seminiferous epithelium cell density. Whereas, in rats exposed at the pubertal age, the seminiferous epithelium cell density was significantly increased after BPA+E2 treatment (Fig. 3B).

### **3.3. Relative gene expression of junctional complex proteins**

As the BTB is essential for the spermatogenesis' establishment and maintenance, the expression of genes encoding for the junctional complex proteins was analyzed by RT-qPCR (Fig. 4). In the pubertal-exposed group, the *caveolin-1* and *connexin-43* gene expression was significantly decreased after BPA and BPA+E2 treatments (Fig. 3B and C). No other significant effects were observed for the *β-catenin*, *N-cadherin*, *occludin* and *tight junction protein (Tjp)* gene expression in the testis after prepubertal or pubertal exposure to BPA, E2, or BPA+E2 (Fig. 4).

### **3.4. Relative gene expression of testicular cell types markers**

Treatment effects on the gene expression of testicular cell types markers have been studied by RT-qPCR; *βHsd* and *Insl3* for the Leydig cells, *vimentin*, *KitL1* and *KitL2* for the Sertoli

cells, *c-Kit* for the spermatogonia, *histone H1t* for the spermatocytes, and *transition protein 1 (Tp1)*, *transition protein 2 (Tp2)* and *protamine 2 (Prm2)* for the spermatids (Fig. 5,7 and 8). In the adult rat, after prepubertal or pubertal exposure, no significant differences were found for the relative gene expression of the germ cell markers (*c-Kit*, *histone H1t*, *Tp1*, *Tp2* and *Prm2*) (Fig 5), as well as for the specific spermatocytes and spermatids transcription factors; the *heat shock factor protein 2 (Hsf2)* and *ovo-like transcriptional repressor 1 (Ovol1)* (Fig. 6). Concerning the Sertoli cells, no significant differences of gene expression were observed between the control and the treated groups for the two periods of treatment (Fig. 7). Regarding the Leydig cell makers, E2 treatment in prepubertal rats induced a significant increase in *3 $\beta$ hsd* gene expression in the adult testis (Fig.8A). No significant change of *Insl3* gene expression was observed between control and exposed groups after prepubertal and pubertal treatments (Fig. 8B).

### **3.5. Relative expression of genes involved in estrogens synthesis and estrogenic and androgenic signaling**

After pubertal exposure to BPA+E2, *Gper* expression was significantly decreased, but this effect was not observed in animals exposed during the prepubertal period (Fig. 9D). No significant modification for *Cyp19a1*, *Esr1* and *AR* relative gene expression was observed for adult rats treated during the prepubertal and pubertal periods (Fig 9A-C).

## **4. Discussion**

A large body of evidence indicates the adverse effects of BPA on male reproduction. We previously assessed the immediate effects of BPA and E2 alone or combined on immature rat testis (Brouard et al., 2016). The present study expands the scope of our previous work by investigating 1) the long-term consequences of prepubertal exposure on the adult testis functions and 2) the immediate effects of pubertal exposure to these compounds in the adult rat testis.

In our study, BPA and E2 exposures in pubertal rats had no significant effect on the body and testis weight parameters (body weight gain during the treatment period, total body weight at the end of the experiment (75dpp), testes weight and relative testes weight) whereas prepubertal exposure to BPA, E2 and BPA+E2 induced a significant decrease in relative testes weight in the adult. This decrease in relative testes weight seems to result from a body weight increase, rather than an effect on testis weight. Several studies described BPA as an

obesogenic compound. Indeed epidemiological studies conducted in young men have shown a positive correlation between urinary levels of BPA and obesity (Mustieles et al., 2019; Trasande et al., 2012; Wang et al., 2012). However, the link is not clearly demonstrated in rodent studies, although animals exposed to low doses of BPA during the perinatal period seem more likely to present metabolic dysfunctions associated with obesity (Legeay and Faure, 2017). Our results clearly support this statement, since only BPA exposure at prepubertal age caused a body weight increase in the adult.

In order to assess testicular architecture, histological analysis was performed. At first sight, the trichrome of Prenant Gabe staining showed a normal testicular organization and a complete spermatogenesis as spermatogonia, spermatocytes, elongated spermatids and spermatozoa were visible. However, our data showed that the seminiferous epithelium was slightly but significantly thicker after prepubertal exposure to E2, BPA and BPA+E2. On the other hand, these modifications in seminiferous epithelium thickness are not linked to major cell density change, which is in accordance with the unmodified testes weight and others studies (Miranda et al., 2018; Mirhoseini et al., 2017). Additionally, no significant modification in gene expression of different germ cell types (*c-Kit*, *H1t*, *Tp1*, *Tp2*, *Prm2*) and transcription factors specific of spermatocytes and spermatids (*Hsf2* and *Ovol1*) were observed. Taken together, these results indicate no significant effect of BPA and E2 on spermatogenesis in the adult testis, whether the exposure took place at prepubertal or pubertal age. Our previous study suggests that prepubertal exposure to E2 and BPA respectively delays and promotes spermatogenesis progression in immature rats (Brouard et al., 2016). The current study analysing the same parameters after the same treatment conditions but in the adult rat, indicates that the prepubertal effects do not significantly disturb the testicular structure in the adult. This indicates that E2 and BPA's effect on the germline could be reversible and further suggests that this effect does not affect the spermatogonial stem cells. Indeed, spermatogenesis is a cyclic process. Hence, while the spermatocytes and spermatids impacted during the prepubertal exposure progress through spermatogenesis, they are replaced by new germ cells entering meiosis from unimpaired spermatogonia (Clermont, 1972). This idea is supported by our previous study which demonstrated an effect of E2 and BPA on the gene expression of *H1t* and *Tp2* (spermatocytes and spermatids markers), but not *c-Kit* (spermatogonia marker) (Brouard et al., 2016). These data are in accordance with a study showing that in rats, spermatocytes and spermatids are the more sensitive germ cells to BPA exposure (Tiwari and Vanage, 2013).

Spermatogenesis is a complex process which is finely regulated by several factors including the steroid hormones, namely androgens and estrogens (Carreau and Hess, 2010; Smith and Walker, 2014). Thus, we investigated the effects of BPA and E2 on Leydig cells markers and on androgen and estrogen receptors. A potent stimulation of *3βHsd* gene expression was observed after prepubertal exposure to E2 without significant modification of *Insl3* gene expression. Those data could indicate a steroidogenesis deregulation in the adult testis after E2 prepubertal exposure as *3βHsd* gene encodes for steroidogenesis enzyme and *Insl3* is a biomarker for Leydig cells in mammals (Ivell et al., 2013). This E2 effect on *3βHsd* gene expression is not observed in the pubertal-exposed group suggesting a long term effect of E2 on steroidogenesis. Previously, E2 has been showed to increase *3βHsd* gene expression in human trophoblast (Beaudoin et al., 1997). More recently, a possible stimulating effect of E2 on *3βHsd* expression through GPER has been described in mouse Leydig cell line, where GPER antagonist (G15) treatment led to a decrease of *3βHsd* expression (Milon et al., 2019). Moreover, in the liver, *3βHsd* expression is regulated by cyclin D1 via the estrogen receptor ESR1 (Mullany et al., 2010), adding another pathway for estrogens to regulate *3βHsd* expression. However, our data on gene expression of estrogens and androgens receptors (*Esr1*, *Gper* and *AR*) did not show any significant difference after BPA and E2 exposure at prepubertal age. Moreover, the relative expression of mRNA encoding for aromatase (*Cyp19a1*), a key enzyme involved in estrogens biosynthesis by aromatization of androgens, was unmodified in all conditions. These results go along with the unaltered spermatogenesis observed in exposed animals. Similar observations were made by Chen and collaborators who exposed adult male rats to BPA at the same dose as us (50 µg/kg bw/day) and reported no adverse effect of BPA on spermatogenesis, along with an unmodified expression of ESR1 and GPER protein (Chen et al., 2017). Nonetheless, in the adult-exposed rats, BPA+E2 exposure significantly decreased *Gper* mRNA level. GPER expression has been reported in germ cells, Sertoli cells and Leydig cells, underlying its involvement in spermatogenesis progression and steroidogenesis regulation (Chimento et al., 2014, 2010a, 2010b; Kotula-Balak et al., 2018; Lucas et al., 2010; Vaucher et al., 2014). However, the precise role of GPER in testicular physiology is still a matter of debate. Some studies reported normal fertility of GPER-deficient male mice (Otto et al., 2009; Prossnitz and Hathaway, 2015), suggesting a minor role of GPER in testicular functions. Indeed, in our study, the down-regulation of *Gper* gene expression following pubertal exposure to BPA+E2 is not associated with spermatogenesis alteration. By contrast, mutant ESR1-knockout and AR-knockout male mice exhibited strong

reproductive defects, indicating the pivotal role of these receptors in the testis (Eddy et al., 1996; Walters et al., 2010). However, no significant effects on *Esr1* and *AR* expression were found in our study, thus explaining the unaltered spermatogenesis despite the decrease in *Gper* gene expression.

As the BTB formed by the Sertoli cells is essential for spermatogenesis, we investigated the effects of BPA and E2 on genes expression encoding for proteins of the junctional complexes. Our data showed that pubertal exposure to BPA and BPA+E2 decreased *caveolin-1* and *connexin-43* gene expression. Yet, no significant modification was observed for the expression of genes specific to Sertoli cells (*vimentin*, *KitL1*, *KitL2*). Thereby, these results highlight that BPA exposure disrupts the gene expression of BTB-related proteins. This is in accordance with others studies reporting an altered BTB integrity and a decrease in BTB-related genes expression and/or protein levels after BPA exposure. An *in vivo* study conducted in adult fish indicated that BPA exposure modified BTB permeability and decreased *occludin* gene expression as well as occludin and  $\beta$ -catenin protein levels (Tao et al., 2019). In cultured rat seminiferous tubules, BPA altered BTB integrity and decreased connexin-43 protein level *ex vivo* (Goldstein et al., 2016). Likewise, connexin-43, N-cadherin and occludin protein levels were decreased in rat Sertoli cell line SerW3 *in vitro* (Fiorini et al., 2004). Moreover, our previous study demonstrated also a direct adverse effect of prepubertal exposure to BPA on BTB in the prepubertal rat testis, evidenced by the decrease in  $\beta$ -catenin, *occludin* and *caveolin-1* gene expression and caveolin-1 protein level (Brouard et al., 2016). However, after prepubertal exposure, no significant effects of BPA and E2 are observed in the adult rats, thus suggesting no long-term effects of BPA on the BTB regulation. This could be explained by a possible recovery period between the end of the treatment (30 *dpp*) and the tissue analysis (75 *dpp*). This time period could allow BTB restructuring, suggesting that BPA's adverse effects might be reversible. Such transitory effects on BTB have recently been described by Cao and collaborators who exposed juvenile mice (35 to 65 *dpp*) to BPA (from 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day to 50  $\text{mg}/\text{kg}$  bw/day). They observed a decreased in occludin protein level at the end of treatment (65*dpp*) for the 3 different doses of BPA. Yet, sixty days after the treatment ended (125 *dpp*) the protein level was restored for the lower doses (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day and 5  $\text{mg}/\text{kg}$  bw/day) (Cao et al., 2020). A series of works studied the heat-induced disruption of the BTB and its progressive restoration (Cai et al., 2011; Chen et al., 2008; Li et al., 2013). In these studies, the disruption of the BTB was associated to a decrease in AR mRNA and protein levels 3h after the heat treatment. AR



levels and BTB integrity were restored 3 and 10 days after the heat treatment respectively (Cai et al., 2011; Li et al., 2013). In addition, the siRNA-mediated knockdown of AR expression as well as the exposure to an AR antagonist (flutamide) blocked the restoration of BTB integrity (Li et al., 2013). Thus, these results evidenced that the restoration of BTB integrity could be regulated by AR. In our study, BPA exposure did not induce a decrease in AR mRNA expression. However, besides being an ER agonist, BPA is also an AR antagonist (Molina-Molina et al., 2013). Hence, we hypothesized that the restoration of BTB integrity after its BPA-induced disruption is inhibited during the treatment period by the antagonist activity of BPA on AR, but might occur during the 45-day period without treatment.

Our results suggest that BPA's adverse effects on testis could be reversible to some extent (Table 3). But, this should be taken with caution as numerous studies have shown multigenerational effect of BPA on the testis by reporting transmission of altered phenotypes up to the third unexposed generation (Akhter et al., 2018; Al-Griw et al., 2021; Rahman et al., 2021). These observations demonstrated the deleterious BPA's effect on epigenetic mechanisms including histone acetylation and DNA methylation (Cariati et al., 2020; Chen et al., 2017; Sidorkiewicz et al., 2018; Yin et al., 2016). In rats, short neonatal exposure to low doses of BPA (2,4 µg of BPA/day from 1 to 5 *dpp*) induced an irreversible hypermethylation of the promoter region of estrogen receptors genes in the adult; 120 days after end of the treatment (Doshi et al., 2011). Furthermore, in regard to human health, the restoration of testicular alterations due to BPA exposure (N'Tumba-Byn et al., 2012; Rouiller-Fabre et al., 2014) seemed unlikely to happen, as we are continuously exposed from fetal to adult life. Thereby, reducing our everyday exposure is crucial.

BPA is an endocrine disruptor commonly considered to have estrogenic effects. In our studies, in order to determine if BPA and E2's mechanisms of action were similar, a group of animals was simultaneously exposed to both compounds (BPA+E2 group). Our previous study raised the idea that BPA could act differently than E2 (Brouard et al., 2016). Similarly, our present results showed that BPA+E2 group follow the BPA group trend, suggesting a prevalent effect of BPA on E2 when they are mixed. In addition, our data highlighted the possible synergic effect of BPA and E2 in combination. Indeed, in the pubertal-exposed group, BPA+E2 exposure decreased *Gper* expression, whereas none of the compound alone had any effect on this endpoint. Also, this result underlies the difficulty to predict the effect of estrogenic compounds mixture (Conley et al., 2016). Although, it is relevant considering that human population is simultaneously exposed to many environmental chemicals on a daily

basis. Thus, more studies are needed to assess the impact of estrogenic compounds in combination.

## 5. Conclusion

To conclude, we previously showed that the prepubertal period is a sensitive window for estrogenic compounds exposure in regard to testicular functions. Nonetheless, our current results showed few effects of BPA and E2 on the adult testis after prepubertal and pubertal exposure, and at first glance without any significant disruption of the spermatogenesis. Moreover, BPA's effect on BTB seems to be reversible to some extent. Further studies are needed to better understand the mechanisms involved in BPA's effects and their reversibility. Finally, this work emphasises the importance of reducing the current exposure level to allow restoration of testicular structure and function after BPA-induced alterations.

## Acknowledgements

The authors thank the CURB for its contribution in animals care and experiments, and the International Square (Normandie Univ, UNICAEN) for English editing.

Funding: this work was supported by the French Ministry for Higher Education and Research. Vanessa Brouard and Maëva Drouault were supported by funding from the Région Normandie.

## References

- Acaroz, U., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Gurler, Z., Demirel, H.H., Kucukkurt, I., Eryavuz, A., Kara, R., Varol, N., Zhu, K., 2019. Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats: protective role of boron. *Toxicol. Res.* 8, 262–269. <https://doi.org/10.1039/C8TX00312B>
- Adegoke, E.O., Rahman, M.S., Pang, M.-G., 2020. Bisphenols Threaten Male Reproductive Health via Testicular Cells. *Front. Endocrinol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00624>
- Akhter, A., Rahaman, M., Suzuki, R., Muroso, Y., Tokumoto, T., 2018. Next-generation and further transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues. *Heliyon* 4, e00788. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00788>
- Al-Griw, M.A., Alghazeer, R.O., Salama, N.M., Lwaleed, B.A., Eskandrani, A.A., Alansari, W.S., Alnajeebi, A.M., Babteen, N.A., Shamlan, G., Elnfati, A.H., 2021. Paternal bisphenol A exposure induces testis and sperm pathologies in mice offspring: Possibly due to oxidative stress? *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 948–955. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.003>
- Andaluri, G., Manickavachagam, M., Suri, R., 2018. Plastic toys as a source of exposure to bisphenol-A and phthalates at childcare facilities. *Environ. Monit. Assess.* 190. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6438-9>
- Bacle, Dupuis, Belmouaz, Bauwens, Cambien, Venisse, Pierre-Eugene, Potin, Migeot, Ayrnaud-Thevenot, 2019. Overexposure to Bisphenol A and Its Chlorinated Derivatives of Patients

- with End-Stage Renal Disease during Online Hemodiafiltration. *Biomolecules* 9, 403. <https://doi.org/10.3390/biom9090403>
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Beaudoin, C., Blomquist, C.H., Bonenfant, M., Tremblay, Y., 1997. Expression of the genes for 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and cytochrome P450scc during syncytium formation by human placental cytotrophoblast cells in culture and the regulation by progesterone and estradiol. *J. Endocrinol.* 154, 379–387. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1540379>
- Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C.N., Kausler, B.X., Haubold, C., Schiegg, M., Ales, J., Beier, T., Rudy, M., Eren, K., Cervantes, J.I., Xu, B., Beuttenmueller, F., Wolny, A., Zhang, C., Koethe, U., Hamprecht, F.A., Kreshuk, A., 2019. ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat. Methods* 16, 1226–1232. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9>
- Bernier, M.R., Vandenberg, L.N., 2017. Handling of thermal paper: Implications for dermal exposure to bisphenol A and its alternatives. *PLOS ONE* 12, e0178449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178449>
- Brouard, V., Guénon, I., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., 2016. Differential effects of bisphenol A and estradiol on rat spermatogenesis' establishment. *Reprod. Toxicol.* 63, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.003>
- Cai, H., Ren, Y., Li, X.-X., Yang, J.-L., Zhang, C.-P., Chen, M., Fan, C.-H., Hu, X.-Q., Hu, Z.-Y., Gao, F., Liu, Y.-X., 2011. Scrotal heat stress causes a transient alteration in tight junctions and induction of TGF- $\beta$  expression: Tight junctions and TGF- $\beta$  expression in heat-treated testes. *Int. J. Androl.* 34, 352–362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01089.x>
- Campion, S.N., Carvallo, F.R., Chapin, R.E., Nowland, W.S., Beauchamp, D., Jamon, R., Koitz, R., Winton, T.R., Cappon, G.D., Hurtt, M.E., 2013. Comparative assessment of the timing of sexual maturation in male Wistar Han and Sprague-Dawley rats. *Reprod. Toxicol.* 38, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.02.003>
- Cao, T., Cao, Y., Wang, H., Wang, P., Wang, X., Niu, H., Shao, C., 2020. The Effect of Exposure to Bisphenol A on Spermatozoon and the Expression of Tight Junction Protein Occludin in Male Mice. *Dose-Response* 18, 155932582092674. <https://doi.org/10.1177/1559325820926745>
- Cariati, F., Carbone, L., Conforti, A., Bagnulo, F., Peluso, S.R., Carotenuto, C., Buonfantino, C., Alviggi, E., Alviggi, C., Strina, I., 2020. Bisphenol A-Induced Epigenetic Changes and Its Effects on the Male Reproductive System. *Front. Endocrinol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00453>
- Carreau, S., Hess, R.A., 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 1517–1535. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0235>
- Chen, M., Cai, H., Yang, J.-L., Lu, C.-L., Liu, T., Yang, W., Guo, J., Hu, X.-Q., Fan, C.-H., Hu, Z.-Y., Gao, F., Liu, Y.-X., 2008. Effect of Heat Stress on Expression of Junction-Associated Molecules and Upstream Factors Androgen Receptor and Wilms' Tumor 1 in Monkey Sertoli Cells. *Endocrinology* 149, 4871–4882. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1093>
- Chen, Z., Zuo, X., He, D., Ding, S., Xu, F., Yang, H., Jin, X., Fan, Y., Ying, L., Tian, C., Ying, C., 2017. Long-term exposure to a “safe” dose of bisphenol A reduced protein acetylation in adult rat testes. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep40337>
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., Pezzi, V., 2014. Role of Estrogen Receptors and G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Regulation of Hypothalamus–Pituitary–Testis Axis and Spermatogenesis. *Front. Endocrinol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00001>
- Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Andò, S., Maggiolini, M., Carreau, S., Pezzi, V., 2010a. 17 $\beta$ -Estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER $\alpha$ . *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.035>
- Chimento, A., Sirianni, R., Zolea, F., Bois, C., Delalande, C., Andò, S., Maggiolini, M., Aquila, S., Carreau, S., Pezzi, V., 2010b. Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax:

- Gper and ESR involvement in rat round spermatid maturation. *Int. J. Androl.* 34, 420–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01100.x>
- Clermont, Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52, 198–236. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198>
- Conley, J.M., Hannas, B.R., Furr, J.R., Wilson, V.S., Gray, L.E., 2016. A Demonstration of the Uncertainty in Predicting the Estrogenic Activity of Individual Chemicals and Mixtures From an *In Vitro* Estrogen Receptor Transcriptional Activation Assay (T47D-KBluc) to the *In Vivo* Uterotrophic Assay Using Oral Exposure. *Toxicol. Sci.* 153, 382–395. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw134>
- Doshi, T., Mehta, S.S., Dighe, V., Balasinar, N., Vanage, G., 2011. Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology* 289, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.011>
- Dualde, P., Pardo, O., Corpas-Burgos, F., Kuligowski, J., Gormaz, M., Vento, M., Pastor, A., Yusà, V., 2019. Biomonitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. *Sci. Total Environ.* 668, 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.024>
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., Korach, K.S., 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796–4805. <https://doi.org/10.1210/endo.137.11.8895349>
- Engel, S.M., Levy, B., Liu, Z., Kaplan, D., Wolff, M.S., 2006. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod. Toxicol.* 21, 110–112. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.07.007>
- Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C., Pointis, G., 2004. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.* 18, 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.01.002>
- Gámez, J.M., Penalba, R., Cardoso, N., Ponzó, O., Carbone, S., Pandolfi, M., Scacchi, P., Reynoso, R., 2014. Low dose of bisphenol A impairs the reproductive axis of prepuberal male rats. *J. Physiol. Biochem.* 70, 239–246. <https://doi.org/10.1007/s13105-013-0298-8>
- Goldstein, K.M., Seyler, D.E., Durand, P., Perrard, M.-H., Baker, T.K., 2016. Use of a rat ex-vivo testis culture method to assess toxicity of select known male reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.* 60, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.01.003>
- Huang, R., Liu, Z., Yuan, S., Yin, H., Dang, Z., Wu, P., 2017. Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000–2016) and its risk analysis. *Environ. Pollut.* 230, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.026>
- Ivell, R., Wade, J.D., Anand-Ivell, R., 2013. INSL3 as a Biomarker of Leydig Cell Functionality. *Biol. Reprod.* 88, 147–147. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.108969>
- Kotula-Balak, M., Pawlicki, P., Milon, A., Tworzydło, W., Sekula, M., Pacwa, A., Gorowska-Wojtowicz, E., Bilinska, B., Pawlicka, B., Wiater, J., Zarzycka, M., Galas, J., 2018. The role of G-protein-coupled membrane estrogen receptor in mouse Leydig cell function—in vivo and in vitro evaluation. *Cell Tissue Res.* 374, 389–412. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2861-7>
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B., Gustafsson, J.-Å., 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor B. *Endocrinology* 139, 4252–4263. [https://doi.org/0013-7227/98/\\$03.00/0](https://doi.org/0013-7227/98/$03.00/0)
- Lee, J.-H., Yi, S.-K., Kim, S.-Y., Kim, J.-S., Son, S.-A., Jeong, S.-H., Kim, J.-B., 2017. Salivary bisphenol A levels and their association with composite resin restoration. *Chemosphere* 172, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.123>
- Legeay, S., Faure, S., 2017. Is bisphenol A an environmental obesogen? *Fundam. Clin. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1111/fcp.12300>
- Li, X.-X., Chen, S.-R., Shen, B., Yang, J.-L., Ji, S.-Y., Wen, Q., Zheng, Q.-S., Li, L., Zhang, J., Hu, Z.-Y., Huang, X.-X., Liu, Y.-X., 2013. The Heat-Induced Reversible Change in the Blood-Testis Barrier (BTB) Is Regulated by the Androgen Receptor (AR) via the Partitioning-Defective Protein (Par) Polarity Complex in the Mouse. *Biol. Reprod.* 89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109405>

- Lucas, T.F.G., Royer, C., Siu, E.R., Lazari, M.F.M., Porto, C.S., 2010. Expression and Signaling of G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER) in Rat Sertoli Cells. *Biol. Reprod.* 83, 307–317. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084160>
- Malkov, M., Fisher, Y., Don, J., 1998. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 59, 84–92. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.84>
- Matsumoto, A., Kunugita, N., Kitagawa, K., Isse, T., Oyama, T., Foureman, G.L., Morita, M., Kawamoto, T., 2003. Bisphenol A levels in human urine. *Environ. Health Perspect.* 111, 101–104. <https://doi.org/10.1289/ehp.5512>
- Milon, A., Kaczmarczyk, M., Pawlicki, P., Bilinska, B., Duliban, M., Gorowska-Wojtowicz, E., Tworzyclo, W., Kotula-Balak, M., 2019. Do estrogens regulate lipid status in testicular steroidogenic Leydig cell? *Acta Histochem.* 121, 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.04.012>
- Miranda, E.P. de, Lorenzini, F., Neves, B.V.D., Melchiorretto, E.F., Hota, T., Fraga, R.D., 2018. Stereological and morphological analysis of the effects of aging on spermatogenesis in rat testis. *Acta Cir. Bras.* 33, 904–913. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180100000005>
- Mirhoseini, M., Amiri, F., Malekshah, A., Gatabi, Z., Ghaffari, E., 2017. Protective effects of melatonin on testis histology following acute torsion-detorsion in rats. *Int. J. Reprod. Biomed.* 15, 141–146.
- Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.015>
- Moreno-Gómez-Toledano, R., Arenas, M.I., Sánchez-Esteban, S., Cook, A., Saura, M., Bosch, R.J., 2021. Critical Analysis of Human Exposure to Bisphenol a and its Novel Implications on Renal, Cardiovascular and Hypertensive Diseases. *Endocr. Disruptors.*
- Mullany, L.K., Hanse, E.A., Romano, A., Blomquist, C.H., Mason, J.I., Delvoux, B., Anttila, C., Albrecht, J.H., 2010. Cyclin D1 regulates hepatic estrogen and androgen metabolism. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G884–G895. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00471.2009>
- Mustieles, V., Casas, M., Ferrando-Marco, P., Ocón-Hernández, O., Reina-Pérez, I., Rodríguez-Carrillo, A., Vela-Soria, F., Pérez-Lobato, R., Navarrete-Muñoz, E.M., Freire, C., Olea, N., Fernández, M.F., 2019. Bisphenol A and adiposity measures in peripubertal boys from the INMA-Granada cohort. *Environ. Res.* 173, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.03.045>
- N'Tumba-Byn, T., Moison, D., Lacroix, M., Lecureuil, C., Lesage, L., Prud'homme, S.M., Pozzi-Gaudin, S., Frydman, R., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2012. Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function. *PLoS ONE* 7, e51579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051579>
- Otto, C., Fuchs, I., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Andreasen, P., Schwarz, G., Altmann, H., Klewer, M., Schoor, M., Vonk, R., Fritzemeier, K.-H., 2009. GPR30 Does Not Mediate Estrogenic Responses in Reproductive Organs in Mice. *Biol. Reprod.* 80, 34–41. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071175>
- Peng, C.-Y., Tsai, E.-M., Kao, T.-H., Lai, T.-C., Liang, S.-S., Chiu, C.-C., Wang, T.-N., 2019. Canned food intake and urinary bisphenol a concentrations: a randomized crossover intervention study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 27999–28009. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05534-y>
- Picut, C.A., Remick, A.K., de Rijk, E.P.C.T., Simons, M.L., Stump, D.G., Parker, G.A., 2015. Postnatal Development of the Testis in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Toxicol. Pathol.* 43, 326–342. <https://doi.org/10.1177/0192623314547279>
- Prossnitz, E.R., Hathaway, H.J., 2015. What have we learned about GPER function in physiology and disease from knockout mice? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 153, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.014>
- Rahman, M.S., Pang, W.-K., Ryu, D.-Y., Park, Y.-J., Ryu, B.-Y., Pang, M.-G., 2021. Multigenerational impacts of gestational bisphenol A exposure on the sperm function and

- fertility of male mice. *J. Hazard. Mater.* 416, 125791.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125791>
- Rochester, J.R., 2013. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod. Toxicol.* 42, 132–155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>
- Rotimi, O.A., Olawole, T.D., De Campos, O.C., Adelani, I.B., Rotimi, S.O., 2021. Bisphenol A in Africa: A review of environmental and biological levels. *Sci. Total Environ.* 764, 142854. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142854>
- Rouiller-Fabre, V., Habert, R., Livera, G., 2014. Effects of endocrine disruptors on the human fetal testis. *Ann. Endocrinol.* 75, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.007>
- Salian, S., Doshi, T., Vanage, G., 2009. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology* 265, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.012>
- Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C., Myers, G., 2018. Cell detection with star-convex polygons, in: *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI)*. Springer, Granada, Spain, pp. 265–273.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sharma, A., Mollier, J., Brocklesby, R.W.K., Caves, C., Jayasena, C.N., Minhas, S., 2020. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reprod. Med. Biol.* 19, 243–253. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12326>
- Shi, M., Sekulovski, N., MacLean, J.A., Hayashi, K., 2018. Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Male Reproductive Functions in Mice. *Toxicol. Sci.* 163, 620–631. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy061>
- Sidorkiewicz, I., Czerniecki, J., Jarzabek, K., Zbucka-Krętowska, M., Wołczyński, S., 2018. Cellular, transcriptomic and methylome effects of individual and combined exposure to BPA, BPF, BPS on mouse spermatocyte GC-2 cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 359, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.006>
- Skakkebaek, N.E., Jorgensen, N., Main, K.M., Meyts, E.R.-D., Leffers, H., Andersson, A.-M., Juul, A., Carlsen, E., Mortensen, G.K., Jensen, T.K., Toppari, J., 2006. Is human fecundity declining? *Int. J. Androl.* 29, 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00573.x>
- Smith, L.B., Walker, W.H., 2014. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin. Cell Dev. Biol.* 30, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2014.02.012>
- Song, X., Miao, M., Zhou, X., Li, D., Tian, Y., Liang, H., Li, R., Yuan, W., 2019. Bisphenol A Exposure and Sperm ACHE Hydroxymethylation in Men. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 152. <https://doi.org/10.3390/ijerph16010152>
- Tao, S., Wang, L., Zhu, Z., Liu, Y., Wu, L., Yuan, C., Zhang, G., Wang, Z., 2019. Adverse effects of bisphenol A on Sertoli cell blood-testis barrier in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171, 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.007>
- Tena-Sempere, M., Barreiro, M.L., Gonzalez, L.C., Gaytan, F., Zhang, F.-P., Caminos, J.E., Pinilla, L., Casanueva, F.F., Dieguez, C., Aguilar, E., 2002. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143, 717–725.
- Thomas, P., Dong, J., 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.017>
- Tian, Y., Zhou, X., Miao, M., Li, D., Wang, Z., Li, R., Liang, H., Yuan, W., 2018. Association of Bisphenol A Exposure with LINE-1 Hydroxymethylation in Human Semen. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 1770. <https://doi.org/10.3390/ijerph15081770>
- Tiwari, D., Vanage, G., 2013. Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. *Reprod. Toxicol.* 40, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.05.013>
- Toyama, Y., Yuasa, S., 2004. Effects of neonatal administration of 17 $\beta$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis. *Reprod. Toxicol.* 19, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.08.003>
- Trasande, L., Attina, T.M., Blustein, J., 2012. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *Jama* 308, 1113–1121. <https://doi.org/10.1001/2012.jama.11461>

- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Razak, S., Rauf, N., Khan, M., Mahboob, S., 2019. Prenatal BPA and its analogs BPB, BPF, and BPS exposure and reproductive axis function in the male offspring of Sprague Dawley rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 38, 1344–1365. <https://doi.org/10.1177/0960327119862335>
- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Turi, N., Ullah, W., Siddiqui, M.F., Zakria, M., Lodhi, K.Z., Khan, M.M., 2018. Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A and its analogue bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: A focus on the possible hormonal mode of action. *Food Chem. Toxicol.* 121, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.024>
- van der Walt, S., Schönberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Gouillart, E., Yu, T., 2014. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* 2, e453. <https://doi.org/10.7717/peerj.453>
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F.J., Schoenfelder, G., 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 118, 1055–1070. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>
- Vaucher, L., Funaro, M.G., Mehta, A., Mielnik, A., Bolyakov, A., Prossnitz, E.R., Schlegel, P.N., Paduch, D.A., 2014. Activation of GPER-1 Estradiol Receptor Downregulates Production of Testosterone in Isolated Rat Leydig Cells and Adult Human Testis. *PLoS ONE* 9, e92425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092425>
- Vom Saal, F.S., Vandenberg, L.N., 2021. Update on the health effects of bisphenol A: Overwhelming evidence of harm. *Endocrinology* 162, bqaa171. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa171>
- Walters, K.A., Simanainen, U., Handelsman, D.J., 2010. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Hum. Reprod. Update* 16, 543–558. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq003>
- Wang, H., Zhou, Y., Tang, C., Wu, J., Chen, Y., Jiang, Q., 2012. Association between bisphenol A exposure and body mass index in Chinese school children: a cross-sectional study. *Environ. Health* 11, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-79>
- WHO, (World Health Organization), 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: summary for decision-makers.
- Xie, M., Bu, P., Li, F., Lan, S., Wu, H., Yuan, L., Wang, Y., 2016. Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget* 7, 10606. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7218>
- Yin, L., Dai, Y., Jiang, X., Liu, Y., Chen, H., Han, F., Cao, J., Liu, J., 2016. Role of DNA methylation in bisphenol A exposed mouse spermatocyte. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.003>

## FIGURES CAPTIONS

**Figure 1. Schematic illustration of the exposure windows.** This study aimed to investigate the effect of BPA and E2 on the adult rat testis after exposure at two different life times. Each day of the exposure (15 days), rats received their treatment by abdominal subcutaneous injections. **A.** The pubertal exposure was performed from 60 to 75 dpp (hatched area). Rats were sacrificed immediately at the end of the exposure, at 75 dpp (adult age; arrow). **B.** The prepubertal exposure was performed from 15 to 30 dpp (hatched area). Rats were allowed to grow to adulthood and were sacrificed at 75 dpp (arrow). **C.** This study expands the scope of our previous work. In our previous study, a prepubertal exposure (15 to 30 dpp) was performed (hatched area), and rats were killed immediately at the end of the exposure, at 30 dpp (arrow).

**Figure 2. Testes histological analysis of adult rats exposed to E2, BPA or BPA+E2 at prepubertal stage (left panel) or at pubertal stage (right panel).** **A.** Trichrome of Prenant Gabe staining of testis section. Scale = 50  $\mu\text{m}$ . Arrowheads: interstitial tissue ; black arrows: elongated spermatids or spermatozoa ; red arrows: cell clusters in seminiferous tubules lumen, considered as histological abnormality. **B.** Graphical representation of the percentage of seminiferous tubules with histological abnormality. Data are shown as mean  $\pm$  SEM, n=5-8 animals per group. Statistical significance was analyzed by ANOVA followed by a Bonferroni test.

**Figure 3. Effects of prepubertal (left panel) or pubertal (right panel) exposure to E2, BPA or BPA+E2 on seminiferous epithelium in adult rats.** Pre-analytical steps allowed to detect only round seminiferous tubules on testis sections stained with Trichrome of Prenant Gabe. **A.** Seminiferous epithelium thickness ( $\mu\text{m}$ ) was measured on 2800 round seminiferous tubules (all conditions combined) using Image J software. Results are normalized against seminiferous tubule area and expressed as a ratio (%). **B.** Cell density of seminiferous epithelium ( $\text{cells}/\mu\text{m}^2$ ) was calculated using QuPath software for cell count (150000 cells have been counted, all conditions combined). Data are shown as mean  $\pm$  SEM, n=5 animals per group. Statistical significance was analyzed by a Kruskal Wallis test with Dunn's comparison. \* $p < 0.05$  ; \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the control group (DMSO).

**Figure 4. Effects of prepubertal (left panel) or pubertal (right panel) exposure to E2, BPA or BPA+E2 on BTB-related genes expression in adult rats.** Relative mRNA levels of **(A)**  $\beta$ -catenin, **(B)** caveolin-1, **(C)** connexin-43, **(D)** N-cadherin **(E)** occludin, **(F)** tight junction protein (*Tjp*) were quantified by RT-qPCR. Data are shown as mean  $\pm$  SEM, n=7-8 animals per group. Statistical significance was analyzed by ANOVA followed by a Bonferroni test. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  indicate significant difference compared to the control group (DMSO).



**Figure 5. Effects of prepubertal (left panel) or pubertal (right panel) exposure to E2, BPA or BPA+E2 on germ cells marker gene expression in adult rats.** Relative mRNA levels of genes expressed in germ cells were quantified by RT-qPCR. (A) *c-Kit* for spermatogonia, (B) *histone H1t* for spermatocytes, (C) *transition protein 1 (Tp1)*, (D) *transition protein 2 (Tp2)* and (E) *protamine 2 (Prm2)* for spermatids. Data are shown as mean  $\pm$  SEM, n=7-8 animals per group, Statistical significance was analyzed by ANOVA followed by a Bonferroni test.

**Figure 6. Effects of prepubertal (left panel) or pubertal (right panel) exposure to E2, BPA or BPA+E2 on germ cells specific transcription factors in adult rats.** Relative mRNA levels of transcription factors specifically expressed in germ cells (A) *Hsf2* and (B) *Ovolf1* were quantified by RT-qPCR. Data are shown as mean  $\pm$  SEM, n=7-8 animals per group. Statistical significance was analyzed by ANOVA followed by a Bonferroni test.

**Figure 7. Effects of prepubertal (left panel) or pubertal (right panel) exposure to E2, BPA or BPA+E2 on Sertoli cells marker gene expression in adult rats.** Relative mRNA levels of genes expressed in Sertoli cells (A) *vimentin*, (B) *KitL1* and (C) *KitL2* were quantified by RT-qPCR. Data are shown as mean  $\pm$  SEM, n=7-8 animals per group. Statistical significance was analyzed by ANOVA followed by a Bonferroni test.

**Figure 8. Effects of prepubertal (left panel) or pubertal (right panel) exposure to E2, BPA or BPA+E2 on Leydig cells marker gene expression in adult rats.** Relative mRNA levels of genes expressed in Leydig cells (A) *3 $\beta$ Hsd* and (B) *Insl3* were quantified by RT-qPCR. Data are shown as mean  $\pm$  SEM n=7-8 animals per group. Statistical significance was analyzed by ANOVA followed by a Bonferroni test. \*\*p<0.01 indicates significant difference compared to the control group (DMSO).

**Figure 9. Effects of prepubertal (left panel) or pubertal (right panel) exposure to E2, BPA or BPA+E2 on genes involved in estrogens synthesis and estrogenic and androgenic signaling in adult rats.** Relative mRNA levels of (A) *AR*, (B) *Cyp19a1*, (C) *Esr1* and (D) *Gper* were quantified by RT-qPCR. Data are shown as mean  $\pm$  SEM, n=7-8 animals per group. Statistical significance was analyzed by ANOVA followed by a Bonferroni test. \*p<0.05 indicates significant difference compared to the control group (DMSO).

**Figure 1**

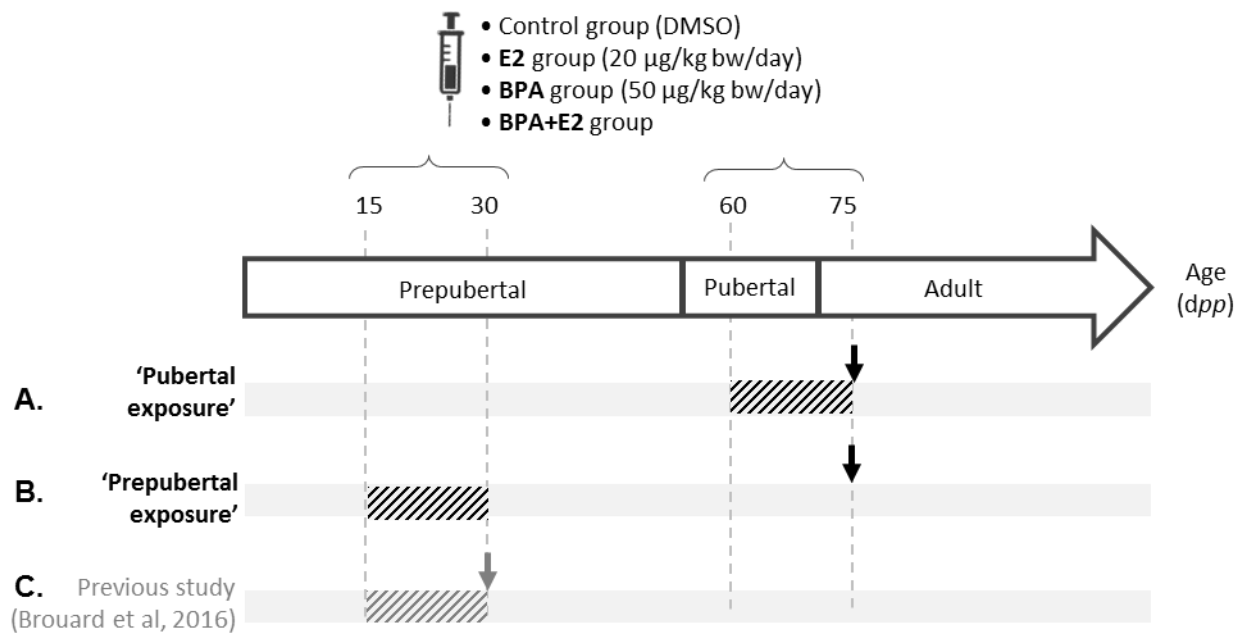


Figure 2

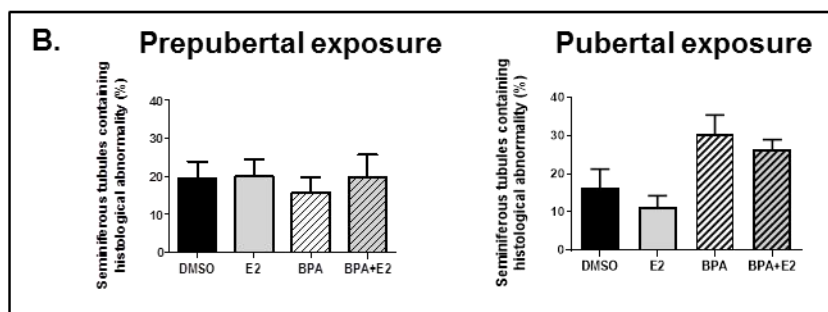
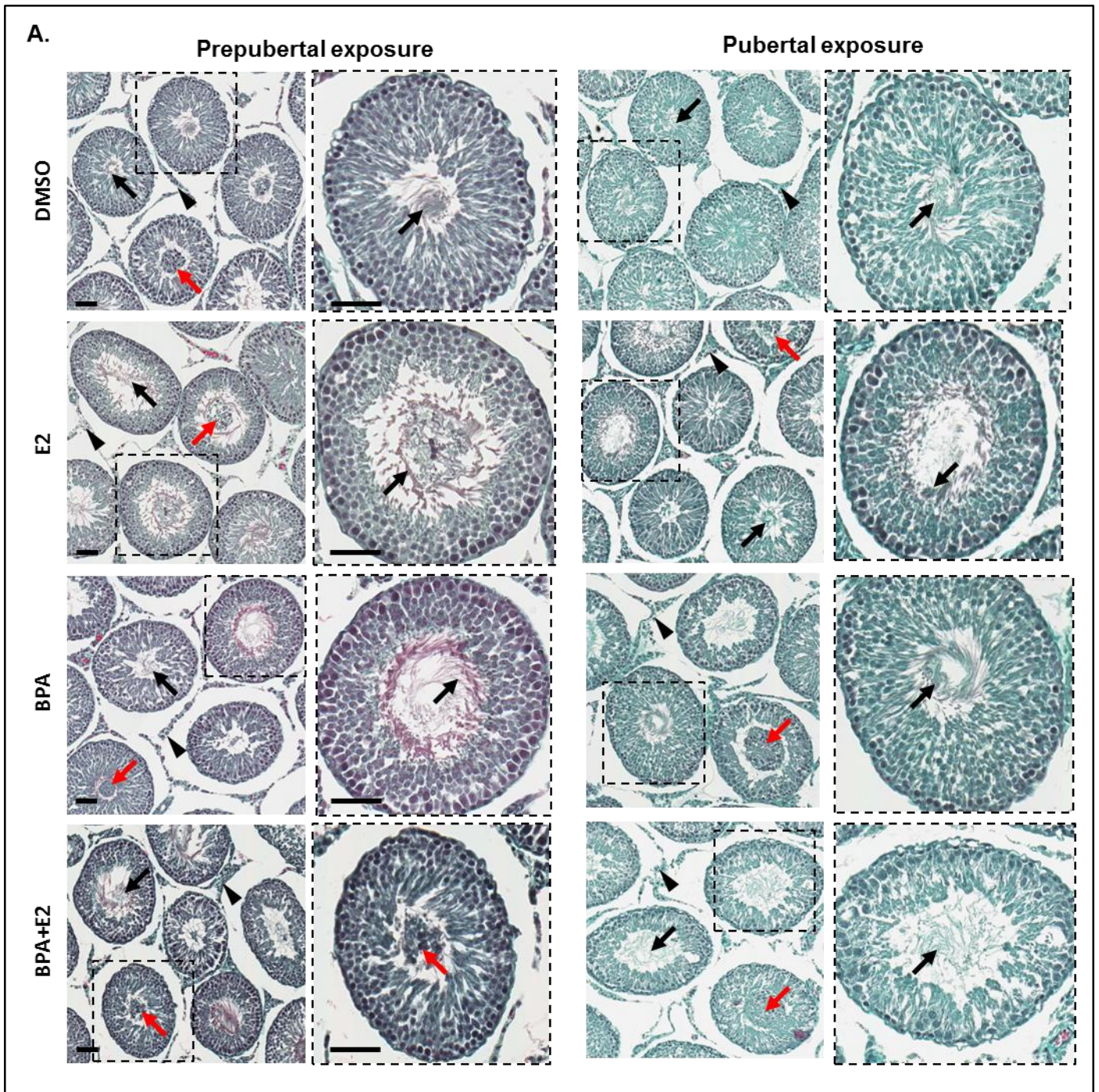


Figure 3

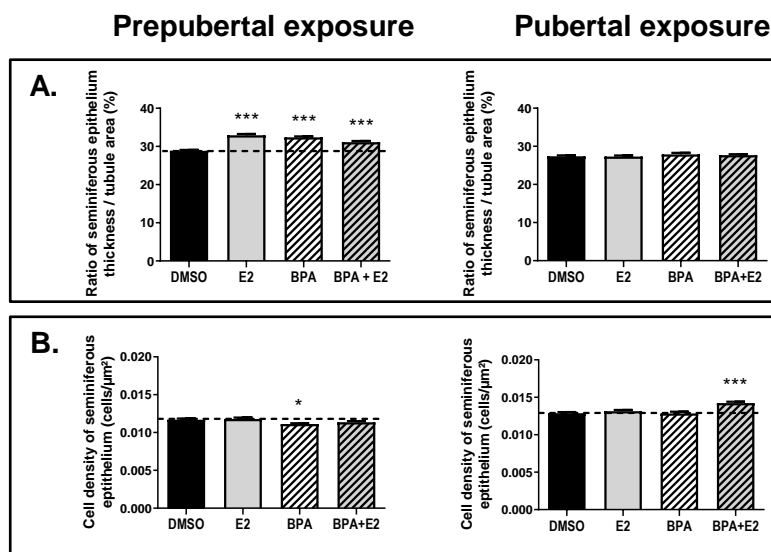


Figure 4

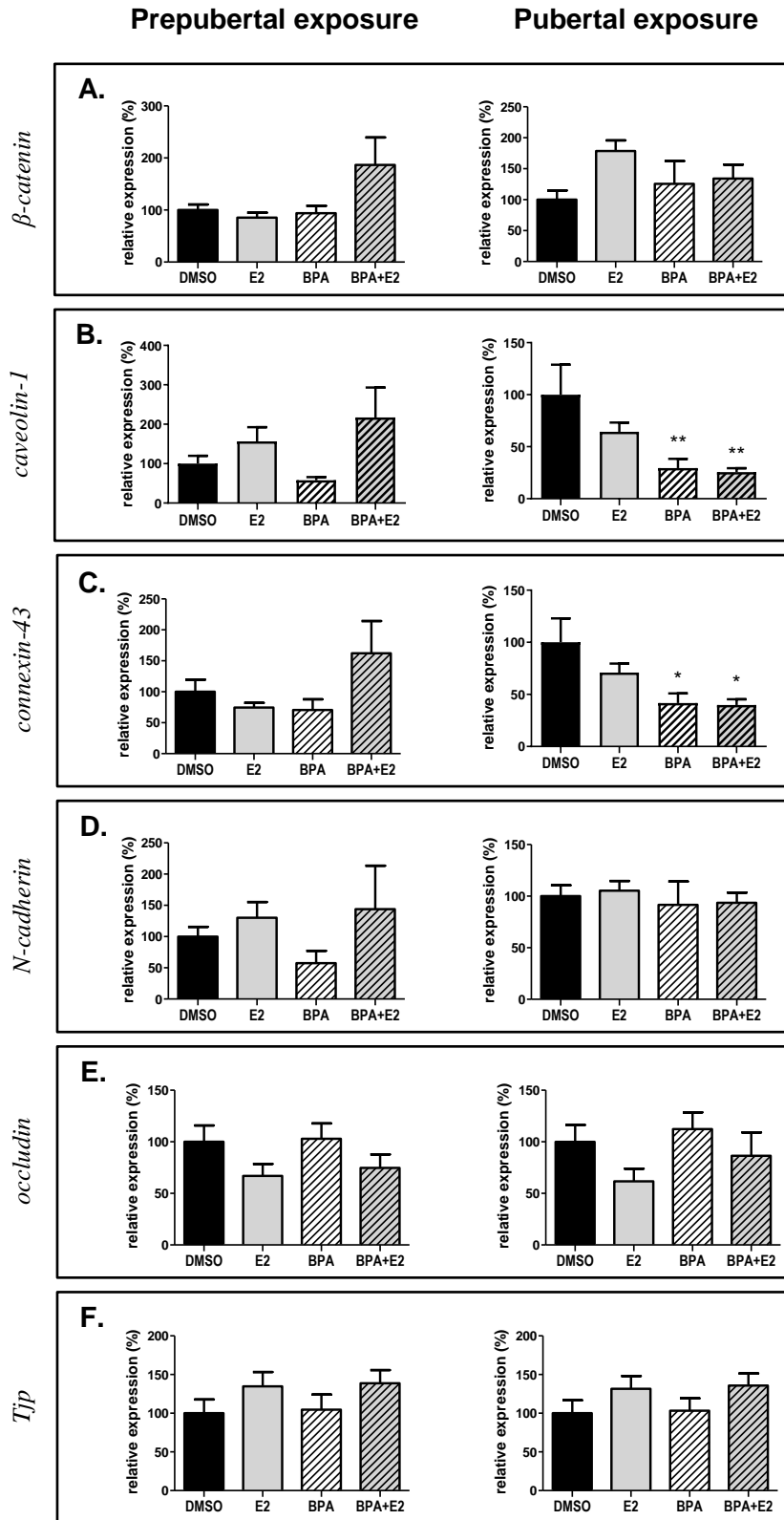


Figure 5

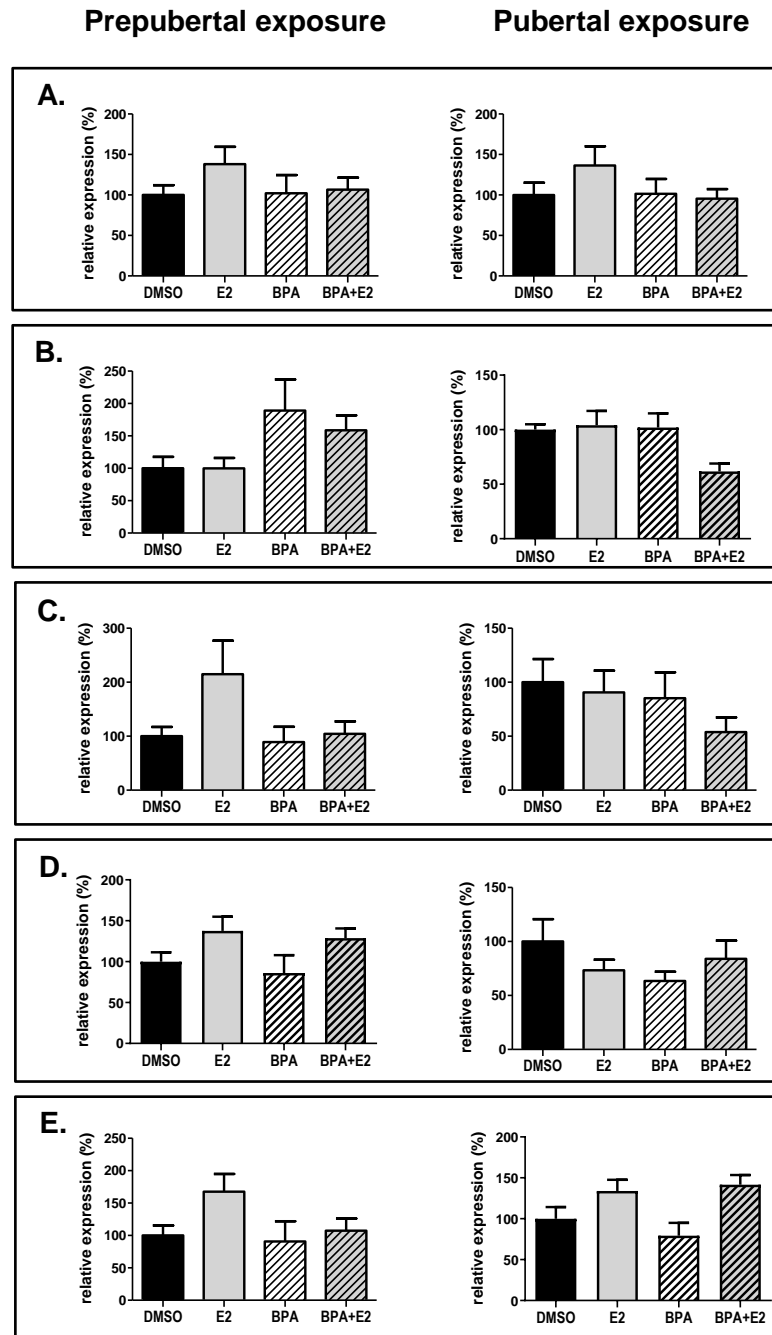


Figure 6

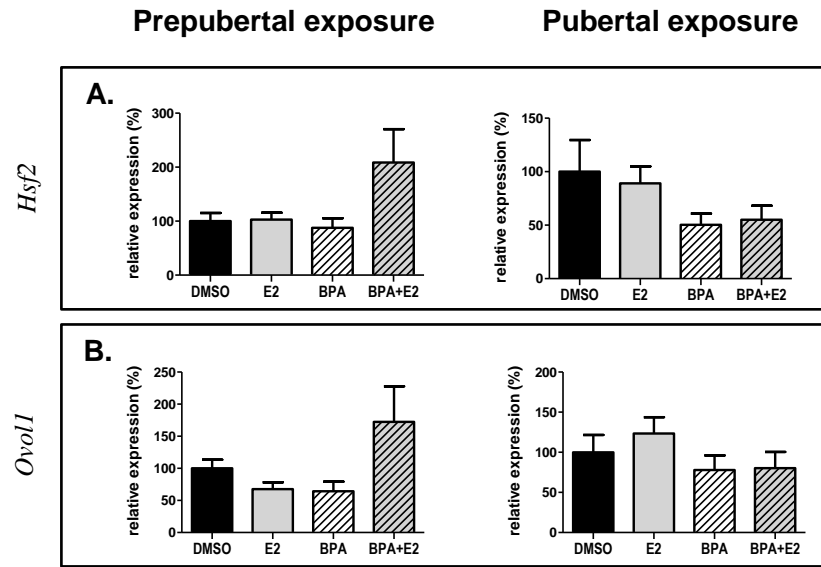


Figure 7

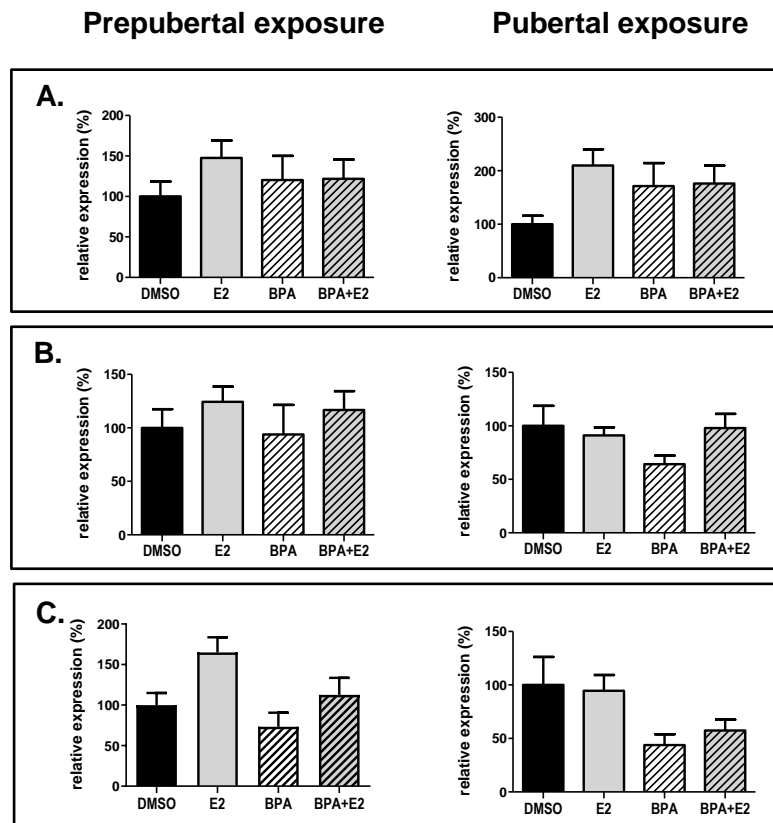




Figure 8

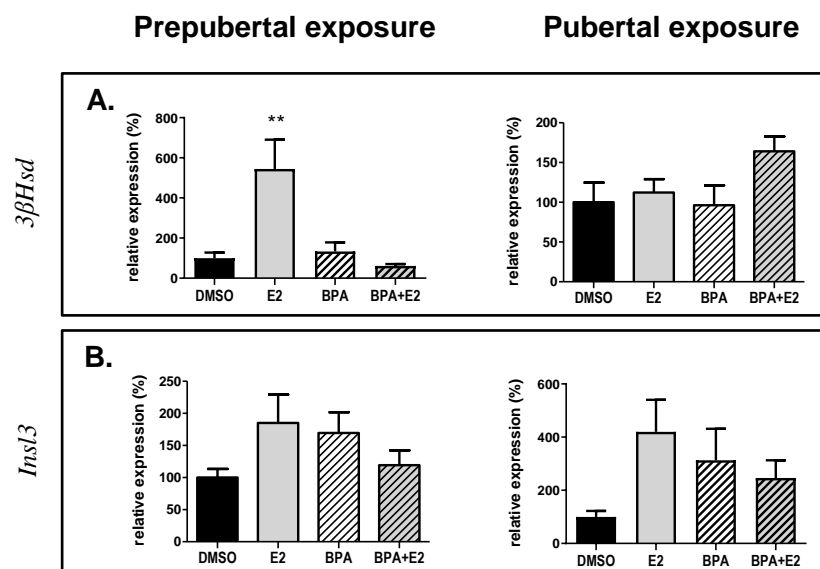
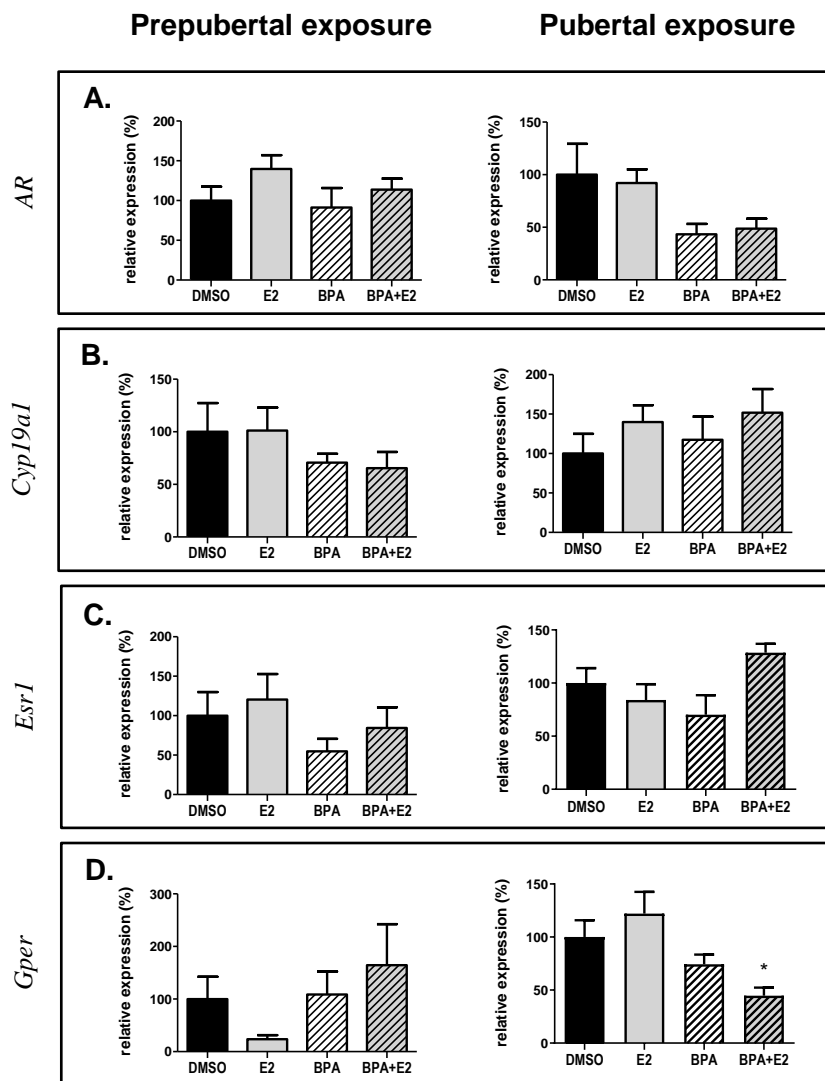


Figure 9



**Table 1.** Primers used for RT-qPCR

Gene name (official symbol)	GenBank accession number	Primer sequences
<i>β-catenin</i>	NM_053357.2	F- AAGGTGCTGTCTGTCTGCTC R- GTCTGTCAGGTGAGGCC
<i>3βHsd</i>	NM_001007719	F- AGGTCCTGATGCCCTCTTTT R- TGTCATTGCTGAAGCCTTTG
<i>AR</i>	NM_012502.1	F- TGGGGACATGCGTTTGGACAGT R- GCTGCCACAAGTGAGAGCTCCG
<i>c-Kit</i>	ND12524.1	F- GGCCTAGCCAGAGACATCAG R- CATTCGGAAACCTTCCTTGA
<i>caveolin-1</i>	NM_031556	F- AGTTGATCTCTGCGCTTGGT R- TGGTGAGGGGTTAGCGTAAG
<i>connexin-43 (Gja1)</i>	NM_012567.2	F- TCCTTGGTGTCTCTCGCTT R- GAGCAGCCATTGAAGTAGGC
<i>Cyp19a1</i>	M33986	F- CGTCATGTTGCTTCTCATCG R- TACCGCAGGCTCTCGTTAAT
<i>Esr1</i>	X61098	F- AATTCTGACAATCGACGCCAG R- GTGCTTCAACATTCTCCCTCCTC
<i>Gper</i>	NM_133573.1	F- GATGTTTCAGAGAGGTCCCA R- TCTACCTAGGTCCCCTGTGG
<i>H1t (H1.6)</i>	NM_012579.1	F- CAAGAAGCCAAAAGCTACGC R- TCTTCTGCCTTCCTTA
<i>Hsf2</i>	NM_031694.2	F- TAAATGGCTCTCCAACCTG R- CCAACAGCTCAACCTTTCCTA
<i>Insl3</i>	NC_005115.4	F- CGCGACCGGGAGCTG R- CAAAAGGTCTTGCTGGGTGC
<i>KitL1 (Kitlg1)</i>	NM_021844	F- TTGTTACCTTCGCACAGTGG R- TTCAGTGCACCTTTCACAGC
<i>KitL2 (Kitlg2)</i>	NM_021843.4	F- GCAGCCAGTTCCTTAGGA R- AGTGCCATTGCTGTCCATTG
<i>L19 (Rpl19)</i>	NM_031103	F- GGAATCTAAGAAGATTGACCGTC R- GCCTTGTCTGCCTTCAGTTT
<i>N-cadherin (cadherin 2)</i>	NM_031333.1	F- GAGCCGATGAAGGAACCACA R- CCTTTGTAGACGTCCGCTGT
<i>occludin</i>	NM_031329.2	F- AGTGACTTTGTGTAACACTGGTTC R- AACAGTCCTTCCACTCGGG
<i>Ovol1</i>	NM_001107572.1	F- GGGGAGATCTACGTGCCAG R- AAGGCTCATGTCCAAAGCCA
<i>Prm2</i>	NM_012873.1	F- GGCTTCACAGGATCCACAAGA R- ATAGTGCCACCTGCATTTC
<i>Tjp</i>	NM_001106266.1	F- CCGATTGCTGATGTTGCCAG R- ATAATGCCCGAGCTCCGATG
<i>Tp1 (Tnp1)</i>	NC_005108.4	F- GGAAGAGCAGCCTGAAGAGTAG R- TTGCTGCCTGGTGTAGTTG
<i>Tp2 (Tnp1)</i>	NM_017057.2	F- TGCACTCTCGTTACTCACCCTTC R- ATCTTCGTCCTGAGCTACGC
<i>vimentin</i>	NM_031140.1	F- AGATCGATGTGGACGTTTCC R- CACCTGTCTCCGGTATTTCGT

F: forward primer; R: reverse primer.

*3βHsd*: 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase; *AR*: androgen receptor; *c-Kit*: *KIT* proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *Gja1*: gap junction protein alpha 1; *H1t/H1.6*: testicular *H1* histone/*H1.6* linker histone; *Hsf2*: heat shock factor 2; *Insl3*: insulin-like 3; *KitL1/Kitlg1*: *KIT* ligand 1; *KitL2/Kitlg2*: *KIT* ligand 2; *L19/Rpl19*: ribosomal protein 19; *Ovol1*: ovo-like transcriptional repressor 1; *Prm2*: protamine 2; *Tjp*: tight junction protein; *Tp1/Tnp1*: transition protein 1; *Tp2/Tnp2*: transition protein 2

**Table 2.** Effects of treatments on weight parameters (body weight gain during the treatment period, body weight, paired testes weight and testes relative weight at 75 dpp) in adult rats exposed at prepubertal or pubertal stage.

	Prepubertal exposure				Pubertal exposure			
	Control	E2	BPA	BPA+E2	Control	E2	BPA	BPA+E2
Body weight gain (g)	45 ± 4.27	47.47 ± 1.01	62.46 ± 1 ***	50.17 ± 2.53	76 ± 3.18	62 ± 5.37	75.25 ± 5.69	60 ± 4.24
Body weight (g)	404.5 ± 15.37	448.87 ± 16.02	477.71 ± 9.07 **	442.12 ± 10.77	488.62 ± 12.36	455.25 ± 11.57	483 ± 14.56	451.37 ± 9.61
Testes weight (g)	1.7 ± 0.04	1.7 ± 0.04	1.8 ± 0.03	1.71 ± 0.04	1.796 ± 0.09	1.696 ± 0.03	1.687 ± 0.04	1.706 ± 0.04
Relative testes weight	0.426 ± 0.02	0.379 ± 0.01 *	0.382 ± 0.01 *	0.387 ± 0.01 *	0.367 ± 0.01	0.379 ± 0.01	0.353 ± 0.01	0.379 ± 0.01

Values are expressed as mean ± SEM, n=8 animals per group. Statistical significance was analysed by ANOVA followed by a Bonferroni test for body and testes weights and a Kruskal Wallis test with Dunn's comparison for the body weight gain and relative testes weight. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 compared to the control group (DMSO) for rats exposed at prepubertal stage.

**Table 3:** Summary of the results

	E2		BPA		BPA+E2	
	Pre	Pu	Pre	Pu	Pre	Pu
<b>Weight parameters</b>						
Body weight gain	-	-	↗	-	-	-
Body weight	-	-	↗	-	-	-
Testes weight	-	-	-	-	-	-
Relative testes weight	↘	-	↘	-	↘	-
<b>Histological analysis</b>						
Histological abnormalities	-	-	-	-	-	-
Seminiferous epithelium thickness	↗	-	↗	-	↗	-
Cell density	-	-	↘	-	-	↗
<b>Gene expression</b>						
<b>Junctional complex</b>						
<i>β-catenin</i>	-	-	-	-	-	-
<i>caveolin-1</i>	-	-	-	↘	-	↘
<i>connexin-43</i>	-	-	-	↘	-	↘
<i>N-cadherin</i>	-	-	-	-	-	-
<i>occludin</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tjp</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Germ cells markers</b>						
<i>c-Kit</i>	-	-	-	-	-	-
<i>H1t</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tp1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tp2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Prm2</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Germ cells specific transcription factors</b>						
<i>Hsf2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ovol1</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Sertoli cells marker</b>						
<i>vimentin</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Kitl1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Kitl2</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Leydig cells marker</b>						
<i>3βhsd</i>	↗	-	-	-	-	-
<i>Insl3</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Estrogens synthesis and estrogenic &amp; androgenic signaling pathways</b>						
<i>AR</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cyp19a1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Esr1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Gper</i>	-	-	-	-	-	↘

Pre: prepubertal exposure (15-30 dpp); Pu: pubertal exposure (60-75 dpp);  
↗: increase compared to the control condition; ↘: decrease compared to the control condition; - : no change compared to the control condition



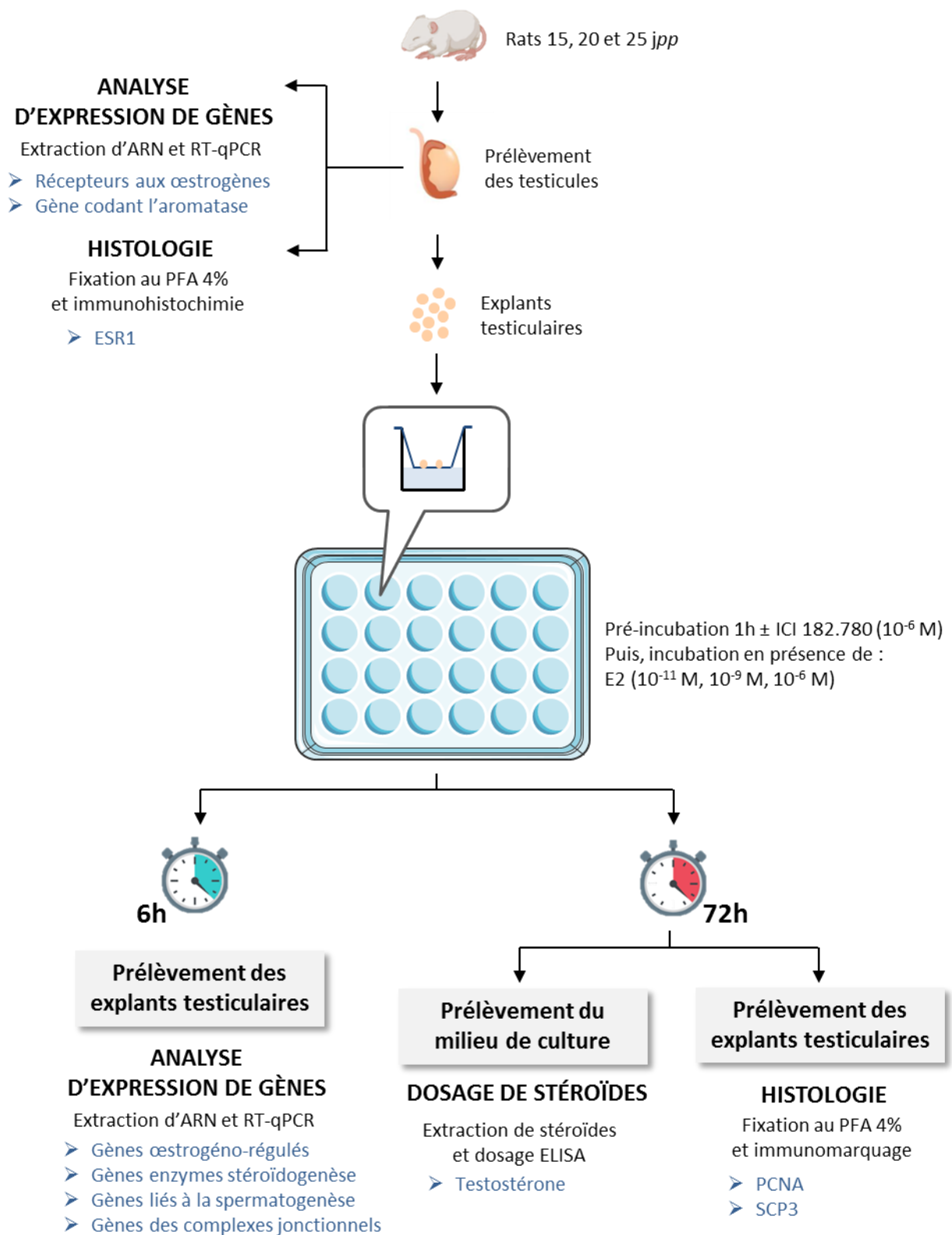


Figure 32 : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude ex vivo des effets de l'E2 sur le testicule de rat prépubère

## Effects of 17 $\beta$ -estradiol in prepubertal rat testis

M. Rouge\*, M. Drouault\*, V. Hanoux, C. Delalande, H. Bouraïma-Lelong

\* co-premier auteur

En préparation pour soumission à *Reproductive Toxicology*

### ❖ Contexte de l'étude

Les précédentes études *in vivo* menées dans notre laboratoire ont permis d'étudier l'effet d'une exposition à une faible dose de 17- $\beta$ -œstradiol (E2) (20  $\mu$ g/kg de poids corporel/jour) sur le testicule chez le rat. Ces travaux mettent en évidence qu'une exposition en période prépubère (15 à 30 *jpp*) retarde la mise en place de la première vague de spermatogenèse chez les animaux immatures (Brouard et al., 2016). Cependant, lorsque les effets de l'exposition prépubère (15 à 30 *jpp*) sont analysés chez l'adulte (75 *jpp*) ou que l'exposition a lieu en période pubère (60 à 75 *jpp*), cette faible dose d'E2 n'induit pas de modification de l'architecture testiculaire ni d'altération de la spermatogenèse chez les animaux adultes (**Article 1**). Ainsi, en accord avec des travaux menés par d'autres groupes de recherche (Li et al., 2016; Walczak-Jędrzejowska et al., 2013), ces études *in vivo* soulignent que la période prépubère représente une fenêtre de sensibilité accrue à un apport exogène d'E2.

### ❖ Dispositif expérimental

Afin d'étudier plus en détail l'effet et les mécanismes d'action de l'E2 dans le testicule de rat prépubère, une approche *ex vivo* a été conduite. Un modèle de culture organotypique d'explants testiculaires de rats prépubères âgés de 15, 20 et 25 *jpp* a été développé. Ces différents âges sont compris dans la fenêtre d'exposition étudiée par notre approche *in vivo* et correspondent à des stades déterminants de la progression de la spermatogenèse (Malkov et al., 1998 ; Picut et al., 2015) :

- **15 *jpp*** : mise en place de la BHT, initiation de la méiose
- **20 *jpp*** : la BHT est assemblée, apparition des spermatocytes pachytènes
- **25 *jpp*** : la BHT est fonctionnelle, apparition des premières spermatides rondes

Le dispositif expérimental mis en place est illustré en [figure 32](#). Après l'euthanasie des animaux, les testicules ont été immédiatement prélevés. Un organe a été utilisé pour l'analyse de l'expression génique des différents ERs (ESR1, ESR2, GPER) et de l'aromatase par RT-qPCR, ainsi que l'analyse de l'expression protéique d'ESR1 par immunohistochimie. Le testicule contralatéral a été disséqué en pièces d'environ 2 mm<sup>3</sup>. Ces explants testiculaires ont été cultivés sur insert en présence d'un milieu de culture dépourvu de stéroïdes. Afin d'étudier les mécanismes d'action impliqués, une pré-



incubation d'une heure en présence, ou non, d'ICI 182.780 (antagoniste des ERs nucléaires) ( $10^{-6}$  M) a été effectuée. Les explants testiculaires ont ensuite été exposés à des concentrations croissantes d'E2 ( $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-6}$  M) pendant 6h ou 72h. A l'issue de l'exposition, différents paramètres ont été analysés :

- incubation de **6h** : les explants testiculaires sont prélevés pour l'analyse de l'expression de différents gènes d'intérêt (gènes œstrogéno-régulés, gènes des enzymes de la stéroïdogénèse, gènes liés à la progression de la spermatogénèse, gènes des complexes jonctionnels impliqués dans la formation de la BHT) par RT-qPCR
- incubation de **72h** : les explants sont fixés au paraformaldéhyde (PFA 4%) pour des analyses histologiques (immuno-marquage de marqueurs de la prolifération cellulaire, PCNA, et de la méiose, SCP3), et le milieu de culture est prélevé pour le dosage de la testostérone sécrétée par les explants

#### ❖ Résultats majeurs de l'étude

- L'E2 ( $10^{-11}$  à  $10^{-6}$  M) augmente l'expression des gènes œstrogéno-régulés dans les explants testiculaires de rats de 20 et 25 *jpp*, mais pas de 15 *jpp*.
- L'E2 ( $10^{-11}$  à  $10^{-6}$  M) augmente l'expression génique des enzymes de la stéroïdogénèse dans les explants testiculaires de rats de 20 *jpp*, mais diminue leur expression dans ceux de rats de 25 *jpp*.
- L'E2 ( $10^{-11}$  à  $10^{-6}$  M) augmente l'expression des gènes codants pour les complexes jonctionnels impliqués dans la formation de la BHT dans les explants testiculaires de rats de 20 *jpp*, mais n'a que peu d'impact sur ce paramètre dans ceux de rats de 25 *jpp*.
- Dans les explants testiculaires de rat de 20 *jpp*, l'E2 ( $10^{-11}$  à  $10^{-6}$  M) augmente l'expression des gènes liés à la progression de la spermatogénèse ainsi que l'expression protéique de SCP3, et diminue l'expression protéique de PCNA
- Dans les explants testiculaires de rat de 25 *jpp*, l'E2 ( $10^{-11}$  M) diminue l'expression protéique de SCP3, l'E2 ( $10^{-9}$  M) n'a pas d'effet sur ce paramètre, et l'E2 ( $10^{-6}$  M) augmente l'expression protéique de SCP3

#### ❖ Conclusion et perspectives

Un apport exogène d'E2 n'a pas d'effet dans les explants testiculaires de rats de 15 *jpp* mais exerce des effets différentiels dans les explants testiculaires de rats de 20 et 25 *jpp* en fonction de la période ou de la concentration considérée.





## Effects of 17 $\beta$ -estradiol in prepubertal rat testis

M. Rouge<sup>a,\*</sup>, M. Drouault<sup>a,\*</sup>, V. Hanoux<sup>a</sup>, C. Delalande<sup>a</sup>, H. Bouraïma-Lelong<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Normandie Univ, UNICAEN, OeReCa, 14000 Caen, France

\* These authors contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to H. Bouraïma-Lelong, UNICAEN EA2608 OeReCa,  
Esplanade de la Paix, CS 14032, 14032 Caen cedex 5. Email: [christelle.delalande@unicaen.fr](mailto:christelle.delalande@unicaen.fr)

## **ABSTRACT**

Although it is well established that testis produces estrogens, their precise role in the male gonad is not fully understood, particularly during the prepubertal period. In a previous *in vivo* study, we demonstrated that an exposure of prepubertal rats (15-30 *dpp*) to 17 $\beta$ -estradiol (E2) delays spermatogenesis' establishment. In order to characterize these effects of E2 during the prepubertal period, we developed an organotypic culture model of testicular explants from prepubertal rats (15, 20 and 25 *dpp*) to assess the direct effects of E2 ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-6}$  M) on the immature testis. To determine the involvement of estrogen receptors (ERs) in these effects, a pre-treatment with the full antagonist of nuclear ERs (ICI 182.780;  $10^{-6}$  M) was performed. Histological analysis, gene expression and hormonal assay were conducted to investigate the effects of E2 on steroidogenesis- and spermatogenesis-related endpoints. Testicular explants from 15 *dpp* rats were unresponsive to E2 exposure. In testicular explants from 20 *dpp* rats, E2 stimulated steroidogenic enzyme genes expression, testosterone production and the meiosis process. On the contrary, in testicular explants from 25 *dpp* rats, E2 induced a decrease in the expression level of steroidogenic enzyme genes, without any effect on testosterone production. In addition, low concentration of E2 ( $10^{-11}$  M) inhibited the meiosis process while high concentration ( $10^{-6}$  M) stimulated it. These effects appeared to involve ESR1-dependant and -independent mechanisms of action. Overall, this *ex vivo* study demonstrated differential age- and concentration-related effects of E2 on the testis during the prepubertal period.

## **KEYWORDS**

Estradiol; prepubertal period; testis; spermatogenesis; steroidogenesis.

## 1. Introduction

Estrogens are steroids hormones involved in the development and the maintenance of various systems. In particular, numerous data evidenced some roles of estrogens in testis (Cooke et al., 2017). Aromatase (encoded by *Cyp19a1* gene), the enzymatic complex which catalyzes the irreversible conversion of androgens into estrogens is expressed in testicular cells (Carreau et al., 2006).

To exert their biological effects, estrogens bind to the classical nuclear estrogen receptors (ERs) ESR1 and ESR2. Classically, these receptors act as transcription factors, recruit co-factors and directly modulate the expression of target genes containing estrogen response elements (EREs) (Hewitt and Korach, 2018). In addition, the G-protein-coupled estrogen receptor (GPER, also known as GPR30) mediates rapid non-genomic effects by binding E2 (Chimento et al., 2020; Revankar et al., 2005). ERs are widely distributed in the male gonad. Indeed, ESR1 and ESR2 co-localize in spermatogonia, spermatocytes, spermatids as well as in somatic cells such as Sertoli and Leydig cells in adult rodents (Chimento et al., 2011; Fisher et al., 1997; Pelletier et al., 2000). In rats, GPER has also been detected in pachytene spermatocytes, round spermatids, Sertoli cells and Leydig cells (Chimento et al., 2011; Chimento et al., 2010a; Lucas et al., 2010; Vaucher et al., 2014). This widespread distribution of the ERs in the male gonad emphasizes the importance of estrogens in testicular functions.

The two main functions of the mammalian testis are spermatogenesis and steroidogenesis (Hermo et al., 2010). The establishment of these functions results from two developmental stages, taking place during the fetal life (prenatal) (Rouiller-Fabre et al., 2003) and the prepubertal period (postnatal) (Picut et al., 2015). Prenatal exposure to 17 $\beta$ -estradiol (E2) induces profound alterations such as the decrease in the total number of gonocytes in the seminiferous cords, as well as in the number of Sertoli and Leydig cells (Cupp and Skinner, 2001; Lassurquere, 2003).

The prepubertal period also appears as a period of estrogens sensitivity. This period is characterized by the maturation of Leydig and Sertoli cells, the establishment of the blood-testis barrier (BTB), and the onset of the first wave of spermatogenesis. In rats, the prepubertal period begins shortly after birth, with the appearance of the first spermatogonia at 5 days *post-partum* (*dpp*) (Malkov et al., 1998; Picut et al., 2015). Between 10-13 *dpp* the first adult Leydig cells appear with the differentiation of stem cells into precursors (Ye et al., 2017). Thereafter, Sertoli cells stop proliferating and the blood-testis barrier (BTB) starts to

assemble at 15 *dpp* (Mok et al., 2011). At the same time, initiation of meiosis takes place, with the appearance of leptotene spermatocytes. Then, zygotene and pachytene spermatocytes appear around 18 and 20 *dpp* respectively (Malkov et al., 1998; Picut et al., 2015). At 20 *dpp*, the BTB is formed by tight junctions, ectoplasmic specializations, desmosomes and gap junctions established between Sertoli cells themselves as well as between Sertoli cells and germ cells (Cheng and Mruk, 2012). The establishment of the BTB divides the seminiferous epithelium into two distinct compartments: the basal compartment where spermatogonia and primary spermatocytes reside, and an adluminal compartment where secondary spermatocytes and spermatids are located. The BTB is fully functional at 25 *dpp*, and provides a privileged microenvironment essential for the proper spermatogenesis (Mok et al., 2011). Round spermatids appear at this time and then progressively elongate to form spermatozoa. In parallel, Leydig cell progenitors proliferate and differentiate to form a population of immature Leydig cells. Subsequently, these immature cells undergo a single mitotic division to form mature adult Leydig cells (Ye et al., 2017). During the testicular development, the aromatase expression is dynamic and varies with the testicular maturation stage. Indeed, its expression decreases in Sertoli cells and increases in Leydig cells which become the main estrogen-producing cells in adulthood. In addition, aromatase is also expressed by germ cells (Bois et al., 2010; Carreau et al., 1999).

Several studies indicate that an exogenous supply in estrogens during the prepubertal period disrupts testicular development in immature animals (Steinberger and Duckett, 1965; Walczak-Jędrzejowska et al., 2013). In a previous *in vivo* study, we investigated the effect of prepubertal (15-30 *dpp*) exposure to E2 (20 µg/kg body weigh/day) in immature rats. At 30 *dpp*, E2 treatment induced a reduced testicular weight associated with a decrease in gene expression of a spermatocytes marker (*H1t*). In addition, a reduced number of seminiferous tubules with lumen was observed in E2-treated rats (Brouard et al., 2016). Taken together, these results indicate that E2 exposure delays spermatogenesis' establishment in prepubertal rats. However, the mechanisms involved in this effect remain to elucidate.

For this purpose, we developed an organotypic culture model of testicular explants obtained from 15, 20, and 25 *dpp* rats (*i.e.* ages included in the exposure window targeted in our previous *in vivo* study). This culture model has the advantage of preserving the testicular architecture with intact paracrine interactions. In addition, this model excludes cross-talk with the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and allows analysing the direct effects of estrogens on the testis. RT-qPCR, histological analyses and hormonal assays were performed

to investigate the effect of increasing concentration of E2 ( $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M and  $10^{-6}$  M) on Leydig cells and steroidogenesis, Sertoli cells and the BTB, and germ cells in rat testicular explants. The involvement of ESR1 and ESR2 in these effects was assessed using a full nuclear ER antagonist (ICI 182.780;  $10^{-6}$  M).

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Animals**

Nine to twelve male Wistar rats aged 15, 20 or 25 *dpp* were purchased from the University Centre of Biological Experimental Resources (CURB, Caen, France). Animals were euthanized by inhalation of CO<sub>2</sub> (4L/min for 2 min; 6L/min for 2 min and 9L/min for 2 min), and the testes were removed. Some of these testes were frozen (15 *dpp*, n=6; 20 *dpp*, n=9; 25 *dpp*, n=6) in order to determine the expression profiles of estrogen receptors and aromatase in the prepubertal testis, and the others were immediately processed for the organotypic culture.

### **2.2 Testes organotypic culture**

Rat testes were cleared of excess fat and connective tissue, and carefully cut with Westcott scissors into small pieces (approximately 2mm<sup>3</sup>). The wells of a 24-well plate (Falcon) were filled with 0,5 mL of culture medium (DMEM/Ham's F12 without phenol red (Gibco)) supplemented with 50 IU/mL penicillin (Sigma), 0.05 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) 0.25 µg/mL Amphotericin B (Sigma) and 2% of Serum Replacement 3 (Sigma-Aldrich)). Two fragments from the same testis were placed on a single culture insert with a PET membrane (pore size: 1µm; Sarstedt) at the interface between air and medium. A pre-treatment with or without  $10^{-6}$  M of ICI 182.780 (Sigma-Aldrich) was performed for 1 h, and testicular explants were then incubated with  $10^{-11}$  to  $10^{-6}$  M of E2 (Sigma-Aldrich) at 32°C in humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO<sub>2</sub> for 6 h (for real-time RT-PCR analyses) or 72 h (for immunofluorescence analyses and steroid assay). E2 and ICI 182.780 were dissolved in ethanol and extemporaneously diluted in the culture medium at the suitable concentrations. Three to four independent experiments were performed, each in biological triplicate.

At the end of the 6 h incubation, testicular explants were stored at -80°C for RNA extraction. At the end of the 72 h incubation, culture medium was collected and stored at -20°C for steroids assay. Testicular explants were fixed in 4% PFA, dehydrated in graded series of alcohol and then embedded in paraffin (ParaPlast Plus, Leica) for immunofluorescent staining.



### 2.3 RNA extraction

Total RNA were extracted from the testicular explants with NucleoZOL® reagent (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Tissues were crushed using a plastic pestle to facilitate lysis. Then, the samples were centrifuged for 15 min at 12000 g at room temperature. After centrifugation, the supernatant was collected, and an equal volume of isopropanol was added. A second 10 min centrifugation at 12000 g allowed to pellet the RNAs. The supernatant was removed and the RNAs undergone two washing steps with 75% ethanol before recovery in 20 µL of RNase-free water. The concentration and the purity of the RNAs were determined using Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). The RNAs quality was also verified by sample electrophoresis on 1.5% agarose.

### 2.4 Reverse transcription and quantitative PCR

250 ng of total RNAs treated with DNase I 1X (Promega) according to the manufacturer's instructions were reverse transcribed into cDNA for 60 min at 37°C with 100 IU of Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, 12 IU of RNasin®, 100 ng of random primers and 1 mM of dNTP (Promega) in a final volume of 20 µL. Then, the enzyme was inactivated by a 10 min incubation at 72°C. Two negative controls were carried out: a first in which the RNAs were replaced by RNase-free water and a second in which the enzyme was not added. cDNAs were stored at -20°C.

Real-time PCR was performed with C1000 thermal cycler CFX96 Real Time System (Biorad) on 5µL of diluted cDNA (1:10 in RNase free water) using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) and 0.40 µM of each primer (Table 1) in a final volume of 20µL. The negative control was realized by adding RNase-free water instead of cDNA. Amplification was carried out according to the following protocol: a first step at 95°C for 3 min, 40 cycles of 30 sec at 95°C, 1 min at 60°C. After amplification, a melting curve was performed to control the presence of a single amplicon: an increase in 0.5°C every 5 sec in order to go from 65°C to 95°C. PCR efficiency was determined for each set of primers. The relative expression of the different target genes was calculated using the  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  method with *Gapdh* gene as reference.

### 2.5 Hormonal Assays

The culture media were collected after 72 h of culture. The steroid hormones were extracted with dyethyl ether (5:1 ratio (v/v) solvent:sample). Testosterone levels were measured using ELISA kit following the manufacturer's instructions (Enzo Life Science; detection limit: 3.9 – 1000 pg/mL) (Human reactivity). The samples were assayed in duplicate.

## **2.6 Immunohistochemistry**

Tissues sections (5 µm thick) were obtained using a Jung RM2035 microtome (Leica) and mounted on glass slides (SuperFrost® Plus microscope slides, ThermoScientific). Sections were dewaxed with xylene and rehydrated through a graded series of ethanol, followed by blocking of endogenous peroxidase activity in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / PBS solution for 10 min. Then, antigen retrieval was performed by a 0.1 M sodium citrate buffer (pH 6) incubation in microwave oven at 450W for 10 min. To permeabilize sections, glass slides were incubated in 0.2% Triton / PBS for 20 min. Then, testicular sections were blocked with 3% BSA / PBS for 20 min. Subsequently, two immunodetection methods were performed depending on the type of analysis.

ESR1 immunodetection was performed by an indirect immunoperoxidase method. The slides were incubated with anti-ESR1 primary antibody (ESR1 [33] GTX22746 (GeneTex); 1:50 in 3% BSA/PBS) at 4°C overnight in a humidified chamber. After three washing in PBS, sections were then exposed to goat anti-mouse IgG HRP-linked secondary antibody (sc-2005, Santa Cruz; 1:200 in 3% BSA/PBS) for 1h30. At the end of the incubation, sections were washed in PBS. Positive signal is visualized by the diaminobenzidine chromogen reaction (Sigma-Aldrich, USA). After counterstaining with Mayer's hematoxylin, sections were dehydrated and mounted with Eukitt® (Sigma Aldrich). For negative control, the primary antibody was omitted.

Regarding PCNA and SCP3 immunodetection, the immunofluorescent method was used. The sections were incubated with anti-PCNA (PCNA PC-10, sc-56, Santa Cruz; 1:200 in 3% BSA/PBS) or anti-SCP3 (SCP3 D1, sc-74569, Santa Cruz; 1:50 in 3% BSA/PBS) primary antibody in a humidified chamber for 24h at 4°C. After 3 washing in PBS, the sections were incubated with an Alexa 633-labeled goat anti-mouse secondary antibody (A21050, Life technologies; 1:200 in 3% BSA/PBS) at room temperature for 1h. Negative control slides were prepared by omitting the primary antibodies. Slides were then mounted with antifade mounting medium containing DAPI (Vectashield) to visualize cell nuclei.

## **2.7 Images acquisition**

Whole slide images (WSI) of histological testis sections were digitized at 20× (PCNA and aromatase) or 40× (SCP3) using the VS120 slide scanner (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) equipped with DAPI and FITC filters.

## 2.8 Stereological analysis

Images processing was conducted with Qupath software (Bankhead et al., 2017) and Stardist (Schmidt et al., 2018). For each WSI interest, areas were manually delimited.

For the analysis of the proliferative marker (PCNA), all nuclei were detected on selected areas of the samples thank to Stardist. Then, for each nucleus, the mean intensity was computed on FITC channel. After selection of threshold, the proportion of positive stain nuclei per all detected nuclei on area was computed. The number of positive cells was expressed as the percentage of total cells counted.

For the analysis of the meiotic cell marker (SCP3) on selected area of the samples, the Point tool of QuPath was used. Each cell with SCP3 staining was pointed to allow to compute the density positive cells per unit area ( $\text{mm}^2$ ). The number of positive cells was expressed per unit area ( $\text{mm}^2$ ).

## 2.9 Statistical analyses

4 independents experiments were conducted on testicular explants from 9 animals for 15 *dpp*, 12 for 20 *dpp* and 9 animals for 25 *dpp*. All data were presented as mean  $\pm$  SEM. The statistical analyses were carried out with GraphPad Prism®. A *t*-test was performed in order to compare the different E2 concentrations to 1) the control condition and 2) the corresponding condition with ICI 182.780.

## 3. Results

### 3.1 Expression of estrogen receptors and *Cyp19a1* in prepubertal rat testis

The gene expression profile of *Cyp19a1*, *Esr1*, *Esr2* and *Gper* was investigated in the testis of 15, 20 and 25 *dpp* rats (Fig. 1). The mRNA level of *Cyp19a1* varied according to age (Fig. 1A). Indeed, *Cyp19a1* mRNA was not detected in the testis of rats aged 15 *dpp*, but was expressed in the testis of 20 and 25 *dpp* animals. Moreover, *Cyp19a1* mRNA expression increased more than 2.5-fold in rat testis between 20 and 25 *dpp*.

On the other hand, the mRNA expression of *Esr1* and *Esr2* remained constant during this period (Fig. 1B and C). However, a significant 2-fold increase in *Gper* mRNA expression was observed at 20 and 25 *dpp* compared to 15 *dpp* (Fig. 1D). Overall, *Esr1* was the major ER expressed in the prepubertal rat testis, with an expression 2- to 5-fold higher than that of *Gper*, and largely above that of *Esr2*, whose transcripts were barely detectable (data not

shown). However, ESR1 protein was not detected in the 15 *dpp* rat testis, while it was detected in 20 and 25 *dpp* rat testis (Fig. 2).

### 3.2 Relative expression of estrogens-responsive genes: model validation

An *ex vivo* culture model was developed for this study. In order to validate this model, the expression of genes (*Rb1* and *Vldlr*) known to be up-regulated by E2 in the adult testis (Balasinor et al., 2010; Zhou et al., 2011) was quantified by RT-qPCR after a 6h exposure (Fig. 3).

In testicular explants from 15 *dpp* rats mRNA expression of the two estrogens-responsive genes remained unchanged in presence of E2 ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) (Fig. 3). However, *Rb1* and *Vldlr* mRNA expression was significantly increased in testicular explants from 20 and 25 *dpp* rats exposed to E2 ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) compared to the control (Fig. 3). The effects were reversed by the full nuclear ER antagonist ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 3). Thus, our study then focused on testicular explants from 20 and 25 *dpp* rats, which were E2-responsive.

### 3.3 Effect of E2 on steroidogenic enzyme genes expression

In testicular explants from 20 *dpp* rats, E2 induced a significant increase in gene expression of the enzymes involved in the testosterone synthesis pathway (*Star*, *Cyp11a1*, *3 $\beta$ hsd*, *Cyp17a1* and *17 $\beta$ hsd*) (Fig. 4A-E). Indeed, the expression levels of *Star*, *Cyp17a1* and *17 $\beta$ hsd* mRNA were increased by E2 at all the tested concentrations, and this effect was greater when the highest concentration of E2 ( $10^{-6}$  M) was used (Fig. 4 A, D and E). Regarding *Cyp11a1* and *3 $\beta$ hsd*, an increase was observed with exposure to the lower concentrations of E2 ( $10^{-11}$  or  $10^{-9}$  M) (Fig. 4B and C).

The opposite effect of E2 was observed in testicular explants from 25 *dpp* rats. *3 $\beta$ hsd*, *Cyp17a1* and *17 $\beta$ hsd* expression was significantly decreased by E2 at all the tested concentrations (Fig. 4C-E). *Star* mRNA expression was significantly decreased by  $10^{-9}$  M and  $10^{-6}$  M E2, and *Cyp11a1* mRNA expression was significantly decreased by the highest concentration of E2 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 4A and B).

In addition, *Cyp19a1* mRNA expression was significantly increased when the testicular explants from 20 and 25 *dpp* rats were exposed to E2 ( $10^{-11}$  and  $10^{-9}$  M at 20 *dpp*, and  $10^{-11}$  and  $10^{-6}$  M at 25 *dpp*) compared to the control (Fig. 4F).

For the testicular explants obtained from both ages, the effects of E2 observed on mRNA expression of the six steroidogenic enzyme genes were reversed by ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 4).

### 3.4 Effect of E2 on testosterone level

In order to confirm the E2-induced effects observed on steroidogenic enzyme genes expression, the testosterone level secreted in the culture medium by the testicular explants was measured after a 72 h exposure to  $10^{-9}$  M E2 (Fig. 5). The concentration of E2 was chosen based on the effects observed on the mRNA expression of the steroidogenic enzymes.

In testicular explants from 20 *dpp* rats, E2 ( $10^{-9}$  M) induced a 2.5-fold increase in testosterone level compared to the control, and this effect was reversed by ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 5). On the other hand, E2 ( $10^{-9}$  M) had no effect on the testosterone level secreted in the culture medium by the testicular explants from 25 *dpp* rats (Fig. 5).

### 3.5 Effect of E2 on Sertoli cells and junctional complex genes expression

In testicular explants from 20 *dpp* rats, E2 at all the tested concentrations induced a significant increase in the expression of *connexin-43* and *occludin* mRNAs compared to the control (Fig. 6B and D). Moreover, a significant increase in *N-cadherin* mRNA expression was also observed at  $10^{-9}$  and  $10^{-6}$  M E2 (Fig. 6 C). On the other hand, E2 ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) had no effect on the *vimentin* mRNA level (Fig. 6A). E2-induced effects on the expression *N-cadherin* and *occludin* mRNA were only reversed for  $10^{-9}$  M E2 after pre-treatment with the antagonist ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 6C and D). In addition, ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) alone induced a significant increase in the mRNA level of *connexin-43* (Fig 6B).

In testicular explants from 25 *dpp* rats, *connexin-43* and *N-cadherin* mRNA levels were slightly decreased by E2 at  $10^{-9}$  M and  $10^{-6}$  M respectively, and these effects were not reversed by ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) pre-treatment (Fig. 6B and C). E2 ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) had no effect on the *vimentin* and *occludin* mRNA expression (Fig. 6A and D).

### 3.6 Effect of E2 on expression of germ cells markers

In testicular explants from 20 *dpp* rats, E2 increased the gene expression of *Hlt* (spermatocyte marker), *Hsf2* and *Ovol1* (two transcription factors specific to spermatocytes and spermatids) compared to the control (Fig. 7). These effects were observed at all E2 concentrations for *Hsf2* (Fig. 7B), at  $10^{-11}$  M and  $10^{-9}$  M E2 for *Hlt* (Fig. 7A), and at  $10^{-9}$  M and  $10^{-6}$  M E2 for *Ovol1* (Fig. 7C), and were reversed by ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) pre-treatment. It should be noted that ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) induced a significant decrease in the expression of *Hlt* in basal condition (Fig. 7A).

In contrast, the effect of E2 on these parameters in testicular explants from 25 *dpp* rat was much more limited. Indeed, the only effect observed was a decrease in the mRNA level of

*Htt* after an exposure to  $10^{-6}$  M E2 (Fig. 7A). This effect was reversed by ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) pre-treatment.

### 3.7 Immunofluorescent staining of proliferation and meiosis markers

In testicular explants from 20 *dpp* rats, E2 at all the tested concentrations significantly decreased the number of PCNA-positive cells compared to the control (Fig. 8A). The effects induced by  $10^{-11}$  and  $10^{-9}$  M E2 were reversed by ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) pre-treatment. On the other hand, E2 ( $10^{-11}$  M and  $10^{-9}$  M) induced a significant increase in the number of SCP3-positive cells, and these effects were reversed by ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) pre-treatment (Fig. 8B).

In testicular explants from 25 *dpp* rats, E2 ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) had no effect on the number of PCNA-positive cells (Fig. 8A). In contrast, the number of SCP3-positive cells was reduced by 50% with  $10^{-11}$  M E2 and was increased by 40% with  $10^{-6}$  M E2 (Fig. 8B). ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) pre-treatment alone or in combination with E2 ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  or  $10^{-6}$  M) induced an increase in the number of SCP3-positive cells compared to the condition without antagonist (Fig. 8B).

## 4. Discussion

An *in vivo* study conducted by our team has previously demonstrated that an exposure of prepubertal rats (15 to 30 *dpp*) to E2 appeared to delay spermatogenesis' establishment due to impaired spermatocyte and spermatid formation (Brouard et al., 2016). In order to get a better understanding of estrogen effects observed *in vivo*, an organotypic culture model of testicular explants from prepubertal rats was designed to assess the direct effects of E2 on both germ and somatic cells. Testicular explants from rats aged 15, 20 and 25 *dpp* were used in order to cover the exposure window targeted in our previous *in vivo* study. This *ex vivo* approach refined the results of our previous work by demonstrating differential effects of E2 on steroidogenesis- and spermatogenesis-related endpoints during the prepubertal period in rats.

Surprisingly, testicular explants from 15 *dpp* rats were unresponsive to exogenous E2 treatment. Indeed, mRNA expression of estrogen-responsive genes was not modified by E2, regardless of the concentration used. Although mRNA of the three ERs were detected, the ESR1 protein was not detected in the testis of 15 *dpp* rats. This could explain the lack of E2-responsiveness at this age. However, a study showed that the ESR1 protein was expressed in Sertoli cells and in some Leydig and peritubular cells in 15 *dpp* rat testis (Lucas et al., 2008). Our results suggest that the E2-induced effects observed in our *in vivo* study at 30 *dpp* in rats

exposed from 15 to 30 *dpp* to E2 probably result from events occurring later in the prepubertal period.

In testicular explants from 20 *dpp* rats, E2 induced an increase in the expression of steroidogenic enzymes genes, which was associated with an increase in the testosterone level measured in the culture media. To our knowledge, a stimulatory effect of E2 on steroidogenesis has never been demonstrated. However, an *ex vivo* approach showed that adult mice testicular explants treated with tamoxifen (nuclear estrogen receptor antagonist) exhibited a significant decrease in the steroidogenic proteins CYP11A1, StAR and Aromatase. This was accompanied by a fall in E2 and testosterone production (Verma and Krishna, 2017). Our results, supported by Verma's study, suggest a direct stimulatory effect of E2 on Leydig cells in the testis of 20 *dpp* rats. These effects were reversed by ICI 182.780, indicating that E2-induced stimulation of steroidogenesis is mediated through nuclear ER.

However, further investigation is needed in order to provide a proper explanation for the opposite effect of E2 on steroidogenesis observed in testicular explants from 25 *dpp* rats. It can be assumed that these differential effects on steroidogenesis are due to difference in E2-responsiveness depending on the differentiation state of Leydig cells. Thus, this age-related differential effect may reflect a change in cell population between 20 and 25 *dpp*. Indeed, from 20 *dpp*, progenitors start to gradually transform into immature Leydig cells (Benton et al., 1995; Chen et al., 2009). In testicular explants from 25 *dpp* rats, E2 induced a significant decrease in the mRNA expression of enzymes involved in testosterone synthesis. However, an increase in *Cyp19a1* gene expression was observed without impacting the testosterone level secreted in the culture medium. Similar effects have been observed in transgenic mice overexpressing aromatase (AROM<sup>+</sup>). The high level of E2 synthesized by AROM<sup>+</sup> mice led to a reduced expression of *17βhsd*, *Cyp17a1* and *Star* genes compared to wild-type mice (Strauss et al., 2009). This result was observed despite a normal level of LH in the AROM<sup>+</sup> mice, thus suggesting that the downregulation of steroidogenic enzyme genes expression is mediated by a direct action of estrogens, as shown in our *ex vivo* study in testicular explants from 25 *dpp* rats. Since these effects were reversed by ICI 182.780, the nuclear ER seemed to be involved. In addition, the mice resulting from the mating between AROM<sup>+</sup> mice (overexpressing ESR1 (Fowler et al., 2000)) and ESR1KO mice exhibit mRNA expression of these steroidogenic enzymes like wild type mice, unlike mice resulting from the crossing with ESR2KO mice. This demonstrates that the effects observed on the steroidogenesis are mediated by ESR1 (Strauss et al., 2009).

Overall, our results indicate that E2 stimulated testosterone production in testicular explants from 20 dpp rats but has no effect on this parameter in testicular explants from 25 dpp rats. Our previous *in vivo* study showed that a continuous exposure to E2 from 15 to 30 dpp did not induce any variation in plasma testosterone level (Brouard et al., 2016). Taken together, our results from the *in vivo* and *ex vivo* studies indicate that the stimulatory effect of E2 on steroidogenesis observed in testicular explants from 20 dpp rats was either compensated *in vivo* between 20 and 30 dpp or subjected to feedback from the hypothalamic-pituitary complex *in vivo* that our model disregard.

The stimulatory effect of E2 on the gene expression of markers indicative of spermatogenesis (*Hlt*, *Hsf2* and *Ovol1*) reported here in testicular explants from 20 dpp rats suggest a stimulation of the meiosis process. This result is further confirmed by the E2-induced increase in the number of meiotic cells (SCP3-positive) associated to the decrease in the number of proliferative cells (PCNA-positive). Similar results have also been described in other works. A first study reported an increase in premeiotic germ cells, especially spermatogonia, as well as a higher percentage of seminiferous tubules containing pachytene spermatocytes in immature rats exposed to estradiol benzoate (Kula, 1988). This study was extended by Ebling's study which showed that germ cell development can be induced by E2 (Ebling et al., 2000). Some studies attributed these stimulatory effects to the induction of FSH (Kula et al., 2001; Lim et al., 2008). However, since our *ex vivo* model allows disregarding the HPG axis, our results further indicate that E2 can have a direct effect on germ cells. Stimulatory effects of E2 on spermatogenesis observed in testicular explants from 20 dpp rats were reversed by ICI 182.780, demonstrating that these effects are mediated by nuclear estrogen receptors. As observed in our study and others, ESR1 predominates over ESR2 in rat testes from prepuberty to adulthood (Hutson et al., 2019; Tena-Sempere et al., 2000). Thus, we suggest that the effects of E2 are primarily mediated *via* ESR1 in testicular explants of 20 dpp, supported by the Verma's study which showed that administration of tamoxifen (nuclear estrogen receptors antagonist) alters the structural integrity of the seminiferous epithelium and blocks spermatogenesis (Verma and Krishna, 2017).

In testicular explants from 25 dpp rats, E2 had a limited effect on the gene expression of markers indicative of spermatogenesis. Indeed, only a slight decrease in mRNA expression of *Hlt* (spermatocyte marker) was induced by E2 ( $10^{-6}$  M). This effect was reversed by ICI 182.780 suggesting an involvement of the nuclear receptors. Moreover, E2 (all concentrations) had no effect on the number of proliferative cells (PCNA-positive). However,



the lowest concentration of E2 ( $10^{-11}$  M), induced a decrease in the number of meiotic cells (SCP3-positive). This result is in accordance with our previous *in vivo* study which demonstrated that E2 delayed the spermatogenesis' establishment in prepubertal rats exposed from 15 to 30 *dpp* (Brouard et al., 2016). Destructive effects of E2 on germ cells have been observed in adult rats by alteration of elongated spermatids inducing spermiation failure (D'Souza et al., 2005; Toyama et al., 2001; Upadhyay et al., 2011). Nonetheless, the intermediate concentration of E2 ( $10^{-9}$  M) had no effect on meiotic cells number, whereas the highest concentration of E2 ( $10^{-6}$  M) increased the number of meiotic cells, thus inducing an opposite effect to that observed at low concentration. Furthermore, after treatment with ICI 182.780 alone or in combination with E2 (all concentrations), the number of meiotic cells was significantly increased. Interestingly, ICI 182.780 has been described to be a GPER agonist (Thomas et al., 2005) and an increase in mRNA expression of cyclins A1 and B1 induced by ICI 182.780 has been reported in adult rat seminiferous tubules (Bois et al., 2012). Indeed, these cyclins are regulated via the ERK1/2 pathway induced by GPER activation in purified pachytene spermatocytes and round spermatids (Chimento et al., 2011; Chimento et al., 2010b). Cyclins, in association with Cyclin-dependent kinases (Cdks), are involved in the cell cycle progression and are essential for the spermatocyte entry into the meiotic process (Liu et al., 1998; Sweeney et al., 1996; Wolgemuth et al., 2004). Taken together, these results indicate a dose-related effect of E2 on the meiotic process in testicular explants from 25 *dpp* rats. This could be explained by the difference in relative affinity of E2 observed between the three ERs. Indeed, E2 has a similar affinity for ESR1 and ESR2 but a lower for GPER (Blair, 2000; Thomas et al., 2005). Thus, at low concentration, E2 could preferentially bind to ESR1/2 and induce meiosis inhibition, whereas at high concentration, nuclear receptors are probably saturated and E2 will activate GPER, consequently leading to the stimulation of the meiosis process. Further studies are needed to explore this hypothesis.

Overall, our *ex vivo* study suggests that E2 stimulates spermatogenesis progression in testicular explants from 20 *dpp* rats, whereas in those from 25 *dpp* animals, E2 could either inhibit or stimulate spermatogenesis progression depending on the concentration (low or high). Our previous *in vivo* study has shown that continuous exposure of prepubertal rats from 15 to 30 *dpp* to E2 induced a decrease in the expression of spermatocyte and spermatid markers. Our current *ex vivo* study indicates that the deleterious effects of E2 observed at 30 *dpp in vivo* result from events taking place at 25 *dpp* that outweighed the stimulatory effects

of E2 observed at 20 *dpp*. Thus, our *ex vivo* study highlighted differential age-related (20 or 25 *dpp*) effects of E2 on spermatogenesis.

The latter could be explained by the differential age-related effect on steroidogenesis. Indeed, in testicular explants from 20 *dpp* rats, E2 stimulates testosterone production. Since androgens also play an important role in the regulation of spermatogenesis (O'Donnell et al., 1994; Zhou et al., 2019) and facilitate the meiotic progression (Haywood et al., 2003; Zhou et al., 2019), this stimulatory effect of E2 on steroidogenesis could indirectly promote spermatogenesis progression. The stimulatory effects of E2 on spermatogenesis are associated with the increase in mRNA expression of genes encoding the proteins of the junctional complexes of Sertoli cells. However, these effects on the mRNA expression of genes encoding the junctional proteins of Sertoli cells, unlike those observed on germ cells, were not reversed by ICI 182,780 at 20 or 25 *dpp*. This suggests that E2 effects on Sertoli cells do not involve nuclear ERs, but rather GPER.

## 5. Conclusion

To conclude, this *ex vivo* approach conducted on testicular explants obtained from prepubertal rats allows us to clarify the direct effects and the mechanisms of action of E2 in the immature testis. An exogenous E2 treatment has differential effects on steroidogenesis- and spermatogenesis-related endpoints during the prepubertal period, depending on the age considered (15, 20 and 25 *dpp*) and/or the concentration used ( $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-6}$  M). These effects appeared to involve ESR1-dependant and -independent mechanisms of action. Therefore, further studies are needed, notably to clarify the role of GPER in these effects. Overall, this study raises concerns about the exposure to xenoestrogens. These endocrine disruptors exhibit an estrogenic activity and have been shown to alter the functions of various organs, including those of the male reproductive tract. Moreover, the prepubertal period appears as a window of increased sensitivity to such compounds. Therefore, following the same approach as that used in the current study, we investigated the effects of two widespread xenoestrogens on the prepubertal rat testis. The results of this study are reported in the companion paper (Drouault et al., to submit to *Reprod. Toxicol.*).

## Acknowledgments

The authors thank the “Carré International” (Normandie Univ, UNICAEN) for English editing. Funding: this work was supported by the French Ministry for Higher Education and Research. Maëva Drouault was supported by funding from the Région Normandie.

## References

- Balasinor, N.H., D’Souza, R., Nanaware, P., Idicula-Thomas, S., Kedia-Mokashi, N., He, Z., Dym, M., 2010. Effect of high intratesticular estrogen on global gene expression and testicular cell number in rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 72. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-72>
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 7, 16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Benton, L., Shan, L.-X., Hardy, M.P., 1995. Differentiation of adult Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 61–68. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00022-R](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00022-R)
- Blair, R.M., 2000. The Estrogen Receptor Relative Binding Affinities of 188 Natural and Xenochemicals: Structural Diversity of Ligands. *Toxicol. Sci.* 54, 138–153. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.138>
- Bois, C., Delalande, C., Bouraïma-Lelong, H., Durand, P., Carreau, S., 2012. 17 $\beta$ -Estradiol regulates cyclin A1 and cyclin B1 gene expression in adult rat seminiferous tubules. *J. Mol. Endocrinol.* 48, 89–97. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0105>
- Bois, C., Delalande, C., Nurmio, M., Parvinen, M., Zanatta, L., Toppari, J., Carreau, S., 2010. Age- and cell-related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. *J. Mol. Endocrinol.* 45, 147–159. <https://doi.org/10.1677/JME-10-0041>
- Brouard, V., Guénon, I., Bouraïma-Lelong, H., Delalande, C., 2016. Differential effects of bisphenol A and estradiol on rat spermatogenesis’ establishment. *Reprod. Toxicol.* 63, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.003>
- Carreau, S., Delalande, C., Silandre, D., Bourguiba, S., Lambard, S., 2006. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246, 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.021>
- Carreau, S., Genissel, C., Bilinska, B., Levallet, J., 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int. J. Androl.* 22, 211–223.
- Chen, H., Ge, R.-S., Zirkin, B.R., 2009. Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.01.023>
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2012. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacol. Rev.* 64, 16–64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>
- Chimento, A., De Luca, A., Nocito, M.C., Avena, P., La Padula, D., Zavaglia, L., Pezzi, V., 2020. Role of GPER-Mediated Signaling in Testicular Functions and Tumorigenesis. *Cells* 9, 2115. <https://doi.org/10.3390/cells9092115>
- Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Andò, S., Maggiolini, M., Carreau, S., Pezzi, V., 2010a. 17 $\beta$ -Estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER $\alpha$ . *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.035>
- Chimento, A., Sirianni, R., Zolea, F., Bois, C., Delalande, C., Andò, S., Maggiolini, M., Aquila, S., Carreau, S., Pezzi, V., 2011. Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax: Gper and ESR involvement in rat round spermatid maturation. *Int. J. Androl.* 34, 420–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01100.x>

- Cooke, P.S., Nanjappa, M.K., Ko, C., Prins, G.S., Hess, R.A., 2017. Estrogens in Male Physiology. *Physiol. Rev.* 97, 995–1043. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>
- Cupp, A.S., Skinner, M.K., 2001. Actions of the endocrine disruptor methoxychlor and its estrogenic metabolite on in vitro embryonic rat seminiferous cord formation and perinatal testis growth. *Reprod. Toxicol.* 15, 317–326. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(01\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(01)00124-1)
- D'Souza, R., Gill-Sharma, M.K., Pathak, S., Kedia, N., Kumar, R., Balasinor, N., 2005. Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 241, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.04.011>
- Ebling, F.J.P., Brooks, A.N., Cronin, A.S., Ford, H., Kerr, J.B., 2000. Estrogenic Induction of Spermatogenesis in the Hypogonadal Mouse 141, 9.
- Fisher, J.S., Millar, M.R., Majdic, G., Saunders, P.T.K., Fraser, H.M., Sharpe, R.M., 1997. Immunolocalisation of oestrogen receptor- $\alpha$  within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J. Endocrinol.* 153, 485–495. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1530485>
- Fowler, K.A., Gill, K., Kirma, N., Dillehay, D.L., Tekmal, R.R., 2000. Overexpression of Aromatase Leads to Development of Testicular Leydig Cell Tumors. *Am. J. Pathol.* 156, 347–353. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64736-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64736-0)
- Haywood, M., Spaliviero, J., Jimenez, M., King, N.J.C., Handelsman, D.J., Allan, C.M., 2003. Sertoli and Germ Cell Development in Hypogonadal (hpg) Mice Expressing Transgenic Follicle-Stimulating Hormone Alone or in Combination with Testosterone. *Endocrinology* 144, 509–517. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220710>
- Hewitt, S.C., Korach, K.S., 2018. Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocr. Rev.* 39, 664–675. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00087>
- Hutson, D.D., Gurralla, R., Ogola, B.O., Zimmerman, M.A., Mostany, R., Satou, R., Lindsey, S.H., 2019. Estrogen receptor profiles across tissues from male and female *Rattus norvegicus*. *Biol. Sex Differ.* 10, 4. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0219-9>
- Kula, K., 1988. Induction of Precocious Maturation of Spermatogenesis in Infant Rats by Human Menopausal Gonadotropin and Inhibition by Simultaneous Administration of Gonadotropins and Testosterone\*. *Endocrinology* 122, 34–39. <https://doi.org/10.1210/endo-122-1-34>
- Kula, K., Walczak-Jędrzejowska, R., Słowikowska-Hilczer, J., Oszukowska, E., 2001. Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178, 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00415-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00415-4)
- Lassarguere, J., 2003. Time- and Dose-Related Effects of Estradiol and Diethylstilbestrol on the Morphology and Function of the Fetal Rat Testis in Culture. *Toxicol. Sci.* 73, 160–169. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg065>
- Lim, P., Allan, C.M., Notini, A.J., Axell, A.-M., Spaliviero, J., Jimenez, M., Davey, R., McManus, J., MacLean, H.E., Zajac, J.D., Handelsman, D.J., 2008. Oestradiol-induced spermatogenesis requires a functional androgen receptor. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 861. <https://doi.org/10.1071/RD08144>
- Liu, D., Matzuk, M.M., Sung, W.K., Guo, Q., Wang, P., Wolgemuth, D.J., 1998. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat. Genet.* 20, 377–380. <https://doi.org/10.1038/3855>
- Lucas, T.F.G., Royer, C., Siu, E.R., Lazari, M.F.M., Porto, C.S., 2010. Expression and Signaling of G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER) in Rat Sertoli Cells. *Biol. Reprod.* 83, 307–317. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084160>
- Lucas, T.F.G., Siu, E.R., Esteves, C.A., Monteiro, H.P., Oliveira, C.A., Porto, C.S., Lazari, M.F.M., 2008. 17 $\beta$ -Estradiol Induces the Translocation of the Estrogen Receptors ESR1 and ESR2 to the Cell Membrane, MAPK3/1 Phosphorylation and Proliferation of Cultured Immature Rat Sertoli Cells. *Biol. Reprod.* 78, 101–114. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063909>
- Malkov, M., Fisher, Y., Don, J., 1998. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 59, 84–92. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.84>
- Mok, K.-W., Mruk, D.D., Lee, W.M., Cheng, C.Y., 2011. A study to assess the assembly of a functional blood-testis barrier in developing rat testes. *Spermatogenesis* 1, 270–280. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.3.17998>

- O'Donnell, L., McLachlan, R.I., Wreford, N.G., Robertson, D.M., 1994. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. 7.
- Pelletier, G., Labrie, C., Labrie, F., 2000. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.* 165, 359–370.
- Picut, C.A., Remick, A.K., de Rijk, E.P.C.T., Simons, M.L., Stump, D.G., Parker, G.A., 2015. Postnatal Development of the Testis in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Toxicol. Pathol.* 43, 326–342. <https://doi.org/10.1177/0192623314547279>
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2005. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science* 307, 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>
- Rouiller-Fabre, V., Levacher, C., Pairault, C., Racine, C., Moreau, E., Olasso, R., Livera, G., Migrenne, S., Delbes, G., Habert, R., 2003. Development of the foetal and neonatal testis. *Andrologia* 35, 79–83. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2003.00540.x>
- Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C., Myers, G., 2018. Cell Detection with Star-convex Polygons. *ArXiv180603535 Cs* 11071, 265–273. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00934-2\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00934-2_30)
- Steinberger, E., Duckett, G.E., 1965. Effect of estrogen or testosterone on initiation and maintenance of spermatogenesis in the rat. *Endocrinology* 76, 1184–1189.
- Strauss, L., Kallio, J., Desai, N., Pakarinen, P., Miettinen, T., Gylling, H., Albrecht, M., Mäkelä, S., Mayerhofer, A., Poutanen, M., 2009. Increased Exposure to Estrogens Disturbs Maturation, Steroidogenesis, and Cholesterol Homeostasis via Estrogen Receptor  $\alpha$  in Adult Mouse Leydig Cells. *Endocrinology* 150, 2865–2872. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1311>
- Tena-Sempere, M., Navarro, J., Pinilla, L., González, L.C., Huhtaniemi, I., Aguilar, E., 2000. Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor and mRNA expression in rat testis during postnatal development. *J. Endocrinol.* 13.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146, 624–632. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>
- Toyama, Y., Ohkawa, M., Oku, R., Maekawa, M., Yuasa, S., 2001. Neonatally Administered Diethylstilbestrol Retards the Development of the Blood-Testis Barrier in the Rat. *J. Androl.* 11.
- Upadhyay, R., D'Souza, R., Sonawane, S., Gaonkar, R., Pathak, S., Jhadav, A., Balasinor, N.H., 2011. Altered phosphorylation and distribution status of vimentin in rat seminiferous epithelium following 17 $\beta$ -estradiol treatment. *Histochem. Cell Biol.* 136, 543–555. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0856-5>
- Vaucher, L., Funaro, M.G., Mehta, A., Mielnik, A., Bolyakov, A., Prossnitz, E.R., Schlegel, P.N., Paduch, D.A., 2014. Activation of GPER-1 Estradiol Receptor Downregulates Production of Testosterone in Isolated Rat Leydig Cells and Adult Human Testis. *PLoS ONE* 9, e92425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092425>
- Verma, R., Krishna, A., 2017a. Effect of Letrozole, a selective aromatase inhibitor, on testicular activities in adult mice: Both in vivo and in vitro study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 241, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.02.028>
- Verma, R., Krishna, A., 2017b. Effect of tamoxifen on spermatogenesis and testicular steroidogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.092>
- Walczak-Jędrzejowska, R., Marchlewska, K., Oszukowska, E., Filipiak, E., Słowikowska-Hilczer, J., Kula, K., 2013. Estradiol and testosterone inhibit rat seminiferous tubule development in a hormone-specific way. *Reprod. Biol.* 13, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.07.005>
- Wolgemuth, D.J., Lele, K.M., Jobanputra, V., Salazar, G., 2004. The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells. *Int. J. Androl.* 27, 192–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2004.00480.x>
- Ye, L., Li, X., Li, L., Chen, H., Ge, R.-S., 2017. Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells. *Front. Physiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00430>

- Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q., He, Z., 2019. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 2681–2695. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9>
- Zhou, W., Bolden-Tiller, O.U., Shao, S.H., Weng, C.C., Shetty, G., AbuElhija, M., Pakarinen, P., Huhtaniemi, I., Momin, A.A., Wang, J., Stivers, D.N., Liu, Z., Meistrich, M.L., 2011. Estrogen-Regulated Genes in Rat Testes and Their Relationship to Recovery of Spermatogenesis after Irradiation. *Biol. Reprod.* 85, 823–833. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091611>

## FIGURES CAPTIONS

**Figure 1. Estrogen receptor (*Esr1*, *Esr2* and *Gper*) and *Cyp19a1* gene expression profiles in rat during the prepubertal period.** Total RNA was extracted from testes of rats aged 15, 20 and 25 dpp. *Cyp19a1* (A), *Esr1* (B), *Esr2* (C), and *Gper* (D) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *Gapdh* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 6 (15 dpp and 25 dpp), or 9 (20 dpp) animals. The mean value of the 15 dpp group was arbitrarily set at 1 for *Esr1*, *Esr2* and *Gper*. The mean value of the 20 dpp animals was arbitrarily set at 1 for *Cyp19a1*. Statistical significance was analysed by one-way ANOVA followed by a Bonferonni post-hoc test. Different lower-case letter indicate significant difference ( $p < 0.05$ ). ND, not detected.

**Figure 2. ESR1 immunolocalization in prepubertal rat testis according to age** Immunodetection of ESR1 in testes from 15, 20 and 25 dpp rats. Arrows indicate germ cells expressing ESR1 in the seminiferous tubule. The insert did not show immunostaining for ESR1 when the section was incubated with secondary antibody only. Scale bare, 100  $\mu$ m.

**Figure 3. Effects of E2 on estrogen-responsive genes expression in testicular explants from 15 dpp, 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 6h in presence of increasing concentrations of E2. After extraction of total RNA, *Rb1* (A) and *Vldlr* (B) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *Gapdh* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 9 (15 dpp and 25 dpp), or 12 (20 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the control. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the corresponding condition without ICI 182.780.

**Figure 4. Effects of E2 on steroidogenic enzyme genes expression in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 6h in presence of increasing concentrations of E2. After extraction of total RNA, *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *3 $\beta$ hsd* (C), *Cyp17a1* (D), *17 $\beta$ hsd* (E) and *Cyp19a1* (F) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *Gapdh* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 12 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the control. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the corresponding condition without ICI 182.780.

**Figure 5. Effects of E2 on testosterone level secreted by testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 72h in presence of E2 ( $10^{-9}$  M). This investigated condition was that resulting in the most important effects on steroidogenic enzyme gene expression. After steroid extraction, the levels of testosterone secreted in the culture medium by the testicular explants were measured by competitive ELISA. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 12 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \*\* $p < 0.01$  indicate significant difference compared to the control. # $p < 0.05$  indicate significant difference compared to the condition without ICI 182.780.

**Figure 6. Effects of E2 on junctional complex genes expression in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 6h in presence of increasing concentrations of E2. After extraction of total RNA, *vimentin* (A), *connexin-43* (B), *N-cadherin* (C) and *occludin* (D) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *Gapdh* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 12 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the control. # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the corresponding condition without ICI 182.780.

**Figure 7. Effects of E2 on germ cell genes expression in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 6h in presence of increasing concentrations of E2. After extraction of total RNA, *H1t* (A), *Hsf2* (B), and *Ovol1* (C) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *Gapdh* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 12 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the control. ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the corresponding condition without ICI 182.780.

**Figure 8. Effects of E2 on PCNA and SCP3 expression in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 72h in presence of increasing concentrations of E2. At the end of the incubation, testicular explants were processed for histological studies, and immunofluorescent staining was performed. **A.** PCNA (proliferation marker). Top: representative illustration of PCNA staining. The nuclear staining is localized in the cells at the periphery of the seminiferous tubules. Scale bare, 100  $\mu$ m. Bottom: quantitative analysis of PCNA staining data are presented as percentage of positive-cells staining relative to the total number of cells in the section. **B.** SCP3 (meiosis marker). Top: representative illustration of SCP3 staining. The perinuclear staining (arrowhead) in the large nucleus of cells is localized near to the centre of the seminiferous tubule. Scale bare, 50  $\mu$ m. Bottom: Quantitative analysis of SCP3 staining data are presented as percentage of positive staining per tissue unit area ( $\text{mm}^2$ ). Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 12 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the control. # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the corresponding condition without ICI 182.780.



Figure 1

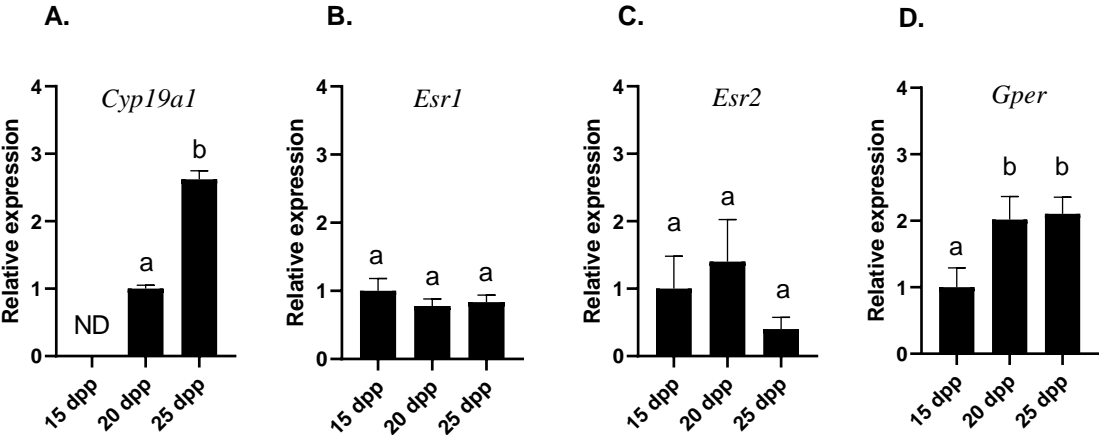
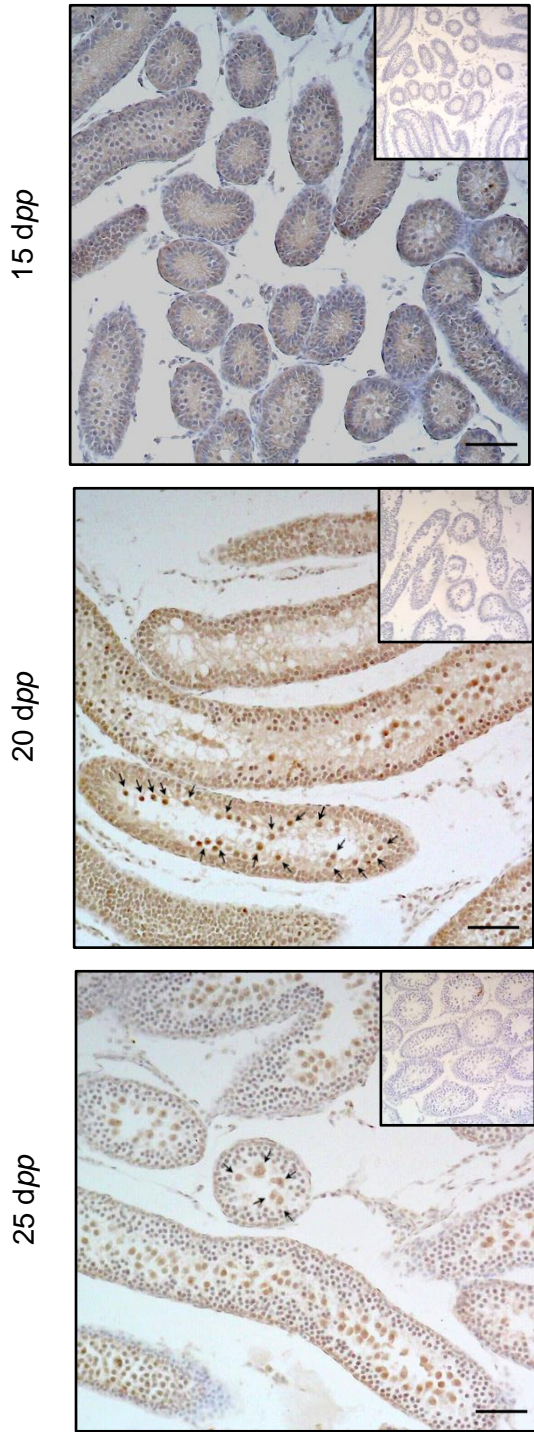


Figure 2



**Figure 3**

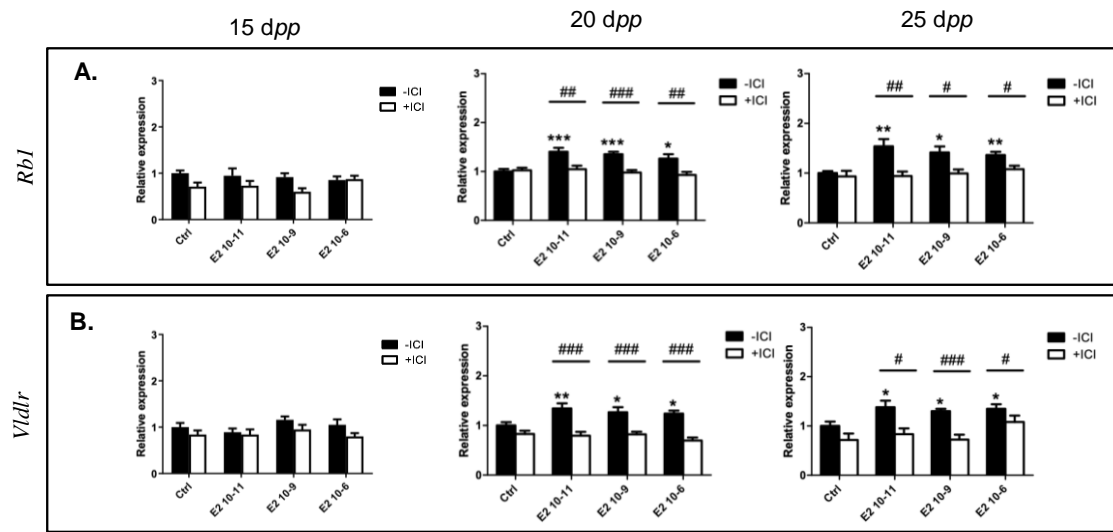
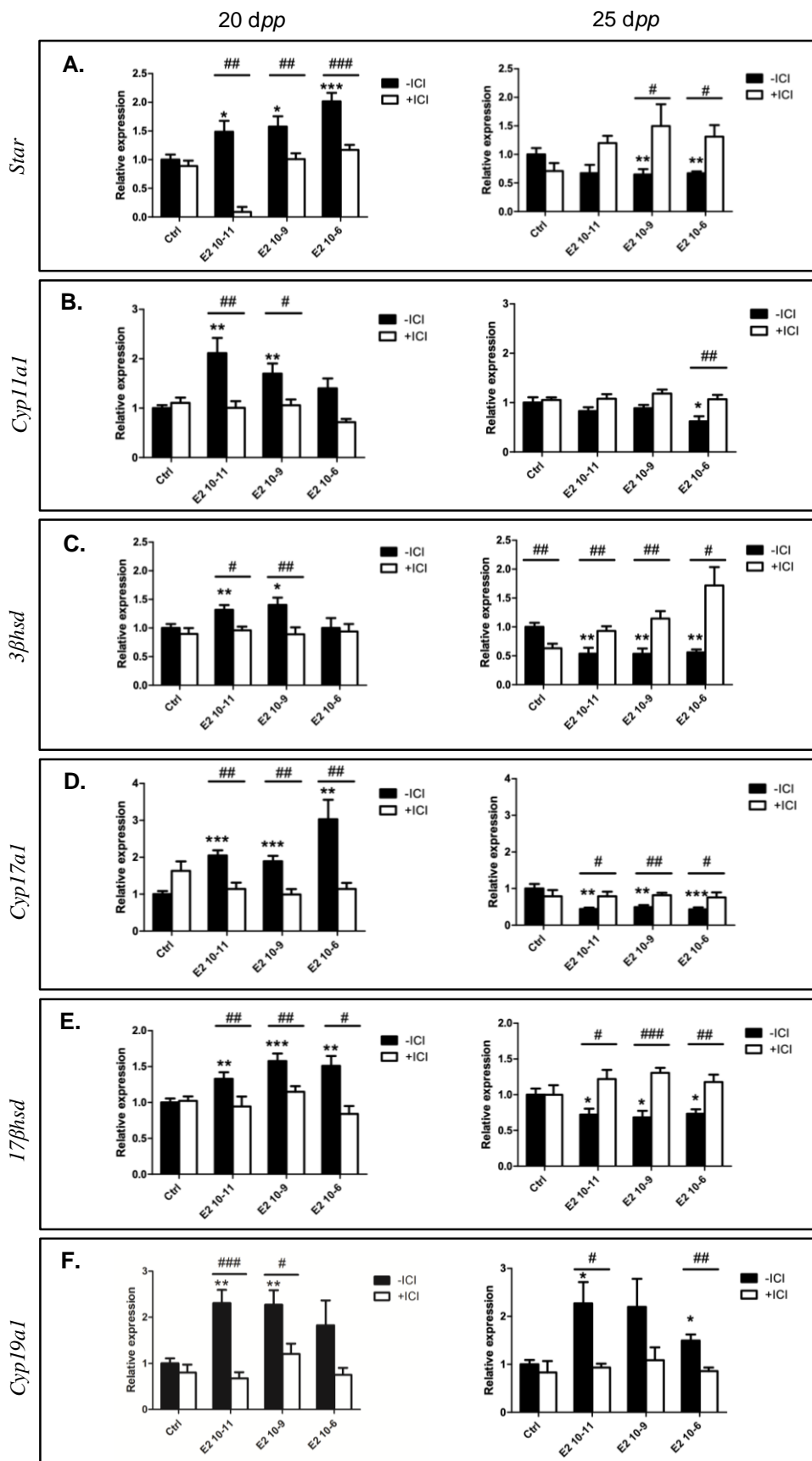
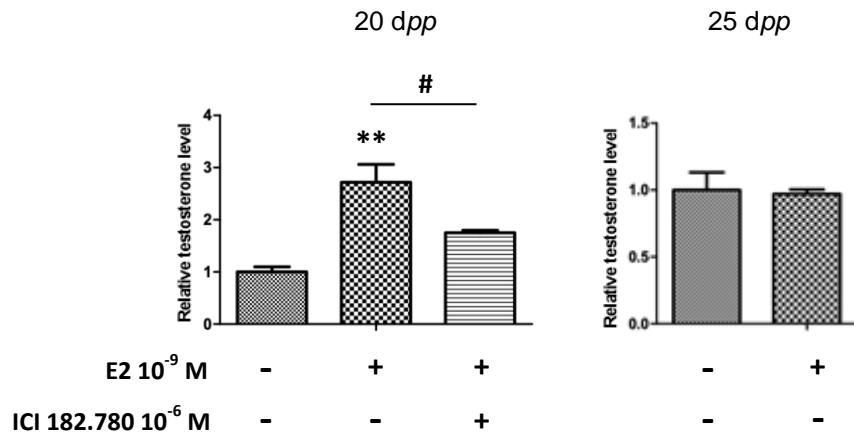


Figure 4



**Figure 5**



**Figure 6**

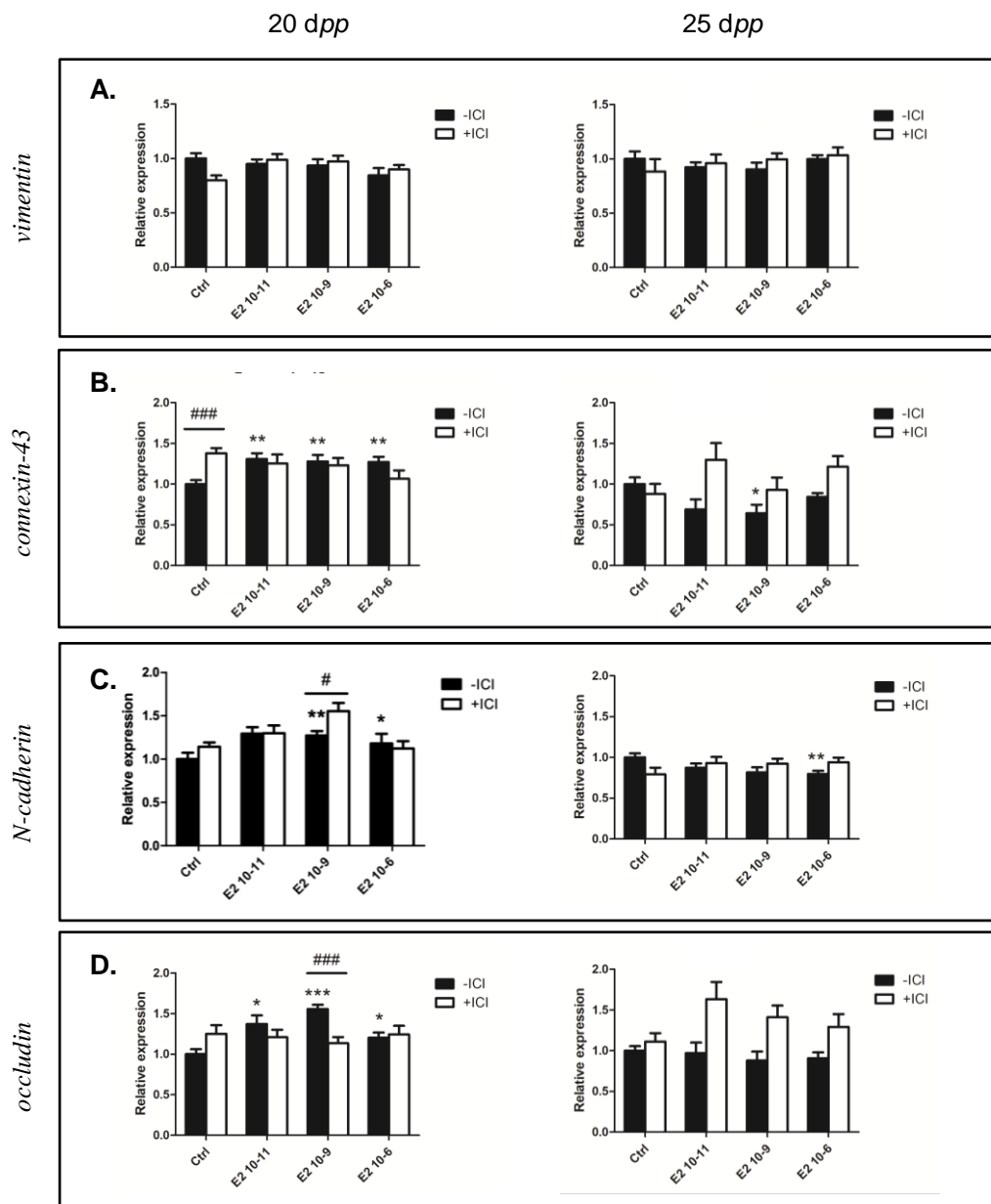


Figure 7

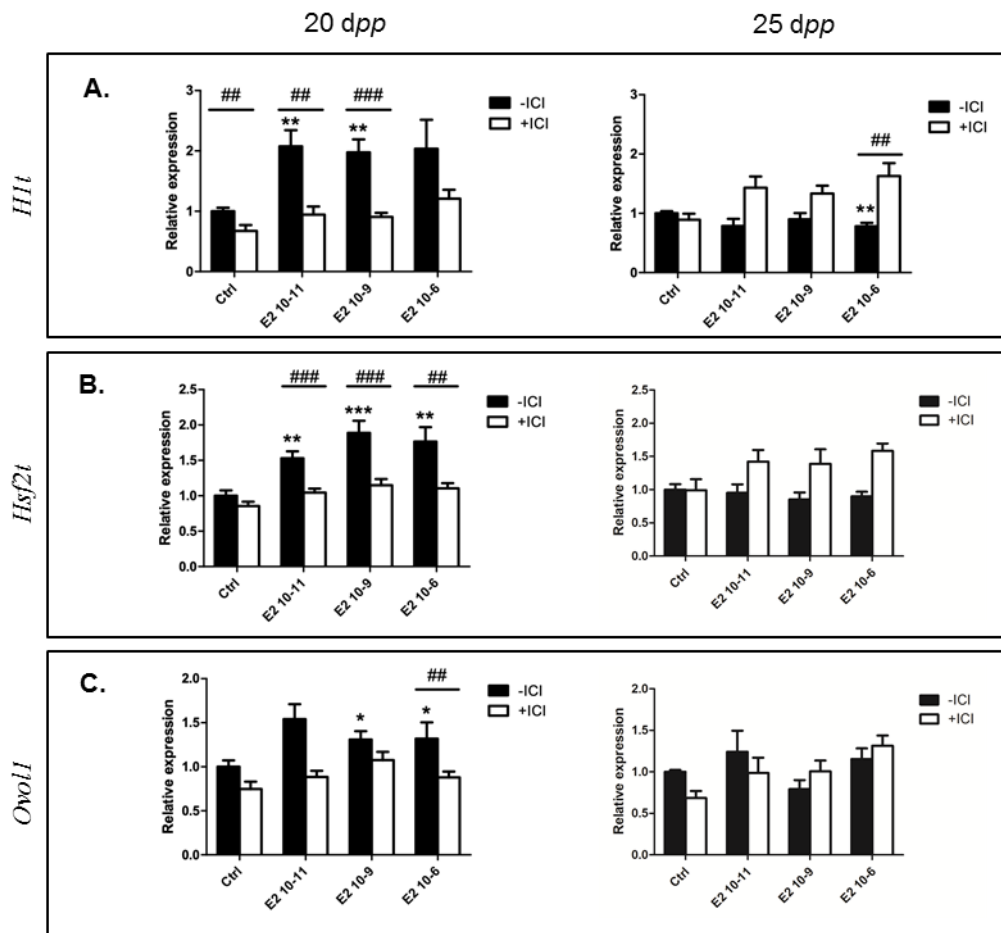
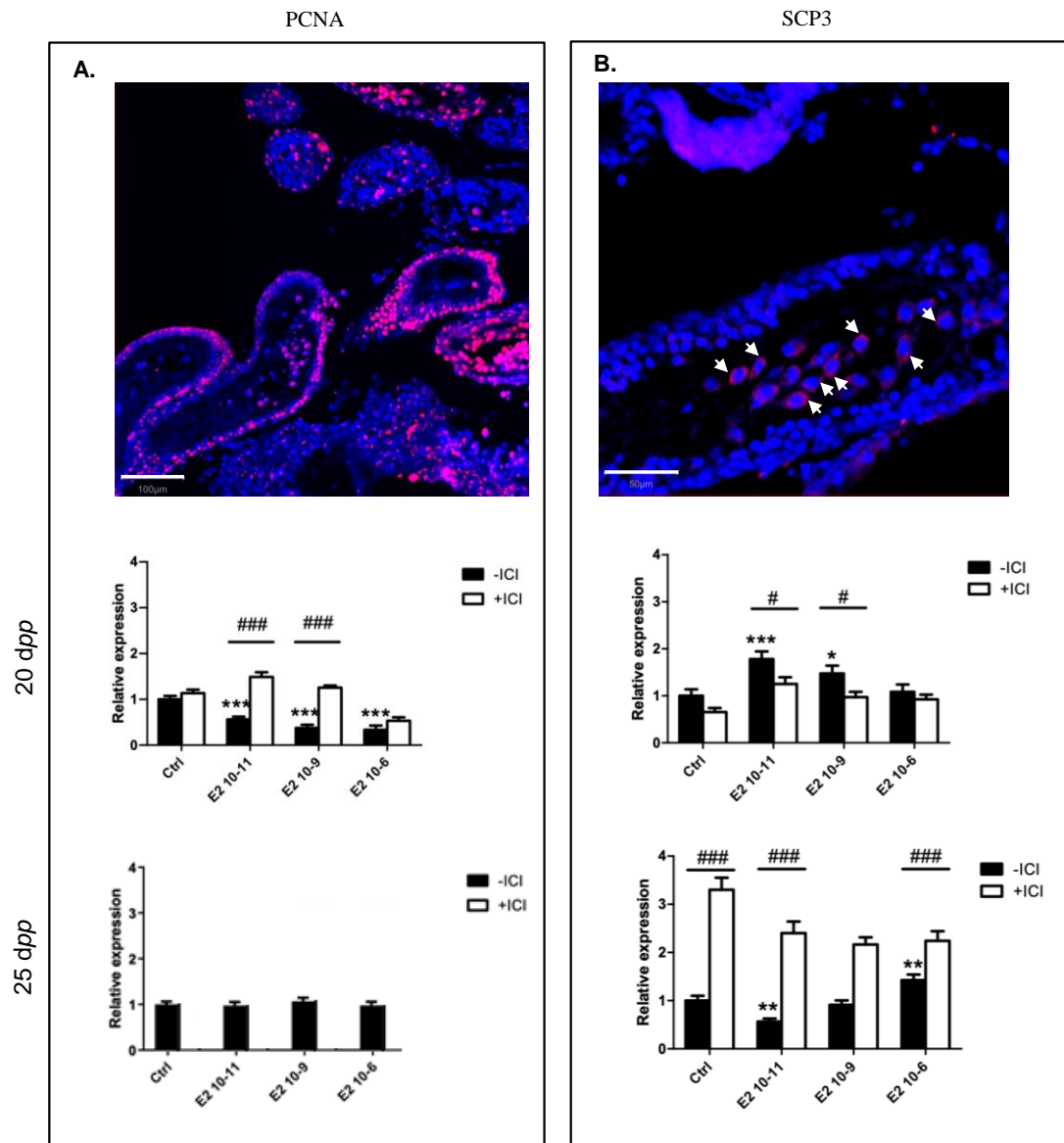


Figure 8



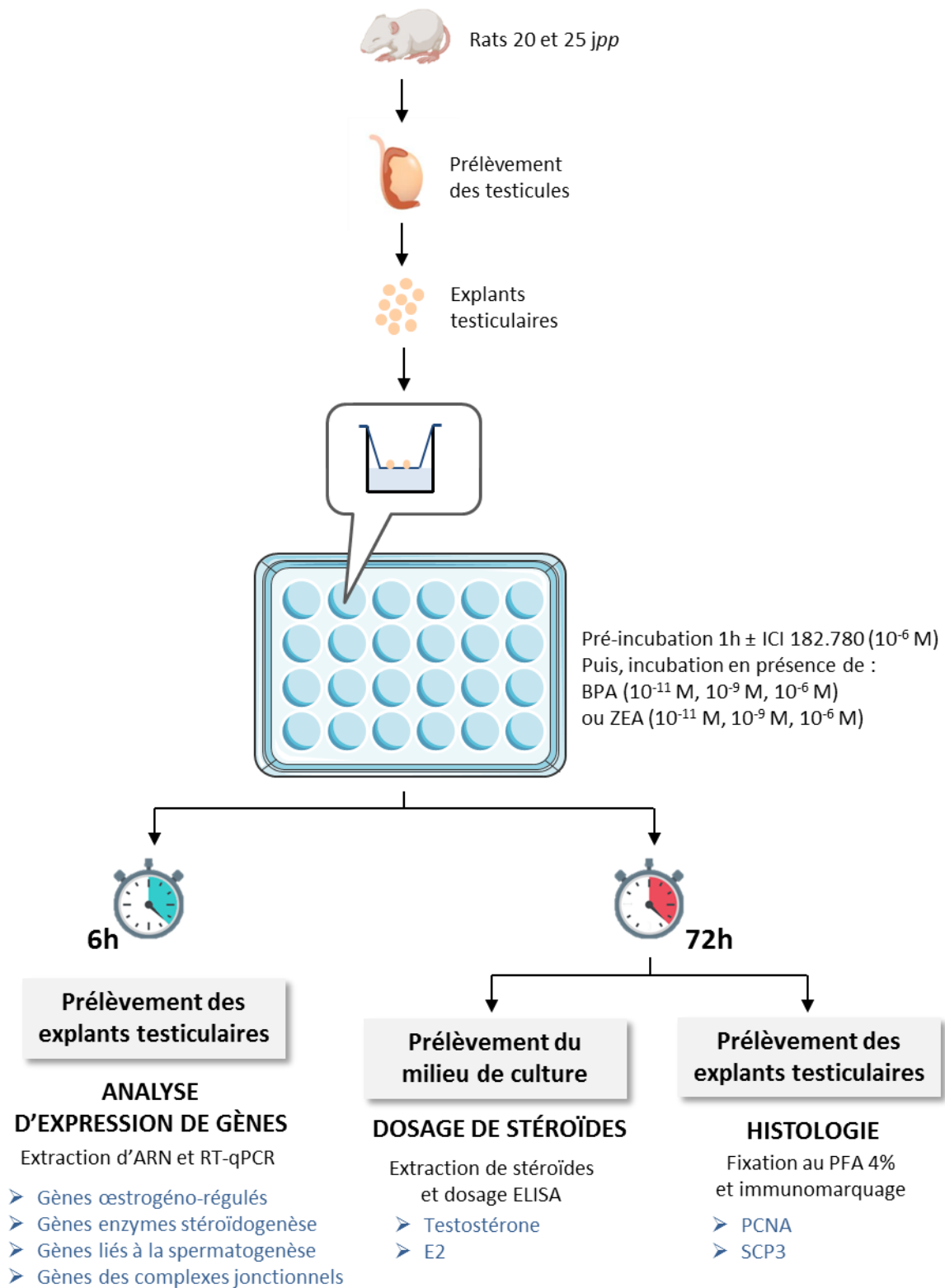


**Table 1. Primers used for RT-qPCR**

Gene	Gene Full name	GeneBank (accession code)	Primer (5'-3')	Amplicon length (bp)
<i>17βhsd</i>	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3	NM_054007.1	F: TTC-GTC-CCT-GGC-CTC-TGT-AT R: TAA-GGG-GTC-AGC-ACC-TGG-ATA	121
<i>3βhsd</i>	Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isomerase 1	NM_001007719	F: AGG-TCC-TGA-TGC-CCT-CTT-TT R: TGT-CAT-TGC-TGA-AGC-CTT-TG	159
<i>Cnx-43</i>	Connexin-43	NM_012567.2	F: TCC-TTG-GTG-TCT-CTC-GCT-TT R: GAG-CAG-CCA-TTG-AAG-TAG-GC	167
<i>Cyp11a1</i>	Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1	NM_017286.3	F: AAG-TAT-CCG-TGA-TGT-GGG R: TCA-TAC-AGT-GTC-GCC-TTT-TCT	127
<i>Cyp17a1</i>	Cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	NM_012753.3	F: TGG-CTT-TCC-TGG-TGC-ACA-ATC R: TGA-AAG-TTG-GTG-TTC-GGC-TGA-AG	90
<i>Cyp19a1</i>	Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1	NM_017085.3	F: CGT-CAT-GTT-GCT-TCT-CAT-CG R: TAC-CGC-AGG-CTC-TCG-TTA-AT	150
<i>Esr1</i>	Estrogen receptor 1	NM_012689.1	F: AAT-TCT-GAC-AAT-CGA-CGC-CAG R: GTG-CTT-CAA-CAT-TCT-CCC-TCC-TC	345
<i>Esr2</i>	Estrogen receptor 2	NM_001437	F: GAA-GCT-GAA-CCA-CCC-AAT-GT R: CAG-TCC-CAC-CAT-TAG-CAC-CT	210
<i>Gapdh</i>	Gluceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM-017008.4	F: AGT-GCC-AGC-CTC-GTC-TCA-TA R: GAC-TGT-GCC-GTT-GAA-CTT-GC	200
<i>Gper</i>	G protein coupled estrogen receptor	NM_001098201	F: TCT-ACC-TAG-GTC-CCG-TGT-GG R: GAT-GTT-CAG-AGA-GGT-CCC-CA	117
<i>H1t</i>	H1.6 linker histone, cluster member	NM_012579.1	F: GTA-TCA-AGC-TGG-CCC-TCA-AG R: TAG-CCT-TGG-CAG-AAG-CAG-AT	150
<i>Hsf2</i>	Heat shock transcription factor 2	NM_031694.2	F: TAA-ATG-GCT-CCT-CCA-ACC-TG R: CCA-ACA-GCT-CAA-CCT-TTC-CTA	99
<i>N-Cdh</i>	N-Cadherin	NM_031333.1	F: GAG-CCG-ATG-AAG-GAA-CCA-CA R: CCT-TTG-TAG-ACG-TCC-GCT-GT	81
<i>Ocln</i>	Occludin	NM_031329.3	F: AGT-GAC-TTT-GTG-TAA-CAC-TGG-TTC R: AAC-AGT-CCT-TTC-CAC-TCG-GG	129
<i>Ovol1</i>	Ovo-like transcriptional repressor 1	NM_001107512.1	F: GGG-GAG-ATC-TAC-GTG-CCA-G R: AAG-GCT-CAT-GTC-CAA-AGC-CA	114
<i>Rb1</i>	Retinoblastoma transcriptional corepressor 1	NM_017045.2	F: AGC-CCA-GCA-GTG-GGT-TAT-CT R: CAG-GAG-GCG-AGA-GCT-TGA-TA	171
<i>Star</i>	Steroidogenic acute regulatory protein	NM_031558.3	F: CAC-AGT-CAT-CAC-CCA-TGA-GC R: AGC-TCT-GAT-GAC-ACC-GCT-TT	165
<i>Vim</i>	Vimentin	NM_031140.1	F: AGA-TCG-ATG-TGG-ACG-TTT-CC R: CAC-CTG-TCT-CCG-GTA-TTC-GT	206
<i>Vldlr</i>	Very low density lipoprotein receptor	NM_013155.2	F: GAT-CCG-TTG-TCT-GGC-TTT-GT R: CAG-TAG-AGG-CGG-CTT-TTG-AC	158

F: forward primer; R: reverse primer





**Figure 33 : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude *ex vivo* des effets du BPA et de la ZEA sur le testicule de rat prépubère**

## Effects of bisphenol A and zearalenone in prepubertal rat testis

M. Drouault\*, M. Rouge\*, V. Hanoux, V. Seguin, D. Garon, H. Bouraïma-Lelong, C. Delalande

\* co-premier auteur

En préparation pour soumission à *Reproductive Toxicology*

### ❖ Contexte de l'étude

Nos études *in vivo* (Brouard et al., 2016 ; **Article 1**) et *ex vivo* (**Article 2**) ainsi que des travaux d'autres groupes de recherche (Walczak-Jędrzejowska et al., 2013 ; Li et al., 2016) ont mis en évidence que la période prépubère constitue une fenêtre de sensibilité particulière du testicule au 17 $\beta$ -œstradiol (E2). Ce constat soulève la question de l'impact d'expositions aux xénoestrogènes sur le testicule prépubère.

A cet égard, plusieurs études ont démontré les effets de xénoestrogènes tels que le bisphénol A (BPA) et la zéaralénone (ZEA) sur les fonctions testiculaires (Adegoke et al., 2020 ; Cariati et al., 2019 ; Peretz et al., 2014 ; Long et al., 2017 ; Zatecka et al., 2014). En particulier, nos études *in vivo* ont démontré qu'une exposition à une faible dose de BPA (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel/jour) au cours de la période prépubère (15 à 30 *jpp*) promeut la progression de la spermatogenèse et altère la BHT chez le rat immature (Brouard et al., 2016). Bien que nos résultats indiquent que ces événements ne semblent pas altérer la spermatogenèse à l'âge adulte (**Article 1**), d'autres études démontrent des effets délétères d'une exposition prépubère à de fortes doses de xénoestrogènes sur la fertilité de l'individu adulte (Doshi et al., 2010 ; Xie et al., 2016). Le nombre d'études documentant les effets de la ZEA sur le testicule est plus restreint. De plus, ces travaux concernent majoritairement des expositions à l'âge adulte, alors que le niveau d'exposition des enfants à la ZEA est parfois supérieur à celui des adultes (Leblanc et al., 2005). Ainsi, il apparaît pertinent d'évaluer l'impact et les mécanismes d'action du BPA et de la ZEA sur le testicule prépubère.

### ❖ Dispositif expérimental

Afin d'étudier les effets du BPA et de la ZEA sur la spermatogenèse et la stéroïdogénèse dans le testicule prépubère, l'approche *ex vivo* développée pour étudier ceux de l'E2 (**Article 2**) a été employée (**Figure 33**). Des explants testiculaires issus de rats de 20 et 25 *jpp* (âges auxquels nos travaux démontrent une sensibilité à un apport exogène d'E2 ; **Article 2**) ont été cultivés en présence de concentrations croissantes de BPA ou de ZEA ( $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-6}$  M) pendant 6h ou 72h. Afin de déterminer l'implication des ERs nucléaires dans les effets du BPA, ces explants ont été pré-incubés (1h) en présence, ou non, d'ICI 182.780 (antagoniste des ERs nucléaires) ( $10^{-6}$  M).

A l'issue de la culture, nous avons étudié les mêmes paramètres qu'après l'exposition à l'E2 : analyse de l'expression de gènes d'intérêt (gènes œstrogéno-régulés, gènes des enzymes de la stéroïdogénèse, gènes liés à la progression de la spermatogénèse, gènes des complexes jonctionnels) par RT-qPCR, analyses histologiques (immunomarquage de marqueurs de la prolifération cellulaire et de la méiose), et dosage ELISA des stéroïdes (testostérone et 17 $\beta$ -œstradiol) sécrétés par les explants dans le milieu de culture.

#### ❖ Résultats majeurs de l'étude

- Le BPA (à 20 *jpp*) et la ZEA (à 20 et 25 *jpp*) modulent l'expression génique des enzymes de la stéroïdogénèse et le niveau de stéroïdes sexuels (testostérone et 17 $\beta$ -œstradiol) sécrétés
- Le BPA (à 20 *jpp*) et la ZEA (à 25 *jpp*) augmentent l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans la formation de la BHT
- Le BPA (à 20 *jpp*) et la ZEA (à 25 *jpp*) augmentent l'expression des gènes impliqués dans la progression de la spermatogénèse
- Le BPA (à 20 *jpp*) et la ZEA (à 25 *jpp*) diminuent l'expression de PCNA (marqueur de prolifération) et augmentent l'expression protéique de SCP3 (marqueur de méiose)
- Le BPA (à 20 *jpp*) augmente l'expression des gènes œstrogéno-régulés, tandis que la ZEA n'a pas d'effet sur ce paramètre
- Les effets du BPA (à 20 *jpp*) sont abolis ou partiellement abolis en présence d'ICI 182.780, mais pas ceux de la ZEA

#### ❖ Conclusion de l'étude

Le BPA et la ZEA modulent la biosynthèse des stéroïdes sexuels et semblent promouvoir la progression de la spermatogénèse dans les explants testiculaires de rats prépubères. Ainsi, les effets de ces deux xœstrogènes dans le testicule immature apparaissent similaires. Cependant, le BPA n'exerce ses effets que dans les explants testiculaires issus de rats de 20 *jpp*, tandis que la ZEA stimule la stéroïdogénèse dans les explants testiculaires issus de rat de 20 et 25 *jpp* et n'affecte les autres paramètres étudiés que dans les explants testiculaires de rat de 25 *jpp*. Ainsi, cette étude *ex vivo* renforce l'idée que la période prépubère constitue une fenêtre de sensibilité aux xœstrogènes, et révèle l'existence de différentes fenêtres de sensibilité au BPA et à la ZEA. Cela suggère l'existence de différents mécanismes d'action du BPA et de la ZEA dans le testicule de rat prépubère. Notamment, les ERs nucléaires (en particulier ESR1, l'ER majoritaire dans le testicule de rat prépubère), semblent être impliqués dans les effets du BPA, mais pas ceux de la ZEA.





## Effects of bisphenol A and zearalenone in prepubertal rat testis

M. Drouault<sup>a,\*</sup>, M. Rouge<sup>a,\*</sup>, V. Hanoux<sup>a</sup>, V. Seguin<sup>b</sup>, D. Garon<sup>b</sup>, H. Bouraïma-Lelong<sup>a</sup>, C. Delalande<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Normandie Univ, UNICAEN, OeReCa, 14000 Caen, France

<sup>b</sup> Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, 14000 Caen, France

\* These authors contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to C. Delalande, UNICAEN EA2608 OeReCa, Esplanade de la Paix, CS 14032, 14032 Caen cedex 5. Email: [christelle.delalande@unicaen.fr](mailto:christelle.delalande@unicaen.fr)



## **ABSTRACT**

Bisphenol A (BPA) and zearalenone (ZEA) are two widespread xenoestrogens, notably involved in male reproductive disorders. Although biomonitoring studies indicate an important exposure of children to BPA and ZEA, few studies investigated the effects of these compounds on the prepubertal testis, yet highly sensitive to endocrine disruptors such as xenoestrogens. Organotypic culture of testicular explants obtained from immature rats (20 and 25 *dpp*) was performed to assess the effects of BPA and ZEA ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  M) on endpoints related to steroidogenesis (steroidogenic enzymes gene expression and steroid level) and spermatogenesis (junctional complex genes and spermatogenesis-related genes expression, immunostaining of proliferation and meiosis markers) in the prepubertal testis. In order to investigate the involvement of the classical nuclear ER-mediated estrogen signaling in these effects, a pre-incubation with ICI 182.780 (pure antagonist of nuclear estrogen receptors) ( $10^{-6}$  M) was performed. BPA modulated both steroidogenesis- and spermatogenesis-related endpoints in testicular explants from 20 *dpp* animals, but had no effect in those from 25 *dpp* rats. Likewise, ZEA had a stimulatory effect on steroidogenesis in testicular explants from animals of both ages, and also modulated spermatogenesis-related endpoints in those of 25 *dpp* rats. Thus, BPA and ZEA had similar effects on the immature testis, but our study highlights different age-related pattern of sensitivity to each compound within the prepubertal period. Moreover, our results indicate that BPA's effects are likely to be mediated by nuclear ER, whereas those of ZEA seemed to involve other mechanisms.

## **KEYWORDS**

xenoestrogen; bisphenol A; zearalenone; testis; spermatogenesis; steroidogenesis.

## 1. Introduction

First emerging in the 90s (Colborn and Clement, 1992), the concept of endocrine disruption has now become a source of scientific, political and societal debate. Endocrine disruptors are exogenous compounds, which interfere with the endocrine system by mimicking, blocking or modifying the action or the synthesis of endogenous hormones (La Merrill et al., 2020), thereby altering the functions of various organs. Notably, the increase in male reproductive disorders and the consequent decrease in male fertility observed worldwide are thought to result from an increasing exposure to endocrine disruptors over the past few decades (Sharma et al., 2020; Skakkebaek et al., 2006). Xenoestrogens (*i.e.* endocrine disruptors exhibiting an estrogenic activity) are among the most common endocrine disruptors (Degen and Bolt, 2000) and are likely to be involved in this trend.

Bisphenol A (BPA) and zearalenone (ZEA) are two typical xenoestrogens that have long been identified as such. The former is a manmade compound, massively used by the plastic industry in polycarbonates and epoxy resins. Hence, BPA is found in a large variety of items from our everyday life such as food packaging (Peng et al., 2019), kid toys (Andaluri et al., 2018), thermal paper (Bernier and Vandenberg, 2017) or medical equipment (Bacle et al., 2019). Natural compounds such as ZEA could also exhibit estrogenic activity. This mycotoxin is produced by the secondary metabolism of fungi from the *Fusarium* genus, mainly *F. graminearum* and *F. culmorum* (Ezekiel et al., 2008). As the fungi responsible for its synthesis developed on cereal crops, ZEA contaminates the food chain and is found in cereals, products of animal origin and grain-based products (Ropejko and Twarużek, 2021).

The chemical structures of these so compounds allow their binding to the nuclear estrogen receptors (ER) ESR1 and ESR2, and trigger the classical genomic pathway of estrogen signaling, to a lower extent than 17 $\beta$ -estradiol (E2), the endogenous ligand of these receptors (Kuiper et al., 1998). In addition, they could exert their estrogenic activity through the activation of intracellular signaling cascades by binding to the G protein-coupled estrogen receptor (GPER, also known as GPR30), a transmembrane receptor involved in rapid non-genomic events (Thomas and Dong, 2006).

There are increasing evidences to suggest the involvement of BPA and ZEA in various pathological conditions, including altered behaviours, metabolic disorders, cardiovascular diseases, cancer and reproductive defects in female and male (Rai et al., 2019; Rubin, 2011). Studies investigating the effects of BPA and ZEA on the testis of adult animals reported a

negative impact of these compounds on spermatogenesis through induction of germ cells apoptosis, meiosis impairment, disruption of the blood-testis barrier (BTB) and alteration of steroidogenesis, thus leading to a decrease in number and motility of spermatozoa (Jee et al., 2010; C. Liu et al., 2014; Q. Liu et al., 2014; Liu et al., 2021; Zatecka et al., 2014).

The effects of these xenoestrogens on the testis have been mostly studied in adult animals. Yet, biomonitoring of human exposure to BPA and ZEA indicates a continuous exposure from fetal life to adulthood. Indeed, detectable levels of these compounds have been found in amniotic fluid and maternal milk (Dualde et al., 2019; Engel et al., 2006; Massart et al., 2016). Moreover, a study conducted on the French population indicates that the exposure of children (3-14 years) to ZEA is almost twice as high as that of adults (Leblanc et al., 2005). This is of particular concern as the prepubertal period is a critical developmental stage over which determining events for the adult fertility take place. In male, these events include maturation of Leydig and Sertoli cells, the establishment of the blood-testis barrier (BTB), and the onset of the first wave of spermatogenesis (Malkov et al., 1998; Picut et al., 2015). The complex progression from an immature into a sexually mature organism is finely regulated by numerous factors, including the sex steroid hormones testosterone and E2, suggesting that the prepubertal period could be highly sensitive to estrogenic compounds. Nonetheless, there is a lack of data addressing this issue.

A companion work to our study aimed to clarify the effect of an exogenous supply of E2 ( $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-6}$  M) on testicular explants obtained from prepubertal rats (15, 20 and 25 *dpp*). This study highlights different patterns of response to E2 exposure according to the specific time considered within the prepubertal period. Indeed, testicular explants obtained from 15 *dpp* rats were unresponsive to exogenous E2, whereas disruption of steroidogenesis- and spermatogenesis-related endpoints were observed in those obtained from 20 and 25 *dpp* animals (Rouge et al., to submit to *Reprod. Toxicol.*). Overall, these findings raise concerns about the important level of exposure of children to xenoestrogens, evidenced by biomonitoring studies of human exposure. Following the same approach as that used in the companion study, we assessed the effects of BPA and ZEA ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  M), on the immature testis of 20 and 25 *dpp* rats. These specific times were chosen based on the results obtained from the E2 exposure. In addition, this companion work established ER expression profile in testes of 20 and 25 *dpp* rats and indicated that ESR1 is the major ER expressed in rat prepubertal testes (Rouge et al., to submit to *Reprod. Toxicol.*). Therefore, in order to

investigate the involvement of ESR1 in the effects of BPA and ZEA in prepubertal rat testes, ICI 182.780 (a full antagonist of nuclear ER) was used in the current study.

We assessed the impact of BPA and ZEA treatments on 1) the expression of estrogen-responsive genes; 2) steroidogenesis, by analysing the expression of steroidogenic enzymes genes and measuring the level of sex steroid hormones secreted in the culture medium by the testicular explants; 3) the BTB, by assessing the expression of junctional complex genes; 4) spermatogenesis, by analysing the expression of spermatogenesis-related genes and quantifying the level of Proliferating cell nuclear antigen (PCNA; proliferation marker) and Synaptonemal complex protein 3 (SCP3; meiosis marker).

## **2. Material and methods**

### **2.1. Chemicals and reagents**

Phenol-red free DMEM/Ham's F12 was provided by Gibco. Serum replacement 3 (SR3), bisphenol A (BPA), zearalenone (ZEA), ICI 182.780, dimethyl sulfoxide (DMSO), paraformaldehyde (PFA), Triton X-100, bovine serum albumin (BSA) and RNase free water were obtained from Sigma-Aldrich. Ethanol, butan-1-ol, xylene and diethyl ether were purchased from Carlo Erba Reagents. Phosphate buffered saline (PBS) was obtained from PAN (Dutscher). For immunostaining, the primary antibodies PCNA (PC-10) mouse monoclonal antibody (sc-56) and SCP3 (D1) mouse monoclonal antibody (sc-74569) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Alexa Fluor™ A633 goat anti-mouse (A21050) secondary antibody from Life Technologies, and VECTASHIELD® Vibrance™ antifade mounting medium with DAPI (H-1800) from Vector Laboratories. RQ1 RNase-free DNase (DNase I), Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT), deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), random primers, ribonuclease inhibitor (RNasin®) and GoTaq qPCR Master Mix were provided by Promega. The primers used for qPCR were ordered to Eurogentec.

### **2.2. Animals, testicular explants processing and organotypic culture**

Prepubertal male Wistar rats (20 and 25 *dpp*) were obtained from the University Centre of Biological Experimental Resources (CURB, Caen, France). Animals were maintained in a 12:12h light:dark cycle, at constant temperature of  $22 \pm 1$  °C with an average humidity of 45%. 25-day-old rats were weaned at 21 *dpp*. The day of the experiment, animals were

euthanized by inhalation of CO<sub>2</sub>. Testes were immediately removed, cleared of excess fat and connective tissue and cut into small pieces of approximately 2 mm<sup>3</sup> using Westcott scissors.

Organotypic culture was performed on culture inserts with a PET membrane (pore size: 1µm, TC-insert for 24 well plate, Sarstedt). Two testicular explants obtained from the same testis were placed on an insert and cultured at the air/medium interface in a 24-well plate (Falcon). Each well contained 500 µL of steroid-free phenol red-free DMEM/Ham's F12 medium supplemented with 2% of Serum Replacement 3, antibiotics (penicillin, 50000 IU/L; streptomycin, 50 mg/L), and amphotericin B (0.25 mg/L). The tested compounds were dissolved in ethanol (ZEA and ICI 182.780) or DMSO (BPA) and extemporaneously diluted in the culture medium at suitable concentrations. A 1h pre-incubation in presence or absence of ICI 182.780 (10<sup>-6</sup> M) was performed, and testicular explants were then incubated with increasing concentrations of BPA or ZEA (10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-6</sup> M) for 6h or 72h, at 32°C in a 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The concentrations used are in the range of human detectable dosage. Serum BPA levels are around 0.2-20 ng/mL (*i.e.* 0.8-88 x 10<sup>-9</sup> M) in general population (Vandenberg et al., 2007). Moreover, urine BPA level reach 395 ng/mL (*i.e.* 1.37 x 10<sup>-6</sup> M) in China (Mao et al, 2004). Likewise, urine mean ZEA level is 6.70 ng/mL (*i.e.* 2.1 x 10<sup>-8</sup> M) in Spain (Carballo et al., 2021).

At the end of the 6h incubation, testicular explants were frozen at -80°C for RNA extraction. At the end of the 72h incubation, culture medium was collected and stored at -20°C for steroids assays. Testicular explants were fixed in 4% PFA dehydrated in increasing ethanol concentrations (70%, 96%, 100%) and butan-1-ol, and finally embedded in paraffin (ParaPlast Plus, Leica) for immunofluorescent staining.

### 2.3. Steroids extraction and quantification

Steroids were extracted from the culture medium by adding diethyl ether to the sample at a 5:1 ratio (v/v) solvent:sample. The levels of 17β-estradiol and testosterone were measured by competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using estradiol ELISA kit (Cayman Chemical) and testosterone high sensitivity ELISA kit (Enzo Life Sciences) respectively, according to the manufacturer's instructions. At the end of the development step, absorbance was read at 414 nm (estradiol ELISA kit) and 405 nm (testosterone ELISA kit) using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific). Hormone concentration (pg/mL) was determined using the standard curve established for each experiment. The lower detection limit of estradiol and testosterone was 6 pg/mL and 4 pg/mL respectively.

## **2.4. Immunofluorescent staining and image analysis**

Paraffin-embedded testicular explants were serially sectioned (5 µm) using the Jung RM2035 microtome (Leica). The serial sections method was chosen in order to study testicular cells throughout the entire explant. Six to eight serial sections corresponding to the two side-ends and the middle of the testicular explant were mounted on positively-charged microscope slides (SuperFrost® Plus microscope slides, ThermoScientific), and immunofluorescent staining of PCNA and SCP3 was performed using standard protocol. Briefly, testicular explant sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through graded series of ethanol (100%, 96%, 70%). For antigens retrieval, sections were immersed in citrate buffer (0.1 M; pH 6.0) and heated in a microwave oven (10 min, 450 W). After 3 washing in PBS, cell membranes were permeabilized with 0.2% Triton X-100/PBS (20 min, room temperature) and non-specific binding sites were blocked with 3% BSA/PBS (20 min, room temperature). Thereafter, the sections were incubated with monoclonal mouse anti-PCNA or mouse anti-SCP3 primary antibodies diluted in 3% BSA/PBS (1:200 and 1:50 respectively) for 24h at 4°C in a humidified chamber. For negative control, primary antibody was omitted. After 3 washing in PBS, sections were stained with an Alexa-633-coupled goat anti-mouse secondary antibody (1:200 in 3% BSA/PBS) for 1h at room temperature in a humidified chamber protected from the light. At the end of the incubation, sections were washed again in PBS and finally mounted with a DAPI-containing mounting medium.

Whole slide images of immunofluorescent-stained testicular explant sections were digitized at 20X (PCNA staining) or 40X (SCP3 staining) objective magnification using VS120 slide scanner (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) equipped with DAPI and FITC filters. Quantification of PCNA- and SCP3-positive staining was performed using Stardist (Schmidt et al., 2018) and QuPath software (Bankhead et al., 2017) as described in the companion paper (Rouge et al., to submit to *Reprod. Toxicol.*). Results are expressed as a percentage of positive staining relative to the total number of cells in the section (PCNA staining) or as a percentage of positive staining per tissue unit area (mm<sup>2</sup>) (SCP3 staining), relative to the control condition.

## **2.5. RNA extraction and RT-qPCR**

Testicular explants were homogenized in NucleoZOL® reagent (Macherey-Nagel) by manual grinding using a sterile plastic pestle, and total RNA extraction was performed according to the manufacturer's protocol. In order to remove any contaminating DNA, RNA samples were

treated with DNase I according to the manufacturer's instructions. The RNA integrity was verified by 1.5% agarose gel electrophoresis. The concentration of RNA was determined by absorbance at 260 nm (A260) and purity of the samples was assessed by determining the A260:A280 ratio using Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Samples with a ratio of 1.9 or greater were used to generate total cDNA.

Total RNA (250 ng) was reverse transcribed using 100 IU of M-MLV reverse transcriptase in the presence of 1 mM of dNTPs, 100 ng of random primers and 12 IU of RNasin®, for 1h at 37°C. The enzyme was then heat denatured for 10 min at 72°C to stop the reaction. A no reverse transcriptase control and a no template control were performed by omitting M-MLV reverse transcriptase and RNA sample respectively.

The cDNAs were then diluted (1:10 in RNase free water) and qPCR was performed with the C1000 Thermal Cycler CFX96 Real Time System (Biorad) using GoTaq qPCR Master Mix. Each reaction was prepared according to the manufacturer's protocol in a final volume of 20µL. The primers used and the size of PCR products are listed in Table 1. For negative control, RNase free water was added in place of cDNA template. The amplification program consists in an initial step of 3 min at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 30s and 60°C for 1min. PCR products' specificity was assessed by running a dissociation curve after the amplification reactions which confirmed the uniqueness of each amplicon. The expression levels of target genes were normalized against the *Gapdh* gene, selected on the basis of prior experiments assessing the most suitable reference gene in the specific context of the experiment. The relative expression levels were determined by the  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  method.

## 2.6. Statistical analysis

Overall, 4 independent experiments were conducted on testicular explants from 12 animals for the 20dpp group, and those of 9 animals were cultured in 3 independent experiments for the 25dpp group. Results are shown as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis of the data was achieved using the GraphPad Prism® software. Statistical comparisons were performed using an unpaired *t*-test, or one-way ANOVA followed by a Bonferonni *post-hoc* test, as mentioned in the results section and figure captions. *p* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Relative expression of estrogen-responsive genes

To first investigate the effects of BPA and ZEA on the prepubertal testis, the expression of testicular estrogen-responsive genes (*Rb1* and *Vldlr*) was assessed by RT-qPCR after a 6h exposure.

The expression of *Rb1* and *Vldlr* mRNAs was significantly increased in testicular explants from 20 dpp rats exposed to BPA ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) compared to the control. These effects were significantly reduced in presence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M), excepted for the increase in *Rb1* mRNA expression induced by  $10^{-11}$  M BPA (Fig. 1). In testicular explants from 25 dpp animals, mRNA expression of the two estrogens-responsive genes remained unchanged in presence of BPA ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) (Fig 1).

Regarding ZEA exposure, the only effect was observed for *Vldlr* mRNA expression which was significantly increased compared to the control in presence of  $10^{-6}$  M and  $10^{-11}$  M ZEA in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats respectively. This effect was significantly attenuated by pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) in testicular explants from 20 dpp but not from 25 dpp animals (Fig. 1B).

#### 3.2. Effect of BPA and ZEA on steroidogenic enzymes gene expression

Alteration of steroidogenesis is a key characteristic of endocrine disruptors. Hence, the effect of BPA and ZEA on the expression of steroidogenic enzymes genes (*Star*, *Cyp11a1*, *3 $\beta$ hsd*, *Cyp17a1*, *17 $\beta$ hsd*, and *Cyp19a1*) was analysed by RT-qPCR after a 6h exposure.

In testicular explants from 20 dpp rats, BPA increased the mRNA level of most of the steroidogenic enzyme genes (Fig 2). A significant increase in *Star* (BPA  $10^{-6}$  M), *3 $\beta$ hsd* (BPA  $10^{-9}$  M and  $10^{-6}$  M), *17 $\beta$ hsd* and *Cyp19a1* (BPA at all the tested concentrations) mRNA expression compared to the control was observed (Fig. 2A-C, E and F). BPA-induced expression of *3 $\beta$ hsd* mRNA was abolished in presence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M), as well as the increase in *17 $\beta$ hsd* mRNA level resulting from  $10^{-6}$  M BPA exposure, and the potent increase in *Cyp19* mRNA expression induced by the highest concentrations of BPA (Fig. 2A-C, E and F). By contrast, in the testicular explants from 25 dpp animals, the only significant change was observed in *Cyp17a1* mRNA expression, which was increased by  $10^{-9}$  M BPA exposure (Fig. 2D). However, pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) did not cause any difference in



BPA-induced mRNA expression of this gene compared to the condition without antagonist (Fig. 2D).

In testicular explants from 20 *dpp* rats, ZEA at all the tested concentrations significantly increased *Cyp11a1* mRNA level compared to the control (Fig 2B). Similarly,  $10^{-9}$  M and  $10^{-6}$  M ZEA led to a significant increase in *3 $\beta$ hsd* mRNA expression (Fig. 2C), whereas only  $10^{-6}$  M ZEA induced a significant increase in *17 $\beta$ hsd* and *Cyp19a1* mRNA level compared to the control (Fig. 2E and F). ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) only significantly reduced the ZEA-induced increase in *Cyp19a1* mRNA expression compared to the condition without antagonist (Fig. 2F). However, *Star* and *Cyp17a1* mRNA expression remained unchanged in presence of ZEA ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) (Fig 2A and D). In testicular explants from 25 *dpp* rats, ZEA at all the tested concentrations significantly increased the expression of *Star* mRNA compared to the control (Fig. 2A). Likewise,  $10^{-11}$  M and  $10^{-9}$  M ZEA led to a significant increase in *Cyp11a1* and *Cyp17a1* mRNA expression compared to the control (Fig. 2B and D). In presence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M), the effect of  $10^{-9}$  M ZEA on *Cyp17a1* was significantly reduced compared to the condition without antagonist (Fig. 2D). By contrast, *3 $\beta$ hsd*, *17 $\beta$ hsd* and *Cyp19a1* mRNA expression remained unchanged in presence of ZEA ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) (Fig 2A and D)

### 3.3. Effect of BPA and ZEA on steroids levels

In order to determine if the xenoestrogen-induced changes in steroidogenic enzyme genes expression observed after 6h had an impact on steroids production, the level of testosterone and E2 secreted in the culture medium by the testicular explants during the 72h incubation was assessed by competitive ELISA. The studied concentration of BPA and ZEA was chosen based on the conditions resulting in the most important effects at gene expression level.

BPA ( $10^{-6}$  M) significantly decreased testosterone level secreted by testicular explants from 20 *dpp* rats compared to the control, and no modification was observed when the pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) was performed (Fig. 3A). However, BPA ( $10^{-6}$  M) had no effect on E2 level (Fig. 3B).

In testicular explants from 20 *dpp* rats, ZEA ( $10^{-6}$  M) significantly increased the level of testosterone secreted in the culture medium compared to the control, and this effect was similar when pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) was performed (Fig. 3A). Likewise,

ZEA ( $10^{-6}$  M) significantly increased E2 level compared to the control, and pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) greatly increased this effect (Fig. 3B).

ZEA ( $10^{-11}$  M) induced a significant increase in testosterone level secreted by testicular explants from 25 *dpp* rats compared to the control, regardless of the pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 3A). However, the level of E2 secreted in the culture medium remained unchanged following ZEA ( $10^{-11}$  M) exposure.

#### **3.4. Effect of BPA and ZEA on Sertoli cells and junctional complex genes expression**

Since BTB establishment is a prerequisite for a proper spermatogenesis, the effect of the treatments on junctional complex genes expression (*vimentin*, *connexin-43*, *N-cadherin*, and *occludin*) was analysed by RT-qPCR after a 6h exposure.

In testicular explants from 20 *dpp* rats, BPA at all the tested concentrations increased *vimentin* and *N-cadherin* mRNA expression compared to the control (Fig. 4A and C). A significant increase in *connexin-43* and *occludin* mRNA level was also observed, but only for the higher concentrations of BPA ( $10^{-9}$  M and  $10^{-6}$  M) (Fig. 4B and D). However, pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) did not cause any difference in BPA-induced mRNA expression of these genes compared to the condition without antagonist (Fig 4). In testicular explants from 25 *dpp* rats, BPA ( $10^{-11}$  to  $10^{-6}$  M) did not affect the mRNA expression of any of the junctional complex genes (Fig 4).

ZEA ( $10^{-11}$  to  $10^{-6}$  M) exhibited no effect on the mRNA expression of the target-genes in testicular explants from 20 *dpp* animals (Fig 4). However, in those of 25 *dpp* rats, ZEA at all the tested concentrations significantly stimulated *vimentin* mRNA expression compared to the control (Fig 4A). Similarly,  $10^{-11}$  M and  $10^{-6}$  M ZEA significantly increased *occludin* mRNA expression (Fig. 4D), and an increase in *connexin-43* mRNA level was observed for ZEA at  $10^{-11}$  M (Fig. 4B). However, when pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) was performed, there was no significant difference compared to the relevant condition without antagonist (Fig 4).

#### **3.5. Effect of BPA and ZEA on expression of germ cells markers**

The onset of the first wave of spermatogenesis take place during the prepubertal period, so the effect of BPA and ZEA on expression of spermatogenesis-related genes (*H1t*, *Hsf2*, and *Ovol1*) in testicular explants was studied by RT-qPCR after a 6h exposure.

In testicular explants from 20 *dpp* rats,  $10^{-9}$  and  $10^{-6}$  M BPA significantly increased *Hlt* mRNA level compared to the control (Fig 5A). Likewise,  $10^{-11}$  M and  $10^{-9}$  M BPA led to a significant increase in *Ovoll* mRNA expression, whereas *Hsf2* mRNA expression was stimulated only by the lowest concentration of BPA ( $10^{-11}$  M) (Fig. 5B and C). None of these effects were abolished in the presence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 5). BPA ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) had no effect on the expression of spermatogenesis-related genes in testicular explants from 25 *dpp* animals, and the same observation was made for those from 20 *dpp* rats exposed to ZEA ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) (Fig. 5). However, in testicular explants from 25 *dpp* rats, ZEA at all the tested concentrations induced a significant increase in *Hsf2* and *Ovoll* mRNA expression compared to the control (Fig. 5B and C). *Hlt* mRNA level was increased only for ZEA at  $10^{-6}$  M (Fig. 5A). Pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) did not cause any difference in ZEA-induced mRNA expression of these genes compared to the condition without antagonist (Fig 5).

### 3.6. Immunofluorescent staining of proliferation and meiosis markers

In order to determine if the xenoestrogen-induced modifications in spermatogenesis-related genes expression observed after 6h affected proliferation and meiosis in testicular cells, the expression of PCNA and SCP3 in testicular explants was assessed by immunofluorescent staining of these proteins after a 72h exposure. Therefore, based on the results of the 6h exposure, the effects of BPA and ZEA were investigated in testicular explants from 20 and 25 *dpp* rats respectively.

In testicular explants obtained from 20 *dpp* rats, BPA significantly decreased PCNA-positive cells number at all the tested concentrations compared to the control (Fig. 6A). This effect was abolished in presence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 6A). On the other hand,  $10^{-11}$  M and  $10^{-9}$  M BPA induced a marked increase in SCP3-positive cells number compared to the control (Fig. 6B). This stimulatory effect was abolished in presence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 6B).

In testicular explants from 25 *dpp* animals, exposure to ZEA at all the tested concentrations resulted in a potent decrease in PCNA-positive cell number (Fig 6A). This effect was significantly attenuated in presence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 6A). A slight but significant increase in SCP3-positive cells number was observed after exposure to ZEA ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) (Fig. 6B). Moreover, in basal condition, pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) led to a significant increase in SCP3-positive cells number compared to the control condition without

antagonist (Fig. 6B). Likewise, in presence of ZEA ( $10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) SCP3-positive cells number was enhanced by pre-incubation with ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) compared to the relevant condition without antagonist (Fig. 6B).

#### 4. Discussion

Numerous studies evidenced the adverse effects of estrogenic compounds on the testis (D'Souza et al., 2005; Gill-Sharma et al., 2001; Liu et al., 2013). Since the prepubertal gonad appears sensitive to such compounds (Li et al., 2016; Steinberger and Duckett, 1965; Walczak-Jędrzejowska et al., 2013), exposure to estrogens and xenoestrogens in this period of life is of particular concern. In order to address this issue, we used an *ex vivo* approach. This work is part of a global study assessing the effects of estrogenic compounds on the prepubertal testis. We previously showed that an exogenous supply of E2 results in steroidogenesis and spermatogenesis disruption in testicular explants obtained from 20 and 25 *dpp* rats (Rouge et al., to submit to *Reprod. Toxicol.*). Thus, using the same *ex vivo* approach, we investigated the effects of the xenoestrogens BPA and ZEA on the prepubertal testis. Our study demonstrates that both compounds disrupted steroidogenesis- and spermatogenesis-related endpoints in the testicular explants, but with different age-related patterns of response.

In testicular explants of 20 *dpp* rats, a 6h exposure to BPA induced an up-regulation of *Star*, *3βhsd* and *17βhsd* gene expression, along with a potent increase in *Cyp19a1* gene expression. The formers encode enzymes involved in testosterone synthesis while the latter encodes aromatase, responsible for the conversion of testosterone into  $17\beta$ -estradiol (Hanukoglu, 1992). Numerous studies investigated the effect of BPA on steroidogenic enzyme gene expression. However, these studies report conflicting results depending on various factors such as the species and strains of experimental animals, the doses used and the route of exposure, as well as the exposure window (Barbagallo et al., 2020). Our results clearly support this statement, as BPA-induced disruption of steroidogenesis was observed in testicular explants from 20 but not 25 *dpp* rats, and these effects were more pronounced with the higher concentrations of BPA. In addition, several *in vivo* studies described a BPA-induced disruption of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and a consequent decrease in luteinizing hormone (LH) level (Akingbemi, 2005; Nakamura et al., 2010; Wisniewski et al., 2015). Since LH regulates steroidogenic enzymes gene expression (Li et al., 2021), the down-regulation of these genes observed *in vivo* could be attributed to the

decrease in LH level induced by BPA. Such indirect effect of BPA on steroidogenic enzymes genes regulation through disruption of the HPG axis can not be involved in our *ex vivo* model. Thus, our study highlights that, in absence of HPG axis-mediated endocrine regulation, BPA increases the expression of the steroidogenic enzymes genes in rat testis. In this context and in accordance with our results, an *in vitro* study demonstrated that BPA ( $10^{-6}$  M) could up-regulates steroidogenic enzymes genes expression in MA-10 Leydig cell line (Lan et al., 2017). Moreover, our results suggest that BPA's effects on steroidogenic enzymes genes expression seems to be mediated by nuclear ER. Indeed, as observed for the E2-induced expression of steroidogenic enzyme genes (Rouge et al, to submit to *Reprod.toxicol.*), BPA's effect on these genes was reversed or partially reversed by ICI 182.780.

However, this stimulatory effect at gene expression level did not result in an increase in the level of steroid hormones secreted in the culture medium by the testicular explants from 20 *dpp* rats. On the contrary, after a 72h exposure to BPA, testosterone level was decreased and E2 level remained unchanged. This surprising outcome is thought to result from events occurring between the two endpoints studied, *i.e.* between steroidogenic enzyme genes expression and steroid production. Interestingly, BPA in the micromolar range has been shown to inhibit  $3\beta$ HSD, CYP17A1 and  $17\beta$ HSD activity in rat testes, through either competitive or uncompetitive mechanism against their natural substrates (Ye et al., 2011). Such inhibitory effect of BPA on steroidogenic enzymes activity could explain the lowered testosterone level measured in our study despite the stimulatory effect of BPA on steroidogenic enzyme genes expression. Moreover, ICI 182.780 did not reversed BPA's effect on testosterone synthesis, indicating the non-involvement of nuclear ER and further supporting this hypothesis.

Regarding the other endpoints investigated, a BPA-induced expression of the junctional complex genes was observed in testicular explants of 20 *dpp* rats after a 6h exposure. The proteins encoded by these genes are involved in the formation of the BTB in Sertoli cells. In rats, BTB starts to assemble between 15 and 20 *dpp* and is fully functional only at 25 *dpp* (Mok et al., 2011; Picut et al., 2015). Thus, our result suggests that BPA could accelerate the establishment of the BTB in the prepubertal testis. In addition, BPA increased the expression of spermatogenesis-related genes in germ cells after a 6h exposure. Accordingly, a 72h exposure to BPA decreased the percentage of PCNA positive cells but stimulated SCP3 protein expression, reflecting an increased number of germ cells undergoing the meiosis process. Taken all together, these *ex vivo* results suggest that BPA promotes the

spermatogenesis' onset at 20 *dpp*. In contrast, none of these effects were observed in testicular explants from 25 *dpp* animals exposed to BPA. A previous *in vivo* study conducted by our team demonstrated that prepubertal exposure (15 to 30 *dpp*) to low doses of BPA (50 µg/kg bw/day) promotes spermatogenesis progression in immature rats (Brouard et al., 2016). Our results are clearly in accordance with this study, and further indicate that the effects observed *in vivo* might be the consequence of BPA-induced events taking place around 20 rather than 25 *dpp*, *i.e.* at a relatively early stage of spermatogenesis where the most developed germ cells are pachytene spermatocytes (Malkov et al., 1998). Similar outcomes were observed in testicular explants from 20 *dpp* rats exposed to an exogenous supply of E2 (Rouge et al, to submit to *Reprod. Toxicol.*). Moreover, the effect of BPA on PCNA and SCP3 protein level was reversed by ICI 182.780, suggesting the involvement of nuclear ER in these outcomes, in particular ESR1 which is the major ER expressed in prepubertal rat testes (Rouge et al, to submit to *Reprod. Toxicol.*).

In addition to BPA, the effect of ZEA exposure was also assessed in our *ex vivo* model. In testicular explants from 20 *dpp* rats, a 6h exposure to ZEA stimulated *Cyp11a1*, *3βhsd*, *17βhsd* and *Cyp19a1* gene expression. Accordingly, ZEA induced an increase in testosterone and E2 level after a 72h exposure. Likewise, in testicular explants from 25 *dpp* animals ZEA exposure up-regulated *Star*, *Cyp11a1* and *Cyp17a1* gene expression, and consequently led to an increase in testosterone level. These results are in striking contrast with others studies reporting a decrease in steroidogenic enzymes genes expression and testosterone level following ZEA exposure in adult rodents (Long et al., 2017; Yang et al., 2007). However, according to the investigator's own statement, high doses of ZEA were used in these studies. By contrast, in primary culture of Leydig cells isolated from adult mice, low concentrations of ZEA (in the range of the highest concentration used in our study) results in up-regulation of *3βhsd* and *Star* gene expression (Q. Liu et al., 2014). Thus, although high ZEA concentrations inhibit steroidogenesis, our results suggest that low concentrations of ZEA could exhibit a stimulatory effect.

In testicular explants from 20 *dpp* animals, a 6h exposure to ZEA did not cause any modification in spermatogenesis-related genes expression. Consistently, the expression of the junctional complex genes was also unchanged. On the contrary, in testicular explants from 25 *dpp* rats, ZEA induced an up-regulation of spermatogenesis-related endpoints at both gene (*Hlt*, *Hsf2*, *Ovol1*) and protein (SCP3) expression level, along with a decrease in PCNA protein level and an increased expression of the junctional complex genes. Thus, as observed

for BPA in prepubertal rats *in vivo* (Brouard et al., 2016) and for BPA and E2 exposure in testicular explants from 20 *dpp* rats *ex vivo* (current and companion studies, Rouge et al, to submit to *Reprod. Toxicol.*), our results suggest that ZEA could enhance spermatogenesis progression. Nonetheless, in contrast with E2 and BPA, ZEA exhibited this stimulatory effect in testicular explants from 25 *dpp* rats, *i.e.* on a more advanced stage of spermatogenesis. As observed in the companion study (Rouge et al, to submit to *Reprod. Toxicol.*), ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) alone or in combination with ZEA increased SCP3-positive cell number. ICI 182.780 has been reported to have an agonist activity on GPER (Thomas et al., 2005) and increase mRNA expression of cyclins A1 and B1 (Bois et al., 2012). As these two cyclins are involved in the meiosis process, the stimulatory effect of ICI 182.780 on SCP3 expression is thought to result from a GPER-mediated increase in cyclins expression.

The results of ZEA's effects on spermatogenesis-related endpoints are in striking contrast with those reported elsewhere. Indeed, *in vivo* studies described potent adverse effects of ZEA on spermatogenesis, resulting in germ cells apoptosis and inhibition of the meiosis process (Jee et al., 2010; Kim et al., 2003; Zatecka et al., 2014; Zhou et al., 2020). In this regard, spermatogonia and spermatocytes have been identified as ZEA's main targets (Jee et al., 2010; Kim et al., 2003). However, these studies were conducted in adult rodents with high doses of ZEA. By contrast, exposure of immature rats (5 to 15 *dpp*) or mice (21 to 35 *dpp*) to low dose of ZEA (ranging from 4 to 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day) did not alter germ cell number (Filipiak et al., 2010; Pang et al., 2017). Interestingly, in testicular explants from 25 *dpp* rats, E2 at  $10^{-6}$  M increased SCP3-positive cell number (Rouge et al, to submit to *Reprod. Toxicol.*). Thus, the effects of ZEA on spermatogenesis appear to be similar to those of E2 at  $10^{-6}$  M in testicular explants from 25 *dpp* animals.

BPA and ZEA are both endocrine disruptors known as xenoestrogens. Surprisingly, in our study, only BPA was able to modulate the expression of estrogens-responsive genes. This result suggests different action mechanisms of BPA and ZEA in the testicular explants of immature rats. Indeed, in testicular explants from 20 *dpp* rats, BPA induced the same effects as those observed for E2 in the companion work (Rouge et al., to submit to *Reprod. Toxicol.*). Consistently, the effect of BPA on expression of estrogen-responsive genes, steroidogenic enzymes genes and PCNA and SCP3 proteins was reversed or at least partially reversed by ICI 182.780. This suggests the involvement of nuclear ER in the BPA-induced disruption of these endpoints in testicular explants of 20 *dpp* rats. Contrary to E2 and BPA, ZEA had no effect on spermatogenesis-related endpoint in testicular explants from 20 *dpp* rats. Moreover,

in testicular explants of 25 *dpp* rats ZEA's effects on steroidogenesis- and spermatogenesis-related endpoints are mostly opposite to those observed for E2 in the companion work (Rouge et al., to submit to *Reprod. Toxicol*). Accordingly, the effects of ZEA were rarely reversed, both in testicular explants of 20 and 25 *dpp* animals. Hence, these results suggest that ZEA effects in prepubertal rat testis are not mediated through the classical nuclear ER-mediated estrogen signaling, but could rather result from alternative mechanisms. In particular, ZEA has been shown to increase cAMP levels in Leydig cells isolated from adult mouse testis (Q. Liu et al., 2014), and another study indicates that this effect is mediated through ZEA-induced GPER activation in a colon cancer cell line (Lo et al., 2021). Since cAMP enhances steroidogenesis (Cooke, 1999), the stimulatory effect of ZEA on this endpoint observed in our study could be mediated through GPER. In addition to Leydig cells, GPER is also expressed in rat germ cells (pachytene spermatocytes and round spermatids) as well as Sertoli cells (Chimento et al., 2011, 2010; Lucas et al., 2010), and regulates cell proliferation, differentiation and apoptosis (Chimento et al., 2020). Hence, further studies are needed to investigate the possible involvement of GPER in ZEA effects in testicular explants of prepubertal rats.

Overall, our study reinforces the idea that the prepubertal stage constitutes a critical window of susceptibility to xenoestrogens and highlights different age-related patterns of sensitivity to BPA and ZEA within this period. Indeed, although BPA and ZEA both disrupted steroidogenesis- and spermatogenesis-related endpoints, these effects were only observed in testicular explants from 20 *dpp* rats for BPA, whereas ZEA affected steroidogenesis-related endpoints in testicular explants from rats of both age but impacted spermatogenesis-related endpoints only in testicular explants from 25 *dpp* animals. Nonetheless, human exposure to xenoestrogens appears to be continuous throughout life. Thus, in the context of human exposure, disruption of testicular functions is likely to occur during the entire prepubertal period, with specific times of greater sensitivity to certain compounds than to others. Moreover, biomonitoring studies evidenced a simultaneous exposure to many estrogenic compounds (Fleck et al., 2016; Teeguarden et al., 2016). This is of particular concern, as predicting the mixture effect of estrogenic compounds from those of individual chemicals is difficult (Conley et al., 2016). Thus, further studies are needed in order to evaluate the effect of a combined exposure to BPA and ZEA on the prepubertal testis.



## Acknowledgments

The authors thank the Carré International (Normandie Univ, UNICAEN) for English editing. Funding: this work was supported by the French Ministry for Higher Education and Research. Maëva Drouault was supported by funding from the Région Normandie.

## References

- Akingbemi, B.T., 2005. Estrogen regulation of testicular function. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-51>
- Andaluri, G., Manickavachagam, M., Suri, R., 2018. Plastic toys as a source of exposure to bisphenol-A and phthalates at childcare facilities. *Environ. Monit. Assess.* 190. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6438-9>
- Bacle, Dupuis, Belmouaz, Bauwens, Cambien, Venisse, Pierre-Eugene, Potin, Migeot, Ayraud-Thevenot, 2019. Overexposure to Bisphenol A and Its Chlorinated Derivatives of Patients with End-Stage Renal Disease during Online Hemodiafiltration. *Biomolecules* 9, 403. <https://doi.org/10.3390/biom9090403>
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Barbagallo, F., Condorelli, R.A., Mongioì, L.M., Cannarella, R., Aversa, A., Calogero, A.E., La Vignera, S., 2020. Effects of Bisphenols on Testicular Steroidogenesis. *Front. Endocrinol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00373>
- Bernier, M.R., Vandenberg, L.N., 2017. Handling of thermal paper: Implications for dermal exposure to bisphenol A and its alternatives. *PLOS ONE* 12, e0178449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178449>
- Bois, C., Delalande, C., Bouraïma-Lelong, H., Durand, P., Carreau, S., 2012. 17 $\beta$ -Estradiol regulates cyclin A1 and cyclin B1 gene expression in adult rat seminiferous tubules. *J. Mol. Endocrinol.* 48, 89–97. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0105>
- Brouard, V., Guénon, I., Bouraïma-Lelong, H., Delalande, C., 2016. Differential effects of bisphenol A and estradiol on rat spermatogenesis' establishment. *Reprod. Toxicol.* 63, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.003>
- Carballo, D., Pallarés, N., Ferrer, E., Barba, F.J., Berrada, H., 2021. Assessment of Human Exposure to Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Zearalenone and Their Metabolites Biomarker in Urine Samples Using LC-ESI-qTOF. *Toxins* 13, 530. <https://doi.org/10.3390/toxins13080530>
- Chimento, A., De Luca, A., Nocito, M.C., Avena, P., La Padula, D., Zavaglia, L., Pezzi, V., 2020. Role of GPER-Mediated Signaling in Testicular Functions and Tumorigenesis. *Cells* 9, 2115. <https://doi.org/10.3390/cells9092115>
- Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Andò, S., Maggiolini, M., Carreau, S., Pezzi, V., 2010. 17 $\beta$ -Estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER $\alpha$ . *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.035>
- Chimento, A., Sirianni, R., Zolea, F., Bois, C., Delalande, C., Andò, S., Maggiolini, M., Aquila, S., Carreau, S., Pezzi, V., 2011. Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax: Gper and ESR involvement in rat round spermatid maturation. *Int. J. Androl.* 34, 420–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01100.x>

- Colborn, T., Clement, C., 1992. Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functionnal Development: the Wildlife/Human Connection, Princeton Scientific Publishing Company. ed, Advances in modern environmental toxicology. Princeton, N.J.
- Conley, J.M., Hannas, B.R., Furr, J.R., Wilson, V.S., Gray, L.E., 2016. A Demonstration of the Uncertainty in Predicting the Estrogenic Activity of Individual Chemicals and Mixtures From an *In Vitro* Estrogen Receptor Transcriptional Activation Assay (T47D-KBluc) to the *In Vivo* Uterotrophic Assay Using Oral Exposure. *Toxicol. Sci.* 153, 382–395. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw134>
- Cooke, B.A., 1999. Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151, 25–35.
- Degen, G.H., Bolt, H.M., 2000. Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 73, 433–441.
- D’Souza, R., Gill-Sharma, M.K., Pathak, S., Kedia, N., Kumar, R., Balasinor, N., 2005. Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 241, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.04.011>
- Dualde, P., Pardo, O., Corpas-Burgos, F., Kuligowski, J., Gormaz, M., Vento, M., Pastor, A., Yusà, V., 2019. Biomonitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. *Sci. Total Environ.* 668, 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.024>
- Engel, S.M., Levy, B., Liu, Z., Kaplan, D., Wolff, M.S., 2006. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod. Toxicol.* 21, 110–112. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.07.007>
- Ezekiel, C.N., Odebode, A.C., Fapohunda, S.O., 2008. Zearalenone production by naturally occurring *Fusarium* species on maize, wheat and soybeans from Nigeria.
- Filipiak, E., Walczak-Jedrzejowska, R., Oszukowska, E., Guminska, A., Marchlewska, K., Kula, K., Slowikowska-Hilczer, J., 2010. Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat’s testis. *Folia Histochem. Cytobiol.* 47. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0049-4>
- Fleck, S.C., Churchwell, M.I., Doerge, D.R., Teeguarden, J.G., 2016. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens II: Soy isoflavones and zearalenone in pregnant women. *Food Chem. Toxicol.* 95, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.05.021>
- Gill-Sharma, M.K., D’Souza, S., Padwal, V., Balasinor, N., Aleem, M., Parte, P., Juneja, H.S., 2001. Antifertility effects of estradiol in adult male rats. *J. Endocrinol. Invest.* 24, 598–607.
- Hanukoglu, I., 1992. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 779–804.
- Jee, Y., Noh, E.-M., Cho, E.-S., Son, H.-Y., 2010. Involvement of the Fas and Fas ligand in testicular germ cell apoptosis by zearalenone in rat. *J. Vet. Sci.* 11, 115. <https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.2.115>
- Kim, I.-H., Son, H.-Y., Cho, S.-W., Ha, C.-S., Kang, B.-H., 2003. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol. Lett.* 138, 185–192.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B., Gustafsson, J.-Å., 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor B. *Endocrinology* 139, 4252–4263. [https://doi.org/0013-7227/98/\\$03.00/0](https://doi.org/0013-7227/98/$03.00/0)
- La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 45–57. <https://doi.org/0.1038/s41574-019-0273-8>
- Lan, H.-C., Wu, K.-Y., Lin, I.-W., Yang, Z.-J., Chang, A.-A., Hu, M.-C., 2017. Bisphenol A disrupts steroidogenesis and induces a sex hormone imbalance through c-Jun phosphorylation in Leydig cells. *Chemosphere* 185, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.004>
- Leblanc, J.-C., Tard, A., Volatier, J.-L., Verger, P., 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Addit. Contam.* 22, 652–672. <https://doi.org/10.1080/02652030500159938>
- Li, J., Mao, R., Zhou, Q., Ding, L., Tao, J., Ran, M.-M., Gao, E.-S., Yuan, W., Wang, J.-T., Hou, L.-F., 2016. Exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption

- of ERK signal pathway. *Toxicol. Mech. Methods* 26, 180–188.  
<https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1139024>
- Li, X., Zhu, Q., Wen, Z., Yuan, K., Su, Z., Wang, Y., Zhong, Y., Ge, R.-S., 2021. Androgen and Luteinizing Hormone Stimulate the Function of Rat Immature Leydig Cells Through Different Transcription Signals. *Front. Endocrinol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.599149>
- Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., He, M., Lu, Y., Wu, H., Pi, H., Luo, X., Zhang, Y., Zhong, M., Yu, Z., Zhou, Z., 2013. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death Dis.* 4, e676–e676. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.203>
- Liu, C., Duan, W., Zhang, L., Xu, S., Li, R., Chen, C., He, M., Lu, Y., Wu, H., Yu, Z., Zhou, Z., 2014. Bisphenol A exposure at an environmentally relevant dose induces meiotic abnormalities in adult male rats. *Cell Tissue Res.* 355, 223–232. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1723-6>
- Liu, Q., Wang, Y., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Zheng, W., Huang, Q., Liu, Z., Bian, J., 2014. Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression. *Toxicol. In Vitro* 28, 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.01.013>
- Liu, X., Wang, Z., Liu, F., 2021. Chronic exposure of BPA impairs male germ cell proliferation and induces lower sperm quality in male mice. *Chemosphere* 262, 127880. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127880>
- Lo, E.K.K., Lee, J.C.-Y., Turner, P.C., El-Nezami, H., 2021. Low dose of zearalenone elevated colon cancer cell growth through G protein-coupled estrogenic receptor. *Sci. Rep.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86788-w>
- Long, M., Yang, S., Dong, S., Chen, X., Zhang, Y., He, J., 2017. Characterization of semen quality, testicular marker enzyme activities and gene expression changes in the blood testis barrier of Kunming mice following acute exposure to zearalenone. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 27235–27243. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0299-1>
- Lucas, T.F.G., Royer, C., Siu, E.R., Lazari, M.F.M., Porto, C.S., 2010. Expression and Signaling of G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER) in Rat Sertoli Cells. *Biol. Reprod.* 83, 307–317. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084160>
- Malkov, M., Fisher, Y., Don, J., 1998. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 59, 84–92. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.84>
- Massart, F., Micillo, F., Rivezzi, G., Perrone, L., Baggiani, A., Miccoli, M., Meucci, V., 2016. Zearalenone screening of human breast milk from the Naples area. *Toxicol. Environ. Chem.* 98, 128–136. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1101112>
- Mok, K.-W., Mruk, D.D., Lee, W.M., Cheng, C.Y., 2011. A study to assess the assembly of a functional blood-testis barrier in developing rat testes. *Spermatogenesis* 1, 270–280. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.3.17998>
- Nakamura, D., Yanagiba, Y., Duan, Z., Ito, Y., Okamura, A., Asaeda, N., Tagawa, Y., Li, C., Taya, K., Zhang, S.-Y., 2010. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol. Lett.* 194, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.002>
- Pan, P., Ma, F., Wu, K., Yu, Y., Li, Y., Li, Z., Chen, X., Huang, T., Wang, Y., Ge, R., 2020. Maternal exposure to zearalenone in masculinization window affects the fetal Leydig cell development in rat male fetus. *Environ. Pollut.* 263, 114357. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114357>
- Pang, J., Zhou, Q., Sun, X., Li, L., Zhou, B., Zeng, F., Zhao, Y., Shen, W., Sun, Z., 2017. Effect of low-dose zearalenone exposure on reproductive capacity of male mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 333, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.08.011>
- Peng, C.-Y., Tsai, E.-M., Kao, T.-H., Lai, T.-C., Liang, S.-S., Chiu, C.-C., Wang, T.-N., 2019. Canned food intake and urinary bisphenol a concentrations: a randomized crossover intervention study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 27999–28009. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05534-y>
- Picut, C.A., Remick, A.K., de Rijk, E.P.C.T., Simons, M.L., Stump, D.G., Parker, G.A., 2015. Postnatal Development of the Testis in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Toxicol. Pathol.* 43, 326–342. <https://doi.org/10.1177/0192623314547279>

- Rai, A., Das, M., Tripathi, A., 2019. Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 2710–2729. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388>
- Ropejko, K., Twarużek, M., 2021. Zearalenone and Its Metabolites—General Overview, Occurrence, and Toxicity. *Toxins* 13, 35. <https://doi.org/10.3390/toxins13010035>
- Rubin, B.S., 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.002>
- Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C., Myers, G., 2018. Cell detection with star-convex polygons, in: *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI)*. Springer, Granada, Spain, pp. 265–273.
- Sharma, A., Mollier, J., Brocklesby, R.W.K., Caves, C., Jayasena, C.N., Minhas, S., 2020. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reprod. Med. Biol.* 19, 243–253. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12326>
- Skakkebaek, N.E., Jorgensen, N., Main, K.M., Meyts, E.R.-D., Leffers, H., Andersson, A.-M., Juul, A., Carlsen, E., Mortensen, G.K., Jensen, T.K., Toppari, J., 2006. Is human fecundity declining? *Int. J. Androl.* 29, 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00573.x>
- Steinberger, E., Duckett, G.E., 1965. Effect of estrogen or testosterone on initiation and maintenance of spermatogenesis in the rat. *Endocrinology* 76, 1184–1189.
- Teeguarden, J.G., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Doerge, D.R., 2016. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women. *Food Chem. Toxicol.* 92, 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.023>
- Thomas, P., Dong, J., 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.017>
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146, 624–632. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 24, 139–177. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>
- Walczak-Jędrzejowska, R., Marchlewska, K., Oszukowska, E., Filipiak, E., Słowikowska-Hilczer, J., Kula, K., 2013. Estradiol and testosterone inhibit rat seminiferous tubule development in a hormone-specific way. *Reprod. Biol.* 13, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.07.005>
- Wisniewski, P., Romano, R.M., Kizys, M.M.L., Oliveira, K.C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M.I., Dias-da-Silva, M.R., Romano, M.A., 2015. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. *Toxicology* 329, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.01.002>
- Yang, J., Zhang, Y., Wang, Y., Cui, S., 2007. Toxic effects of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.10.013>
- Ye, L., Zhao, B., Hu, G., Chu, Y., Ge, R.-S., 2011. Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicol. Lett.* 207, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.001>
- Zatecka, E., Ded, L., Elzeinova, F., Kubatova, A., Dorosh, A., Margaryan, H., Dostalova, P., Korenkova, V., Hoskova, K., Peknicova, J., 2014. Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice. *Reprod. Toxicol.* 45, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.01.003>
- Zhou, Y., Zhang, D., Sun, D., Cui, S., 2020. Zearalenone affects reproductive functions of male offspring via transgenerational cytotoxicity on spermatogonia in mouse. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 234, 108766. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108766>

## FIGURES CAPTION

**Figure 1. Effects of BPA and ZEA on estrogen-responsive genes expression in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 6h in presence of increasing concentrations of BPA (left panels) or ZEA (right panels). After extraction of total RNA, *Rb1* (A), *Hbb* (B) and *Vldlr* (C) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *Gapdh* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 12 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  indicate significant difference compared to the control. # $p < 0.05$  indicate significant difference compared to the corresponding condition without ICI 182.780

**Figure 2. Effects of BPA and ZEA on steroidogenic enzyme genes expression in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 6h in presence of increasing concentrations of BPA (left panels) or ZEA (right panels). After extraction of total RNA, *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *3 $\beta$ hsd* (C), *Cyp17a1* (D), *17 $\beta$ hsd* (E) and *Cyp19a1* (F) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *Gapdh* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 12 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the control. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  indicate significant difference compared to the corresponding condition without ICI 182.780.

**Figure 3. Effects of BPA and ZEA xenoestrogens on steroid levels secreted by testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 72h in presence of BPA ( $10^{-6}$  M) or ZEA ( $10^{-6}$  M for 20 dpp group;  $10^{-11}$  M for 25 dpp group). These investigated conditions were those resulting in the most important effects on steroidogenic enzyme gene expression. After steroid extraction, the levels of testosterone (A) and 17 $\beta$ -estradiol (E2) (B) secreted in the culture medium by the testicular explants were measured by competitive ELISA. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 8 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by one-way ANOVA followed by a Bonferonni post-hoc test. Different lower-case letter indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

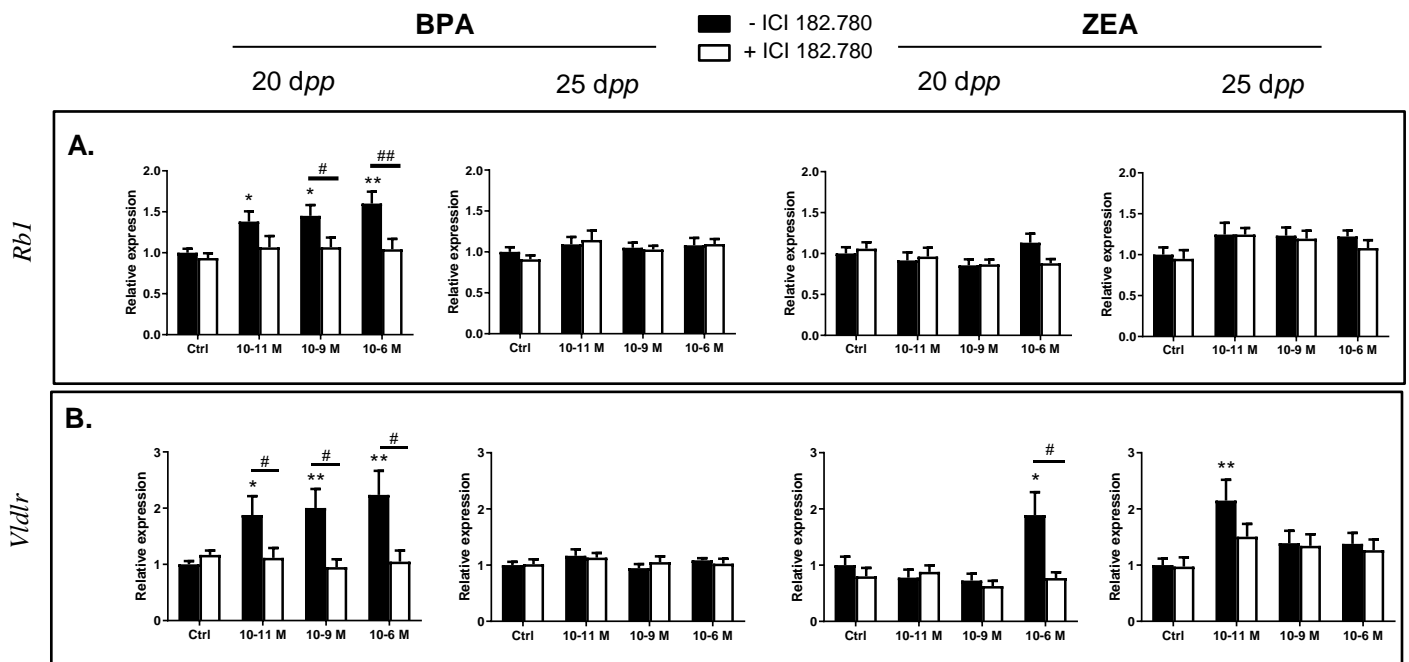
**Figure 4. Effects of BPA and ZEA on junctional complexes genes expression in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 6h in presence of increasing concentrations of BPA (left panels) or ZEA (right panels). After extraction of total RNA, *vimentin* (A), *connexin-43* (B), *N-cadherin* (C) and *occludin* (D) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *Gapdh* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 12 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance

was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  indicate significant difference compared to the control.  $p$ -values close to the 0.05 cut-off (*i.e.* less than 0.06) are also indicated on the figure.

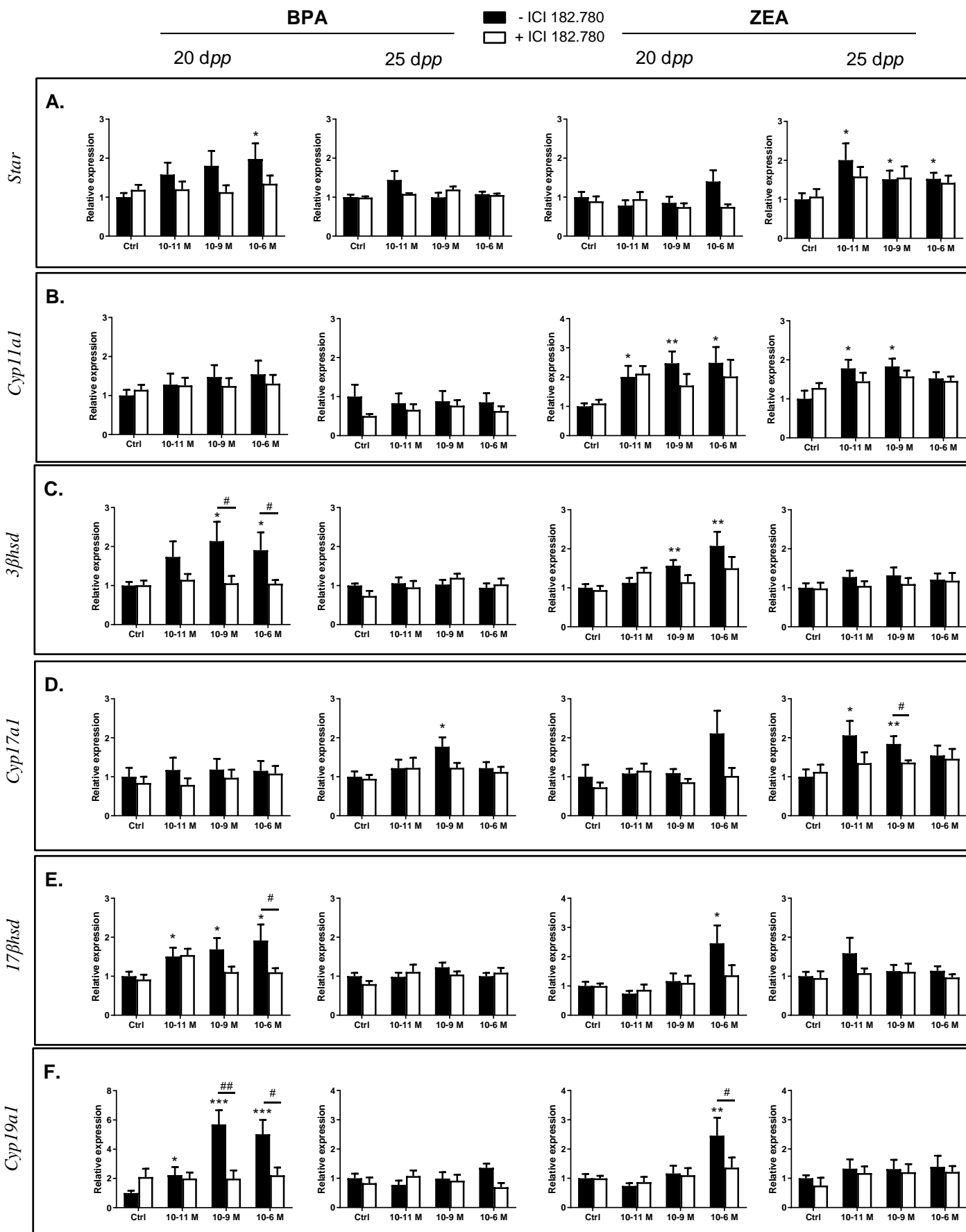
**Figure 5. Effects of BPA and ZEA on expression of germ cells markers in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 6h in presence of increasing concentrations of BPA (left panels) or ZEA (right panels). After extraction of total RNA, *H1t* (A), *Hsf2* (B), and *Ovov11* (C) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *Gapdh* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 12 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the control.

**Figure 6. Effects of BPA and ZEA on PCNA and SCP3 expression in testicular explants from 20 dpp and 25 dpp rats.** Testicular explants were pre-incubated for 1h in presence or absence of ICI 182.780 ( $10^{-6}$  M) and then cultured for 72h in presence of increasing concentrations of BPA (20 dpp group) or ZEA (25 dpp group). These investigated conditions were those resulting in modification of spermatogenesis-related genes expression. At the end of the incubation, testicular explants were processed for histological studies, and immunofluorescent staining was performed. **A.** PCNA (proliferation marker). Left: representative illustration of PCNA staining. The nuclear staining is localized in the cells at the periphery of the seminiferous tubule. Right: quantitative analysis of PCNA staining, data are presented as percentage of cells positive staining relative to the total number of cells in the section. **B.** SCP3 (meiosis marker). Left: representative illustration of SCP3 staining. The perinuclear staining (arrowhead) in the large nucleus of cells is localized near to the centre of the seminiferous tubule. Right: quantitative analysis of SCP3 staining, data are presented as percentage of positive staining per tissue unit area ( $\text{mm}^2$ ). Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 8 (20 dpp) or 9 (25 dpp) animals. The mean value of the control (Ctrl) condition was arbitrarily set at 1. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the control. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the corresponding condition without ICI 182.780.

**Figure 1**

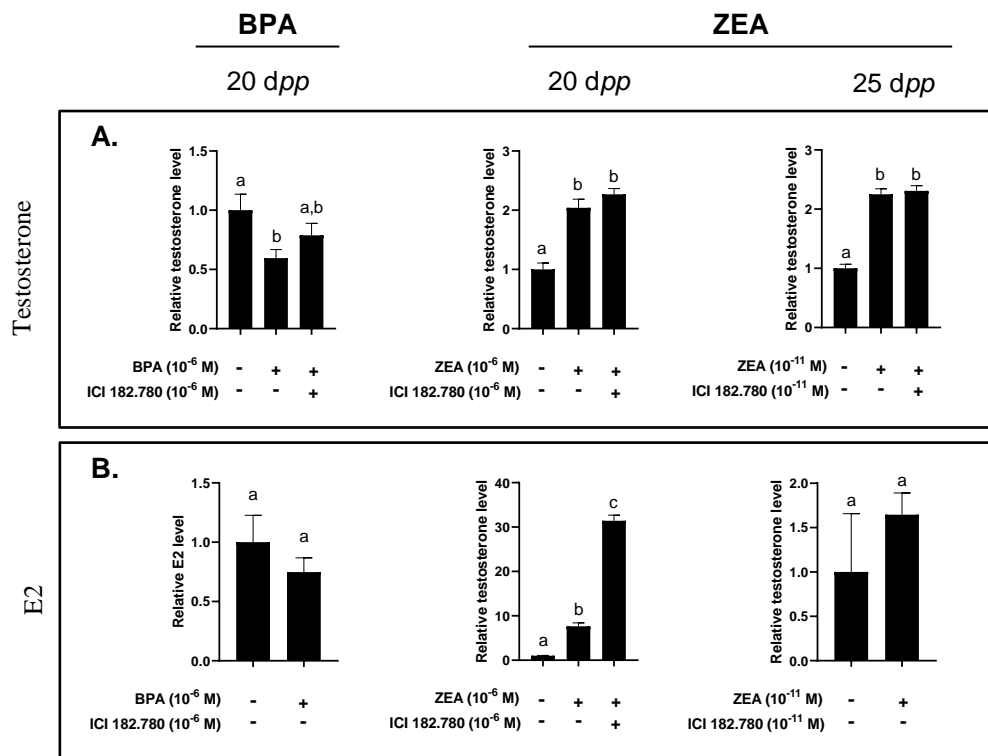


**Figure 2**

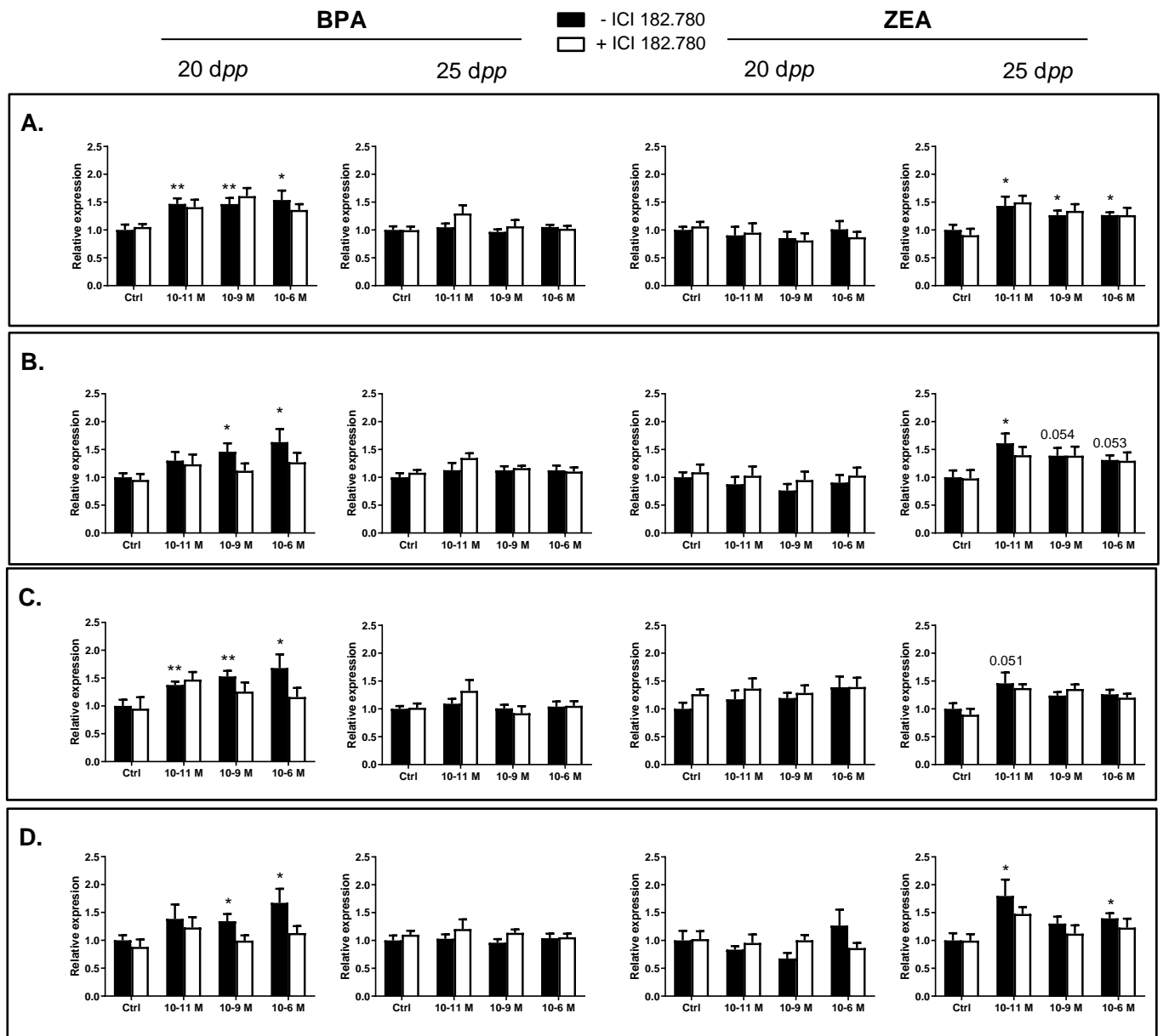




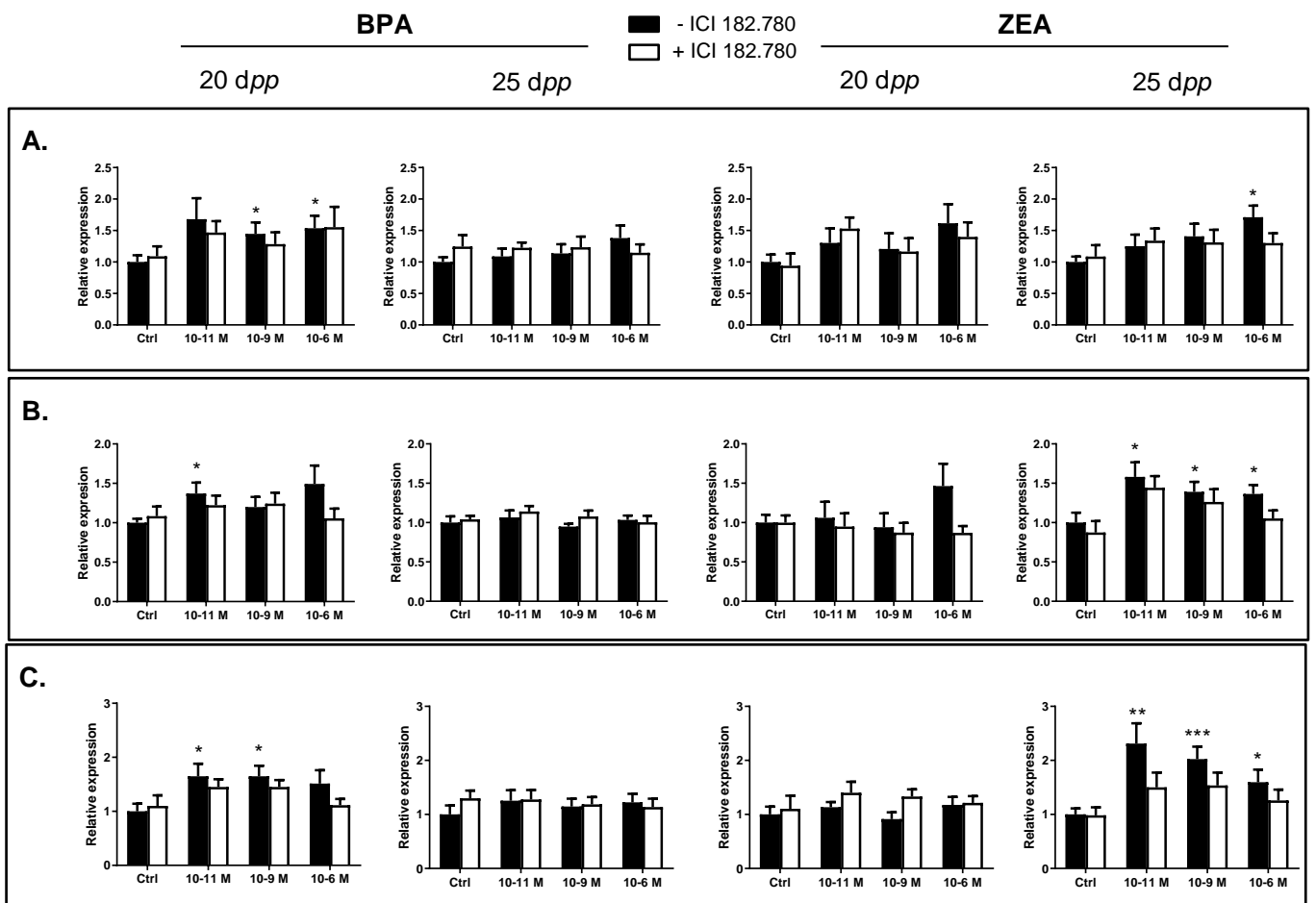
**Figure 3**



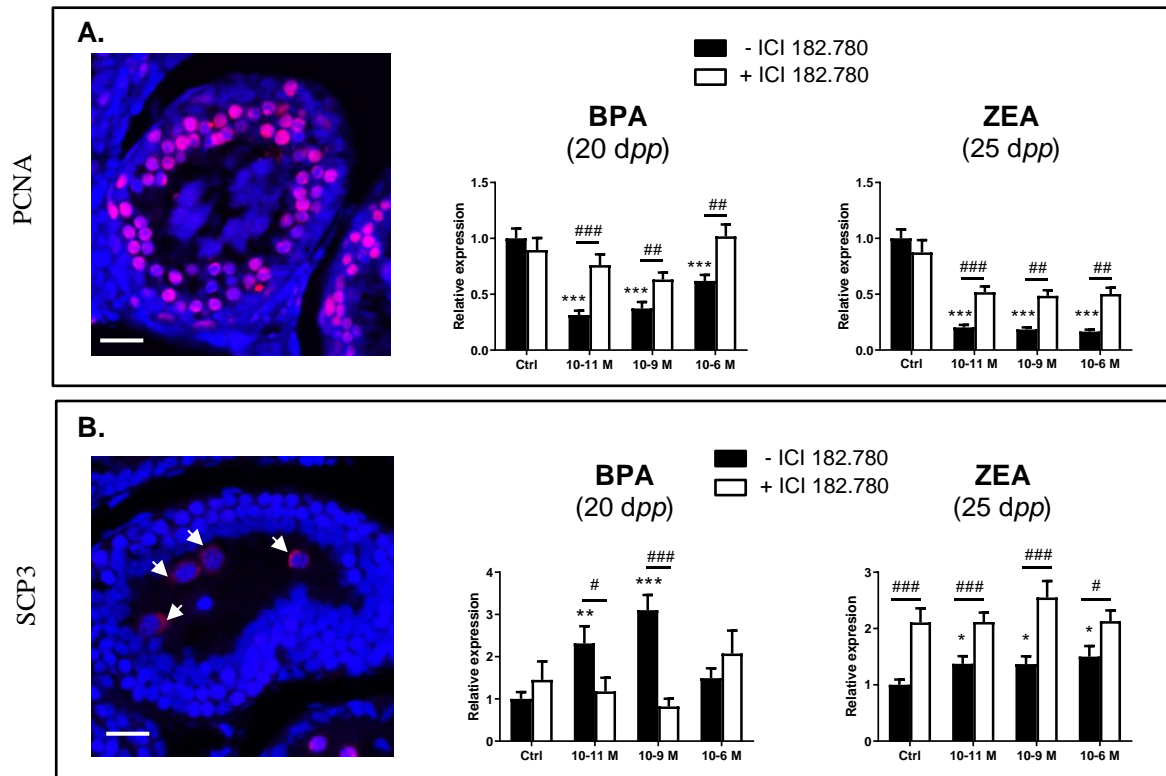
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**



**Table 1. Primers used for RT-qPCR**

Gene	Gene Full name	GeneBank (accession code)	Primer (5'-3')	Amplicon length (bp)
<i>17βhsd</i>	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3	NM_054007.1	F: TTC-GTC-CCT-GGC-CTC-TGT-AT R: TAA-GGG-GTC-AGC-ACC-TGG-ATA	121
<i>3βhsd</i>	Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isomerase 1	NM_001007719	F: AGG-TCC-TGA-TGC-CCT-CTT-TT R: TGT-CAT-TGC-TGA-AGC-CTT-TG	159
<i>Cnx-43</i>	Connexin-43	NM_012567.2	F: TCC-TTG-GTG-TCT-CTC-GCT-TT R: GAG-CAG-CCA-TTG-AAG-TAG-GC	167
<i>Cyp11a1</i>	Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1	NM_017286.3	F: AAG-TAT-CCG-TGA-TGT-GGG R: TCA-TAC-AGT-GTC-GCC-TTT-TCT	127
<i>Cyp17a1</i>	Cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	NM_012753.3	F: TGG-CTT-TCC-TGG-TGC-ACA-ATC R: TGA-AAG-TTG-GTG-TTC-GGC-TGA-AG	90
<i>Cyp19a1</i>	Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1	NM_017085.3	F: CGT-CAT-GTT-GCT-TCT-CAT-CG R: TAC-CGC-AGG-CTC-TCG-TTA-AT	150
<i>Gapdh</i>	Gluceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM-017008.4	F: AGT-GCC-AGC-CTC-GTC-TCA-TA R: GAC-TGT-GCC-GTT-GAA-CTT-GC	200
<i>H1t</i>	H1.6 linker histone, cluster member	NM_012579.1	F: GTA-TCA-AGC-TGG-CCC-TCA-AG R: TAG-CCT-TGG-CAG-AAG-CAG-AT	150
<i>Hsf2</i>	Heat shock transcription factor 2	NM_031694.2	F: TAA-ATG-GCT-CCT-CCA-ACC-TG R: CCA-ACA-GCT-CAA-CCT-TTC-CTA	99
<i>N-Cdh</i>	N-Cadherin	NM_031333.1	F: GAG-CCG-ATG-AAG-GAA-CCA-CA R: CCT-TTG-TAG-ACG-TCC-GCT-GT	81
<i>Ocln</i>	Occludin	NM_031329.3	F: AGT-GAC-TTT-GTG-TAA-CAC-TGG-TTC R: AAC-AGT-CCT-TTC-CAC-TCG-GG	129
<i>Ovol1</i>	Ovo-like transcriptional repressor 1	NM_001107512.1	F: GGG-GAG-ATC-TAC-GTG-CCA-G R: AAG-GCT-CAT-GTC-CAA-AGC-CA	114
<i>Rb1</i>	Retinoblastoma transcriptional corepressor 1	NM_017045.2	F: AGC-CCA-GCA-GTG-GGT-TAT-CT R: CAG-GAG-GCG-AGA-GCT-TGA-TA	171
<i>Star</i>	Steroidogenic acute regulatory protein	NM_031558.3	F: CAC-AGT-CAT-CAC-CCA-TGA-GC R: AGC-TCT-GAT-GAC-ACC-GCT-TT	165
<i>Vim</i>	Vimentin	NM_031140.1	F: AGA-TCG-ATG-TGG-ACG-TTT-CC R: CAC-CTG-TCT-CCG-GTA-TTC-GT	206
<i>Vldlr</i>	Very low density lipoprotein receptor	NM_013155.2	F: GAT-CCG-TTG-TCT-GGC-TTT-GT R: CAG-TAG-AGG-CGG-CTT-TTG-AC	158

F: forward primer; R: reverse primer





## Chapitre 2 | Effet du déoxynivalénol sur la signalisation œstrogénique

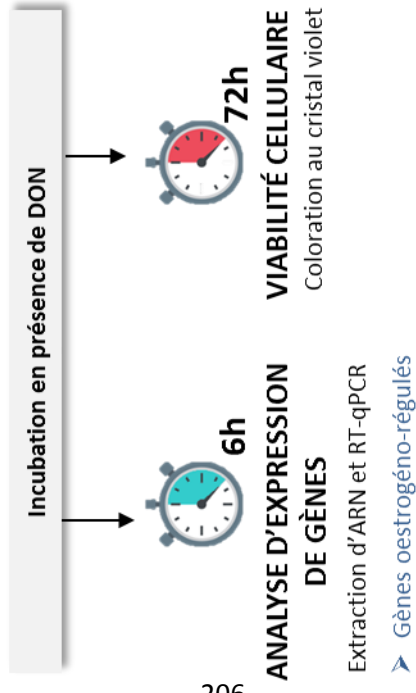
### – Avant-propos –

Le second chapitre de cette thèse concerne l'étude des effets du déoxynivalénol sur la signalisation œstrogénique. Pour cela, une approche *in vitro* sur les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 a été conduite. Ces travaux ont donné lieu à un article soumis à la revue *Food and Chemical Toxicology* :

- ❖ **Article 4** : Deoxynivalenol enhances estrogen receptor alpha-induced signaling by ligand independent transactivation (en révision)



## Lignée cellulaire MDA-MB-231



## Lignée cellulaire MCF-7

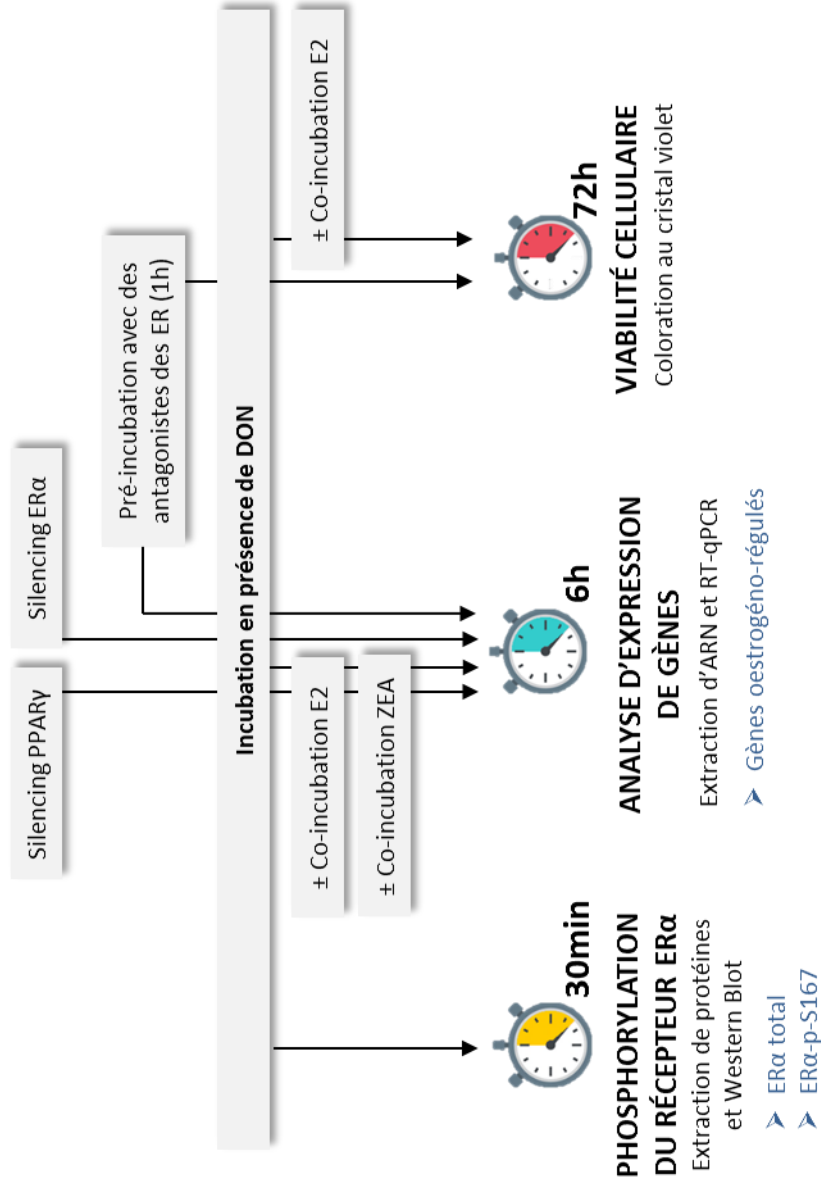


Figure 34 : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude *in vitro* des effets du DON sur la signalisation oestrogénique

## Deoxynivalenol enhances estrogen receptor alpha-induced signaling by ligand-independent transactivation

*M. Drouault, C. Delalande, H. Bouraïma-Lelong, V. Seguin, D. Garon, V. Hanoux*

Soumis à *Food and Chemical Toxicology*, en révision

### ❖ Contexte de l'étude

Des travaux menés par d'autres groupes de recherche (Long et al., 2017 ; Zheng et al., 2016 ; Zatecka et al., 2014) ainsi que notre étude *ex vivo* sur le testicule de rat prépubère (**Article 3**) ont démontré la sensibilité de la gonade mâle à la zéaralénone (ZEA). Certains champignons responsables de la synthèse de la ZEA (*F. graminearum* et *F. culmorum*) produisant également le déoxynivalénol (DON), les aliments contaminés par la première sont fréquemment contaminés simultanément par le second.

A l'instar de la ZEA, le DON exerce des effets délétères sur la santé animale et humaine. Ces effets sont principalement la conséquence de son mécanisme d'action ribotoxique, qui fait du DON un puissant inhibiteur de la synthèse protéique (Cundliffe & Davies, 1977 ; Ueno, 1978). Cependant, un petit nombre d'études *in vitro* suggère l'existence d'autres mécanismes d'action (Demaegdt et al., 2016 ; Ndossi et al., 2012). Ces données nous ont conduits à émettre l'hypothèse que le DON pourrait moduler la signalisation œstrogénique. Notamment, le DON exerce une activité antagoniste sur le récepteur PPAR $\gamma$  (Demaegdt et al., 2016), dont l'activation induit la dégradation du récepteur ESR1 par le protéasome (Suzuki et al., 2006 ; Qin et al., 2003).

Ainsi, la dernière partie de ces travaux a été consacrée à l'étude des effets et des mécanismes d'action du DON sur la signalisation œstrogénique grâce à une approche *in vitro* conduite dans les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231. Cette étude est conduite en amont de futurs travaux qui évalueront l'effet du DON dans le testicule de rat prépubère grâce au modèle de culture organotypique développé au cours de cette thèse.

### ❖ Dispositif expérimental

Les effets du DON sur la signalisation œstrogénique ont été étudiés grâce à une approche *in vitro* conduite dans les lignées de carcinome mammaire MCF-7 et MDA-MB-231 (**Figure 33**). Ces lignées cellulaires sont couramment utilisées comme modèle pour l'étude de la signalisation œstrogénique en raison de leur profil d'expression des différents récepteurs aux œstrogènes :

- cellules MCF-7 : expriment ESR1, n'expriment pas ESR2, expriment GPER
- cellules MDA-MB-231 : n'expriment ni ESR1 ni ESR2, expriment GPER

L'effet du DON ( $10^{-13}$ - $10^{-6}$  M) sur la viabilité des cellules des deux lignées a été évalué par coloration au cristal violet après une exposition de 72 h. Par la suite, les effets du DON ( $10^{-6}$  à  $10^{-4}$  M) sur l'expression de gènes œstrogéno-régulés a été étudié par RT-qPCR après une exposition de 6 h. Afin d'identifier les récepteurs et les voies de signalisations impliquées dans les effets du DON sur l'expression de ces gènes, nous avons utilisé des antagonistes de GPER (G36 ;  $10^{-5}$  M) et ESR1 (4-hydroxytamoxifène ;  $10^{-6}$  M), éteint l'expression génique de PPAR $\gamma$  et ESR1 par transfection de petits ARN interférents (siARN), et étudié le niveau de phosphorylation du récepteur ESR1 par Western Blot (après une exposition au DON de 30 min). Ces paramètres ont été étudiés en présence de DON seul ou en cocktail avec l'E2 ( $10^{-10}$  M) ou la ZEA ( $10^{-7}$  M).

#### ❖ Résultats majeurs de l'étude

- Le DON diminue la viabilité des cellules en culture
- Le DON augmente l'expression des gènes œstrogéno-régulés
- Cet effet n'est pas aboli par le G36, ni par l'extinction de l'expression génique de PPAR $\gamma$
- Cet effet est partiellement aboli par le 4-hydroxytamoxifène et par l'extinction de l'expression génique d'ESR1
- Le DON induit la phosphorylation du résidu sérine 167 du récepteur ESR1
- Le DON et la ZEA ainsi que le DON et l'E2 exercent un effet plus important que chaque composé seul sur l'expression des gènes œstrogéno-régulés

#### ❖ Conclusion de l'étude

Cette étude démontre, pour la première fois à notre connaissance, une induction de la signalisation œstrogénique par le DON *in vitro*. Les différentes stratégies mises en place dans cette étude indiquent que l'activation de la signalisation œstrogénique induite par le DON résulte de l'activation du récepteur ESR1 selon la voie indépendante du ligand. De plus, cette étude met en évidence un effet additif du DON et de la ZEA ou de l'E2 sur l'induction de la signalisation œstrogénique dans les cellules MCF-7.





# Deoxynivalenol enhances estrogen receptor alpha-induced signaling by ligand-independent transactivation.

M. Drouault<sup>a</sup>, C. Delalande<sup>a</sup>, H. Bouraïma-Lelong<sup>a</sup>, V. Seguin<sup>b</sup>, D. Garon<sup>b</sup>, V. Hanoux<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Normandie Univ, UNICAEN, OeReCa, 14000 Caen, France

<sup>b</sup> Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, 14000 Caen, France

Correspondence should be address to V. Hanoux, UNICAEN EA2608 OeReCa, Esplanade de la Paix, CS 14032, 14032 Caen cedex 5. email: [vincent.hanoux@unicaen.fr](mailto:vincent.hanoux@unicaen.fr)

## **ABSTRACT**

Deoxynivalenol (DON), one of the prevalent mycotoxins in food and feeds exerts adverse effects on animal and human health. These effects are mainly associated to its ribotoxic properties, but few studies suggest the involvement of other action mechanisms. To assess DON's ability to disrupt estrogens signaling, we conducted an *in vitro* study using MCF-7 and MDA-MB-231 cells. After 72h, DON reduced cell viability in both cell lines, highlighting its well-known cytotoxic effect after a long exposure. However, after 6h, DON ( $10^{-5}$  and  $10^{-4}$ M) increased estrogens-responsive genes expression, demonstrating stimulation of estrogens signaling by this mycotoxin after a short exposure. This effect was partially reversed by siRNA-mediated silencing of *ER $\alpha$*  expression and by 4-hydroxytamoxifen (*ER $\alpha$*  antagonist), but not by G36 (*GPER* antagonist) nor by siRNA-mediated silencing of *PPAR $\gamma$ 2* expression. Moreover, DON exposure induced an increase in *ER $\alpha$*  phosphorylation level at serine 167. Furthermore, DON in cocktail with zearalenone (a naturally co-occurring mycotoxin recognized as an endocrine disruptor) increased estrogens-responsive genes expression to a greater extent than each compound alone. Taken together, our results suggest, for the first time, that DON can disrupt estrogens signaling through ligand-independent activation of *ER $\alpha$* , and demonstrated a combined effect of DON and zearalenone.

## **KEYWORDS**

mycotoxins; deoxynivalenol; zearalenone; estrogens receptors; endocrine disruptors; *in vitro*

## 1. Introduction

Mycotoxins are natural occurring toxicants, first defined as “fungal metabolites which when ingested, inhaled or absorbed through the skin cause lowered performance, sickness or death in man or domestic animal” (Pitt, 1996). Mycotoxic fungi develop on a large variety of crops (cereals, fruits, nuts), thus inducing food chain contamination by mycotoxins and making ingestion the first route of exposure to these compounds (Zain, 2011). Because of their adverse effects on animal and human health (Richard, 2007) and their widespread occurrence (Eskola et al., 2020), mycotoxins are raising global concerns. Consequently, in a recent press release, the World Health Organization (WHO) pointed out the necessity to take measures against mycotoxin contamination, especially in developing countries (WHO, 2016).

Nowadays, over 300 mycotoxins have been identified, but only a few of them exhibit a concerning toxicological profile. Zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON), both produced by *Fusarium* genus, are at once among the most abundant mycotoxins in food and feeds (Garon et al., 2006; Ma et al., 2018), and at the same time the most concerning ones. Indeed, DON and ZEA have been described to be cytotoxic, genotoxic, immunotoxic, hepatotoxic and could also disrupt the endocrine system, such as the estrogens signaling pathway (Sobrova et al., 2010; Zinedine et al., 2007).

Estrogens are steroid hormones involved in various biological functions. Among them, 17- $\beta$ -estradiol (E2) is the most represented and the most active estrogens. E2 mainly acts through binding to 3 specific estrogen receptors (ER), namely ER $\alpha$  and ER $\beta$  (nuclear receptors encoded by *ESR1* and *ESR2* genes respectively) and GPER (a G-protein coupled receptor associated to the cell membrane; also called GPR30), consequently activating transcriptional processes and/or intracellular signaling cascades. Briefly, estrogens signaling consists in 4 pathways: 1) the direct genomic mechanism involves cytoplasmic ER $\alpha$  and ER $\beta$  activated by ligand binding which dimerize, translocate to the nucleus and bind to DNA of their target-genes directly on specific motifs named estrogen responsive elements (ERE) 2) the indirect genomic pathway requires protein-protein interactions between ligand-activated ER and other transcription factors for DNA binding 3) the non-genomic pathway is initiated by ligand binding to the transmembrane receptor GPER or to some nuclear receptors associated to the cell membrane by palmitoylation, and activates rapid signaling cascades in the cytoplasm 4) the ligand-independent transactivation of nuclear ER could occur in absence of E2 and is mainly triggered by ER phosphorylation on specific amino acid residues, for the



most part serine and tyrosine (Hewitt and Korach, 2018). The existence of cross-talks between the above mentioned pathways make estrogens signaling an even more complex system which could be disrupted by many exogenous compounds.

ZEA, formerly known as F-2 toxin, is a non-steroidal estrogenic mycotoxin, mainly associated to reproductive and developmental disorders in male (Tsakmakidis et al., 2006; Zatecka et al., 2014) and female (Zhao et al., 2014). ZEA exposure induces fertility disorders (subfertility or infertility), an increase in fetal resorption, a reduced litter size, and hyperestrogenic syndrome (Kuiper-Goodman et al., 1987; Ropejko and Twarużek, 2021). These adverse effects are related to the structural similarity between ZEA and estrogens, allowing its binding to ER $\alpha$  and ER $\beta$  (Kuiper et al., 1998). Thus, ZEA can modulate estrogens signaling and is therefore recognized as an endocrine disruptor.

DON is a trichothecene B mycotoxin, also referred to as “vomitoxin” because of its emetic effects, particularly severe in porcines. In humans, the main risks associated to DON exposure involved the intestinal system, the central nervous system and the immune system. Acute ingestion of DON results in illness characterized by vomiting, anorexia, abdominal pain, diarrhea, malnutrition, headache, dizziness and fever (Escrivá et al., 2015; Sobrova et al., 2010). Other studies conducted in rodents also suggest a negative impact of DON on reproductive organs in male (Gao et al., 2019; Sprando et al., 2005). DON’s adverse effects are mainly the consequence of its well-known ribotoxic effect. Indeed, at the cellular level, DON binds to the 60S ribosomal subunit and interferes with the active site of peptidyltransferase. This interaction leads to the inhibition of peptide bond formation, making DON a potent inhibitor of protein synthesis (Cundliffe and Davies, 1977; Ueno, 1978).

Nonetheless, a few *in vitro* studies suggested other mechanisms of action. Notably, DON could modulate the expression of most of the steroidogenic genes in the H295R cell line, consequently leading to an altered steroid hormone production (Ndossi et al., 2012). Interestingly, the latter point has been identified as one of the ten key characteristics of endocrine disruptors (La Merrill et al., 2020). The ability of DON to act as an agonist on ER has been studied, but no estrogenic activity of this mycotoxin has been demonstrated. However, DON has been reported as an antagonist of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  type 2 (PPAR $\gamma$ 2) (Demaegdt et al., 2016). Since PPAR $\gamma$ 2 activation is known to inhibit estrogens signaling through proteasome-mediated degradation of ER $\alpha$ , DON could

indirectly modulate estrogens signaling through its inhibitory effect of PPAR $\gamma$ 2 activity (Qin et al., 2003; Suzuki et al., 2006).

The aim of this study was to characterize DON's effect on estrogens signaling and also to investigate the mechanisms involved. We conducted an *in vitro* study using MCF-7 (ER $\alpha$ -positive) and MDA-MB-231 (ER $\alpha$ -negative) cells, two breast carcinoma cell lines commonly used to characterized disruption of estrogens signaling (Hanoux et al., 2018). The cytotoxic properties of DON were assessed in both cell lines by crystal violet assay after a long-term (72h) exposure. Short-term (6h) exposure was also performed to evaluate DON's effect on estrogens-responsive genes expression by RT-qPCR, and its action mechanism on estrogens signaling was characterized using ER specific antagonists, silencing of *ESR1* and *PPAR $\gamma$ 2* gene expression and assessing ER $\alpha$  phosphorylation level. The above mentioned endpoints were investigated with DON alone or in cocktail with E2 or ZEA.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Chemicals and material.**

Culture plates and flasks were provided by Falcon. DMEM/Ham's F12 ( $\pm$  phenol red), Fetal Bovine Serum (FBS) and OptiMEM were obtained from Gibco. Dimethyl sulfoxide (DMSO), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), 17- $\beta$ -estradiol (E2), Epidermal Growth Factor (EGF), 4-hydroxitamoxifen (4-OH-TAM), crystal violet, sodium dodecyl sulfate (SDS), Tris-HCl, dithiothreitol (DTT), bromophenol blue, Tween 20,  $\beta$ -mercaptoethanol and RNase free water were purchased from Sigma Aldrich. G36 was provided by Tocris, phosphate buffered saline (PBS) by PAN (Dutscher), Lipofectamin RNAiMax by Invitrogen, acrylamide/bis 37:1 40% (w/v) solution by Eurobio, and Pink Prestained Protein Marker by Nippongenetics. Nitrocellulose membrane, enhanced chemiluminescence (ECL) and hyperfilm ECL were obtained from Amersham. NucleoZOL was purchase from Macherey-Nagel. Murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT), deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), random primers, ribonuclease inhibitor (RNasin $\text{\textcircled{R}}$ ) and GoTaq qPCR master mix were purchased from Promega. Primers used for qPCR were obtained from Eurogentec, as well as small interfering RNA (siRNA) targeting *ESR1* mRNA (*ESR1*-siRNA) and *PPAR $\gamma$ 2* mRNA (*PPAR $\gamma$ 2*-siRNA). Control siRNA-A was obtained from Santa Cruz Biotechnology. Mouse monoclonal anti-ER $\alpha$  (F-10) (sc-8002) antibody was also obtained from Santa Cruz Biotechnology, rabbit polyclonal anti-phospho-ER $\alpha$ -S167 (AP0508) antibody was purchased from Diagnostics, and the secondary antibodies (goat anti-mouse IgG HRP-linked (#7076) and goat anti-rabbit IgG HRP-linked (#7074)) were obtained from Cell Signaling Technologies.

## 2.2 Cell lines and cell culture.

Human breast carcinoma cell lines MCF-7 (ATCC-HTB-22) and MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) were routinely maintained in DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% FBS at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. To overcome any estrogenic activity, cells were starved from steroid 48h before experiments and cultured in a phenol red-free DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% charcoal-stripped FBS. All experiments were conducted in this steroid-depleted culture medium. The tested compounds were dissolved in ethanol (DON, E2 and ZEA) or DMSO (4-OH-TAM and G36) and extemporaneously diluted in the steroid-depleted culture medium at suitable concentrations.

## 2.3 Cell viability assay.

The cytotoxic properties of DON in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines were determined by the crystal violet cell proliferation assay. Both cell lines were seeded at  $4 \times 10^3$  cells/well in 96-well plates. In order to determine the number of cells after treatment, a cell range ( $4 \times 10^3$ ;  $8 \times 10^3$ ;  $1.6 \times 10^4$ ;  $3.2 \times 10^4$  cells/well) was performed. In parallel, cells were pre-incubated for 45 min in presence or absence of G36 ( $10^{-5}$  M) and then treated with DON ( $10^{-6}$  M); or incubated with E2 ( $10^{-10}$  M) and increasing concentrations of DON ( $10^{-13}$  to  $10^{-6}$  M) for 72h. Cells were then fixed with 4% formaldehyde (20 min, RT), washed twice with PBS and stained with 0.2% crystal violet (30 min, RT). The staining step was followed by two washing with deionized water, and crystal violet dye was then extracted using 10% acetic acid. Absorbance was read at 600 nm using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific). Results are expressed as a percentage of cells number relative to the control condition.

## 2.4 Silencing of *ESR1* and *PPAR $\gamma$ 2* gene expression.

MCF-7 cells were harvested and transfected with siRNA targeting *ESR1* mRNA (ESR1-siRNA) (5'-UCAUCGCAUCCUUGCAAAdTdT-3'; 5'-UUUGCAAGGAAUGCGAUGAdTdT-3'), *PPAR $\gamma$ 2* mRNA (PPAR $\gamma$ 2-siRNA) (5'-GGGUGAAACUCUGGGAGAUdTdT-3'; 5'-AUCUCCCAGAGUUUCACCCdTdT-3') or an off-target siRNA used as negative control (control-siRNA) (control siRNA-A, Santa Cruz). Briefly, siRNAs were diluted in OptiMEM medium to a final concentration of 6 pM and transfected into MCF-7 cell suspension using Lipofectamine RNAiMax according to the manufacturer's instructions. Cells were then seeded at  $7.5 \times 10^5$  cells/well in 24-well plates for 24h (PPAR $\gamma$ 2-siRNA-MCF-7 cells) or 48h (ESR1-siRNA-MCF-7 cells) prior experiments.

## 2.5 RNA extraction and RT-qPCR.

Cells were seeded at  $1.8 \times 10^5$  cells/well in a 24-well (MCF-7) or 6-well (MDA-MB-231) plate and were allowed to adhere for 24h. Cells were pre-incubated for 45 min in presence or absence of the tested agents (4-OH-TAM at  $10^{-6}$  M or G36 at  $10^{-5}$  M) and then cultured for 6h with various concentrations of DON and/or E2 ( $10^{-10}$  M) or ZEA ( $10^{-7}$  M), as described in the results section. RNA extraction was performed using NucleoZOL reagent according to the manufacturer's instructions. 250 ng of total RNA was reverse transcribed in a final volume of 20  $\mu$ L using 100 U of M-MLV reverse transcriptase in the presence of 1mM of dNTPs, 100 ng of random primers and 12 U of RNasin®, for 1h at 37°C. The enzyme was then heat denatured for 10 min at 72°C to stop the reaction. A negative control was performed by omitting M-MLV reverse transcriptase. The cDNAs obtained were diluted (1:10 in RNase free water) and qPCR was performed with the C1000 Thermal Cycler CFX96 Real Time System (Biorad) using GoTaq qPCR master mix. Each reaction was prepared according to the manufacturer's protocol in a final volume of 20 $\mu$ L. For negative control, cDNA template was replaced by RNase free water. The primers used and the size of PCR products are listed in Table 1. The amplification program consists in an initial step of 3 min at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 30s and 60°C for 1min. PCR products' specificity was assessed by running a dissociation curve after the amplification reactions. The expression levels of target genes were normalized with the *GAPDH* gene. The relative expression levels were determined by the  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  method. Expression levels of 3 estrogens-responsive genes were analysed: trefoil factor 1 (*TFF1/PS2*) under nuclear ER control (direct genomic pathway) (Brown et al., 1984); progesterone receptor (*PR*) under nuclear ER control (indirect genomic pathway) (Read et al., 1988); connective tissue growth factor (*CTGF*) under GPER control (Pandey et al., 2009).

## 2.6 Protein extraction and Western blot.

MCF-7 cells were seeded at  $6 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate and allowed to adhere for 24h. Cells were incubated for 30 min in presence of the tested compounds (DON at  $10^{-5}$  M; EGF at 10 ng/mL), washed twice in PBS and lysed in SDS-lysis buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol; 50 mmol/L DTT; 0.01 % (w/v) bromophenol blue). Total proteins were sonicated for 10 s using Vibra-Cell™ ultrasonic processor (Bioblock Scientific). Equals volume of samples were heat-denatured, loaded on a 12% SDS-polyacrylamide gel and separated by electrophoresis. Thereafter, proteins were transferred to hybond ECL nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites were blocked for 1h at room temperature with Tris-Buffered Saline supplemented with 0.1% Tween 20 (TBST) and

5% non-fat dried milk. Membranes were then incubated with anti-phospho-ER $\alpha$ -S167 primary antibody diluted in TBST-5% non-fat dried milk (1:500) overnight at 4°C. After 3 washing with TBST, membranes were incubated with goat anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody (1:2000 in TBST-5% non-fat dried milk) for 1h at room temperature. Membranes were washed again in TBST and the signals were developed by incubating membranes with ECL and exposing them to hyperfilm ECL. Membranes were stripped with 100mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7 for 30min at 50°C, washed twice with TBST and then reprobed with anti-ER $\alpha$  primary antibody (1:1000 in TBST-5% non-fat dried milk) as described above. Quantitative results were obtained using the Image J software and normalized against the corresponding total ER $\alpha$  value.

### **2.7 Statistical Analysis.**

Results are shown as means  $\pm$  SEM for at least 3 independent experiments. Statistical analysis of the data was achieved using the GraphPad Prism software. Statistical comparisons were performed using a paired *t*-test (comparison between 2 groups) or a one-way analysis of variance (ANOVA) (comparison between 3 or more groups) followed by a Bonferroni post-hoc test. *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## **3. Results**

### **3.1 DON exposure decreases cell viability in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines.**

In order to first investigate DON's effect on estrogens signaling, a crystal violet cell proliferation assay was conducted in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines after a 72h exposure. In MCF-7 cells, DON at concentrations ranging from  $10^{-13}$  M to  $10^{-7}$  M had no effect on cell viability. However, DON  $10^{-6}$  M induced an approximately 40% decrease in MCF-7 cells number compare to the control (Fig. 1A). By contrast, in MDA-MB-231 cells, DON exerted a negative impact on cell viability at all the tested concentrations (excepted for DON  $10^{-12}$  M) (Fig. 1B). DON's effect was also investigated on E2-induced proliferation of MCF-7 cells. Thus, as expected, E2 ( $10^{-10}$  M) alone induced a great 6-fold increase in MCF-7 cells number. Addition of DON at concentrations ranging from  $10^{-12}$  M to  $10^{-7}$  M did not modulate the E2-induced increase in MCF7 cells number. However, E2's stimulatory effect on MCF7 cells proliferation was abolished in presence of DON  $10^{-6}$  M (Fig. 1C).

To further investigate if GPER could be involved in DON's effect on cell viability, the selective GPER antagonist G36 was used. As described above, DON  $10^{-6}$  M led to a decrease of about 50% in MCF-7 cells number. G36 ( $10^{-5}$  M) alone had no effect on cell viability. Moreover, G36 ( $10^{-5}$  M) did not modulate the DON-induced decrease in MCF7 cell number (Fig 1D).

### **3.2 DON exposure induces an increase in estrogens-responsive genes expression in MCF-7 cell line.**

In order to finely assess the effect of DON on estrogens signaling, expression levels of three estrogens-responsive genes (*TFF1/PS2*, *PR* and *CTGF*) were analysed by RT-qPCR after a 6h incubation of MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines with DON. As expected, in MCF-7 cells, E2 ( $10^{-10}$  M) induced a 5- and 14.5-fold increase in *TFF1/PS2* and *PR* mRNA respectively (Fig. 2A and B). An increase in the expression of these mRNA in a lesser extent than that observed with E2 was observed when MCF-7 cells were cultured in presence of DON (Fig. 2A and B). Indeed, DON  $10^{-5}$  M and DON  $10^{-4}$  M led to a 1.5- and 2.9-fold induction of *TFF1/PS2* mRNA expression respectively (Fig. 2A), while only DON  $10^{-4}$  M was able to induce a 7.9-fold higher expression of *PR* mRNA compared to control (Fig. 2B). For *CTGF* mRNA expression, DON and E2 exhibited differential effects. Indeed, E2 ( $10^{-10}$  M) led to a down-regulation of *CTGF* mRNA expression whereas DON  $10^{-5}$  M and DON  $10^{-4}$  M induced a 9- and 46-fold increase in *CTGF* mRNA level respectively (Fig. 2C).

In MDA-MB-231 cells, E2 ( $10^{-10}$  M) had no effect on the mRNA expression of any of the estrogens-responsive genes (Fig. 2D-F). Similarly, in contrast to its stimulatory effect in ER $\alpha$ -positive cells, DON exhibited little if any effect on *TFF1/PS2* mRNA expression, and *PR* mRNA was not detected in MDA-MB-231 cells (Fig. 2D and E). However, DON at the highest concentrations still increased *CTGF* mRNA expression in this cell line, with a 5.1- and 19-fold induction after exposure to DON  $10^{-5}$  M and DON  $10^{-4}$  M respectively when compared to control (Fig. 2F).

### **3.3 DON exposure in combination with estrogenic compounds exhibits an additive effect on estrogens-responsive genes expression in MCF-7 cell line.**

Since DON alone stimulated estrogens-responsive genes expression in MCF-7 cells, effect of DON's mixture with estrogenic compounds (*i.e.* E2 or ZEA) was then investigated in this cell line. As described above, E2 ( $10^{-10}$  M) alone stimulated *TFF1/PS2* and *PR* mRNA expression (Fig. 3A and B). Moreover, E2  $10^{-10}$  M+DON  $10^{-6}$  M and E2  $10^{-10}$  M+DON  $10^{-5}$  M led

respectively to a 1.4- and 1.6-fold induction of *TFF1/PS2* mRNA expression compared to E2 alone (Fig. 3A). This effect was slightly more pronounced regarding *PR* mRNA level, with a 2.3- and 2.1-fold induction after E2  $10^{-10}$  M+DON  $10^{-5}$  M and E2  $10^{-10}$  M+DON  $10^{-4}$  M exposure respectively (Fig. 3B).

As expected, ZEA ( $10^{-7}$  M) alone increased *TFF1/PS2* and *PR* mRNA expression to a similar extent than E2 ( $10^{-10}$  M) (Fig. 3.C and D). Culture of MCF-7 cells for 6h in the presence of ZEA ( $10^{-7}$  M) and DON also exhibited a greater stimulatory effect on estrogens-responsive genes expression than ZEA alone, following the same trends as those observed for E2 ( $10^{-10}$  M) in combination with DON (Fig. 3.C and D).

#### **3.4 4-OH-TAM but not G36 partially reverses DON's effect on estrogens-responsive genes expression in MCF-7 cell line.**

To further explore the mechanisms by which DON modulates estrogens-responsive genes expression in MCF-7 cell line, selective antagonists of ER were used. 4-OH-TAM ( $10^{-6}$  M), a non-steroidal antagonist of ER $\alpha$ , partially reversed the stimulatory effect of DON on *TFF1/PS2* and *PR* gene expression. The effect was only observed for DON  $10^{-4}$  M condition in which pre-incubation with 4-OH-TAM led to a 2- and 3.8-fold decrease in *TFF1/PS2* and *PR* mRNA level respectively (Fig. 4A and B). On the other hand, pre-incubation with G36 ( $10^{-5}$  M) did not cause any difference in DON-induced *CTGF* mRNA expression compared with the relevant control condition (Fig. 4C).

#### **3.5 siRNA-mediated *ESR1* silencing partially reverses DON's effect on estrogens-responsive genes in MCF-7 cell line.**

To complete investigations of action mechanisms of DON on estrogens signaling, a siRNA-mediated *ESR1* silencing was performed in MCF-7 cell line. *ESR1* silencing was confirmed by the total abolition of E2 stimulation on *TFF1/PS2* and *PR* gene expression (Fig. 5A and B). DON-induced up-regulation of *TFF1/PS2* mRNA level was reversed for all concentrations of DON in *ESR1*-siRNA-MCF-7 cells compared to control-siRNA-MCF-7 cells (Fig. 5A). However, in *ESR1*-siRNA-MCF-7 cells, DON  $10^{-4}$  M still led to an increase in *TFF1/PS2* mRNA level compared to the control condition (Fig. 5C). On the contrary, the potent induction of *PR* mRNA expression by DON  $10^{-5}$  M and DON  $10^{-4}$  M was abolished in *ESR1*-siRNA-MCF-7 cells compared to both the corresponding condition in control-siRNA-MCF-7 cells and the control condition in *ESR1*-siRNA-MCF-7 cells (Fig 5B and D).

### **3.6 siRNA-mediated *PPAR* $\gamma$ 2 silencing does not reverse DON's effect on estrogens-responsive genes in MCF-7 cell line.**

To investigate the putative involvement of *PPAR* $\gamma$ 2 in DON's effect on estrogens-responsive genes expression, a siRNA-mediated *PPAR* $\gamma$ 2 silencing approach was conducted in MCF-7 cell line. E2- and ZEA-induced expression of *TFF1/PS2* and *PR* mRNA were increased in *PPAR* $\gamma$ 2-siRNA-MCF-7 cells compared to control-siRNA-MCF-7 cells (Fig. 6B-D). These results reflected a lift of inhibition of estrogens signaling confirming the efficacy of *PPAR* $\gamma$ 2 silencing. As demonstrated above (section 3.3), DON ( $10^{-5}$  M) in combination with E2 ( $10^{-10}$  M) or ZEA ( $10^{-7}$  M) induced *TFF1/PS2* and *PR* gene expression to a greater extent than the estrogenic compounds alone in control-siRNA-MCF-7 cells (Fig. 6). However, in these culture conditions, *TFF1/PS2* and *PR* mRNA level did not differ between control-siRNA- and *PPAR* $\gamma$ 2-siRNA-MCF-7 cells (Fig. 6).

### **3.7 DON exposure induces ER $\alpha$ phosphorylation at serine 167 in MCF-7 cell line.**

In order to explore DON's ability to activate estrogens signaling in a ligand-independent manner, the phosphorylation level of ER $\alpha$  at serine 167 (ER $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup>) was assessed by Western blotting in MCF-7 cells. EGF (10 ng/mL) was used as a positive control. After a 30 min exposure, EGF and DON ( $10^{-5}$  M) induced an increase in ER $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup> staining intensity compared to the control whereas total ER $\alpha$  staining intensity remained stable in each conditions (Fig. 7A). Thus, EGF (10 ng/mL) induced an about 2-fold increase in the level of ER $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup> compared to the control and a similar effect was obtained with DON ( $10^{-5}$  M) (Fig. 7B).

## **4. Discussion**

This work aimed to characterize DON's effect on estrogens signaling and to investigate the action mechanisms involved. Our results showed a DON-induced increase in the expression of estrogens-responsive genes, demonstrating for the first time a possible activation of the estrogens signaling pathway by this mycotoxin. Moreover, the different approaches conducted here allowed us to determine the mechanisms through which DON exerts its estrogen-mimetic effects and support a ligand-independent activation of ER $\alpha$ .



It is well known that MCF-7 cells strongly express ER $\alpha$  and depend on E2 to proliferate. As expected, a 72h exposure to E2 ( $10^{-10}$  M) resulted in a potent increase in MCF-7 cells number compared to control. DON did not trigger such stimulation of MCF-7 cells proliferation, indicating no estrogenic effect considering this endpoint. On the contrary, DON ( $10^{-6}$  M) decreased basal and E2-stimulated proliferation of MCF-7 cells. In this regard, the ER $\alpha$ -negative cell line appears to be more sensitive to DON than MCF-7 cell line, since concentrations as low as  $10^{-13}$  M of DON reduced MDA-MB-231 cells number. Interestingly, GPER activation has been shown to inhibit both MCF-7 and MDA-MB-231 cells viability (Ariazi et al., 2010; Huang et al., 2020) suggesting a putative activation of GPER in the DON-induced decrease in viability of these cell lines. However, G36 failed to reverse this effect, demonstrating that GPER was not involved in the DON-induced decrease in MCF-7 and MDA-MB-231 cells viability. Thus, these results obtained after a 72h exposure are thought to underlie the commonly reported cytotoxic effect of DON rather than an effect on estrogens signaling. Nonetheless, some studies suggest that shorter exposures may not result in such outcome. Indeed, in a bone marrow-derived cell line, DON ( $25$  and  $50 \times 10^{-6}$  M) decreased cell viability after a 24h exposure but not after 6h (Kalagatur et al., 2021). Likewise, in mouse endometrial stromal cells exposed to DON (100 ng/mL), a decrease in cell viability was observed for the longest (24h and 48h) but not the shortest (6h and 12h) exposures (Dai et al., 2017). These studies indicate that DON's cytotoxic effect is time-dependent. Since long exposure could mask other effects due to the strong cytotoxic properties of DON, the other experiments performed in our study to investigate the effect of DON on estrogens signaling were conducted after a short exposure (6h), which could be considered as safe regarding cytotoxicity.

After a 6h exposure, a DON-induced expression of estrogens-responsive genes *TFF1/PS2*, *PR* and *CTGF* was observed, indicating that DON in the range of micromolar concentrations ( $10^{-5}$  M and  $10^{-4}$  M) could activate estrogens signaling *in vitro*. This effect was also observed when DON was combined to estrogenic compounds, *i.e.* E2 ( $10^{-10}$  M) and ZEA ( $10^{-7}$  M) with a much more effect than that measured for each compound alone. To our knowledge, this is the first report describing a such estrogenic effect of DON. Previous studies investigated the possible endocrine activity of DON in a reporter cell line developed by Willemsen and collaborators by transfecting MCF-7 cells with the luciferase gene under the control of ERE (MMV-Luc cell line) (Willemsen et al., 2004). In contrast with our results, these other studies reported no agonist activity of DON ( $10^{-6}$  M) on ER in the MMV-Luc cell line after a 24h

exposure, indicating no effect of DON on estrogens signaling (Demaegdt et al., 2016; Ndossi et al., 2012). We attribute this striking discrepancy, at least in part, to the concentrations used in the experiments. Indeed, the above mentioned works used DON at the concentration of  $10^{-6}$  M, based on previous assays indicating that greater concentrations caused an over 10% decrease in cell viability after a 24h incubation. However, the much shorter exposure (6h) performed in our study allowed to overcome any cytotoxic effect of DON. Thus, we could investigate DON's effect at higher concentrations ( $10^{-5}$  M and  $10^{-4}$  M), *i.e.* those which appeared to result in induction of estrogens-responsive genes expression. Furthermore, the reporter gene in MMV-Luc cell line is under the control of ERE, so this approach focused on assessing DON's ability to mainly activate the direct genomic pathway. However, estrogens signaling involves numerous pathways and is made more complex by the existence of cross-talks between them. The various strategies employed in our study to assess DON-induced transcriptional activity of estrogens-responsive genes provided an overview of the mechanisms possibly involved.

The possible interaction between DON and GPER has not yet been studied, although this receptor has recently emerged as a mediator of endocrine disruptor's action (Périan and Vanacker, 2020). The potent increase in *CTGF* gene expression observed in both cell lines after a 6h exposure to DON ( $10^{-5}$  M and  $10^{-4}$  M) suggests the involvement of GPER in DON-mediated effects on estrogens signaling. However, this effect was not reversed by G36, indicating that the DON-induced expression of *CTGF* gene is likely to be GPER-independent. These results are in correlation with our results on DON effect on cellular viability which demonstrated no involvement of GPER. Therefore, DON seems not to be able to activate GPER and the increase in *CTGF* mRNA expression should be attributed to activation of others signalling pathways than estrogens signalling, such as PI3K/Akt pathway, which was reported to increase expression of *CTGF* gene (Xu et al., 2015).

DON up-regulated *TFF1/PS2* and *PR* gene expression in MCF-7 (ER $\alpha$ -positive) cells, but has no effect on the expression of ER $\alpha$ -regulated genes in MDA-MB-231 (ER $\alpha$ -negative) cells. These results show that the DON's effects on estrogens signaling could be mediated by ER $\alpha$ . DON has been reported to antagonize PPAR $\gamma$ 2 (Demaegdt et al., 2016). Since PPAR $\gamma$ 2 activation is known to inhibit ER $\alpha$ -mediated estrogens signaling (Qin et al., 2003; Suzuki et al., 2006), the DON-induced disruption of this pathway described in our study could be explain by inhibition of PPAR $\gamma$ 2. In order to investigate this possibility, a siRNA-mediated silencing of *PPAR $\gamma$ 2* mRNA expression was conducted. DON's effect on E2- and ZEA-

stimulated expression of *TFF1/PS2* and *PR* gene remained identical after *PPAR* $\gamma$ 2 silencing, indicating that the mechanism by which DON promotes estrogens signaling is independent of the inhibition of *PPAR* $\gamma$ 2 activity.

So, the increase in *TFF1/PS2* and *PR* gene expression following DON exposure suggests the involvement of either direct or indirect genomic pathway respectively. The latter point is further supported by the abolition of DON-induced expression of *PR* gene following *ESR1* silencing in MCF-7 cells. However, 4-OH-TAM do not fully reversed the DON-induced expression of these genes, indicating that DON's effect on estrogens signaling is likely to be mediated by *ER* $\alpha$  but likely not through the classical ligand-dependent pathway.

The ligand-independent activation of estrogens signaling is based on phosphorylation of the receptor on specific residues. Among the numerous phosphorylation sites identified in the amino-terminal domain of *ER* $\alpha$ , Ser<sup>167</sup> is of particular interest in MCF-7 cells because its phosphorylation has been associated to 4-OH-TAM resistance in breast cancer cells (Campbell et al., 2001; Jiang et al., 2007). After a 30 min exposure, DON (10<sup>-5</sup> M) increased *ER* $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup> to a similar extent than EGF (10 ng/mL), used as a positive control, indicating that DON could modulate estrogens signaling by ligand-independent activation of *ER* $\alpha$ . In MCF-7 cells, *ER* $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup> could be elicited by various pathways, including PI3K/Akt or MAPK pathways (Anbalagan and Rowan, 2015; Campbell et al., 2001; Clark et al., 2001; Lannigan, 2003; Yamnik and Holz, 2010). Interestingly, DON has been described to be able to activate those signaling pathways. Indeed, *in vivo* studies demonstrated the activation of PI3K/Akt and MAPK (ERK1/2, JNK, p38, p90-RSK2) pathways in mouse skin cells following dermal exposure to DON (Mishra et al., 2020, 2014). Several studies suggested that the activation of these signalling cascades could, among others, result from the “ribotoxic stress response” to DON. This mechanism appears to be common to many xenobiotics (Laskin et al., 2002) and has been extensively studied in the context of DON toxicity. In addition to its interaction with the 60S ribosomal subunit leading to inhibition of protein synthesis, DON has also been shown to promote the degradation of 28S rRNA which triggers the so-called ribotoxic stress response by activating the MAPK pathways (Iordanov et al., 1997; Moon and Pestka, 2002; Pan et al., 2013; Shifrin and Anderson, 1999). The hypothesis of the possible involvement of p90-RSK2 in the DON effects described in our study is of particular interest. Indeed, p90-RSK2 has been demonstrated to induce *ER* $\alpha$ -mediated transcription through either phosphorylation of Ser<sup>167</sup> or binding to this receptor. These two action mechanisms appear to be independent from each other and additive. Moreover,

although ER $\alpha$ -mediated transcription triggered by p90-RSK2 binding is inhibited by 4-OH-TAM, a constitutively active p90-RSK2 still induces ER $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup> in the presence of the antagonist, which is in accordance with the effects of DON reported in our study (Clark et al., 2001).

The activation of numerous signaling cascades may also explain the surprising result of the highest concentration of DON still leading to a slight increase in *TFF1/PS2* gene expression in ESR1-siRNA-MCF-7 cells. Even though this effect was sharply reduced compared to that observed in control-siRNA-MCF-7 cells, it suggests an ER $\alpha$ -independent regulation of *TFF1/PS2* gene expression. Although initially identified in MCF-7 cells and therefore described as a breast cancer-associated and estrogens-responsive gene, *TFF1/PS2* is a member of the trefoil factors family, strongly expressed by epithelial cells of the gastrointestinal tract which are actually the first target of DON following an oral exposure (Aihara et al., 2017). Porcine intestinal epithelial cells (IPEC-J2 cells) exposed to DON ( $0,5 \times 10^{-6}$  M) for 6h exhibited an increased *TFF1/PS2* mRNA level (Wang et al., 2019). This outcome was also reported in human goblet cells (HT29-16E cells) exposed to DON ( $10^{-5}$  M) for 3h or 6h (longer exposures resulting in a strong inhibition of *TFF1/PS2* mRNA expression), and was associated to the activation of PKR and MAPK (p38 and ERK1/2) pathways (Graziani et al., 2019).

Therefore, our results clearly indicate that a short exposure to DON induces ER $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup> and results in up-regulation of estrogens-responsive genes expression. This DON-mediated ligand-independent activation of ER $\alpha$  is thought to require the activation of rapid signaling cascades and/or the transactivation of the receptor by p90-RSK2. Besides, activation of rapid signaling cascades could possibly induced estrogens-responsive gene expression in an ER $\alpha$ -independent manner. Thus, the DON-induced disruption of estrogens signaling seems to result from ER-dependent pathways, but an ER-independent mechanism could also be involved. Furthermore, the existence of cross-talk between such ER-dependent and ER-independent pathways could not be excluded (Fig. 8).

Our study also demonstrates a combined effect of DON and ZEA mixture on estrogens-responsive genes expression. Indeed, DON and ZEA in cocktail increased *TFF1/PS2* and *PR* genes expression to a greater extent than ZEA alone. Exposure to DON and ZEA in combination has already been studied on various parameters including intestinal function, nephrotoxicity, sperm viability or steroid hormone production (Jia et al., 2020; Kolesarova et

al., 2017; Liang et al., 2015; Ren et al., 2017; Tassis et al., 2020). These studies reported either sub-additive, additive, or synergic effects of DON and ZEA, thus emphasising the difficulty of predicting the impact of mycotoxins mixture from individual mycotoxin effects (Thapa et al., 2021). As DON and ZEA are both produced by *Fusarium* fungi (mainly *F. culmorum* and *F. graminearum*), these mycotoxins naturally co-occurred with each other in various regions of the globe (Ma et al., 2018; Palumbo et al., 2020; van der Fels-Klerx et al., 2021), making our finding relevant regarding human and animal exposure. Assessment of the effects of DON in combination with its metabolites may also be relevant, especially since two of them, namely 3-acetylDON and 15-acetylDON, have been shown to exhibit an agonist activity on ER (Demaegdt et al., 2016).

## 5. Conclusion

Short exposure to DON results in estrogens signaling activation, evidenced by the up-regulation of estrogen-responsive gene expression, demonstrating a transient disruption of this signaling pathway induced by this mycotoxin. This effect seems not involve neither direct binding to ER $\alpha$  or GPER nor cross-talk with PPAR $\gamma$ 2 signaling, but is rather thought to be the consequence of DON-induced ligand-independent activation of ER $\alpha$  by phosphorylation. Further studies are needed to investigate the upstream mechanisms involved. Moreover, this work also supports the significance of consideration of exposure window in characterization of the effects of endocrine disruptors, since many adverse effects could occur after a short exposure time. Finally, our study highlights a combined effect of DON and ZEA on estrogens signaling disruption. Considering the natural co-occurrence of these mycotoxins, this finding is highly relevant with regard to animal and human exposure and supports the need for assessing the effects of mycotoxins in cocktail in addition to those of each compound alone.

## Acknowledgments.

The authors thank the International Square (Normandie Univ, UNICAEN) for English editing. Funding: this work was supported by the French Ministry for Higher Education and Research. Maëva Drouault was supported by funding from the Région Normandie.

## References

- Aihara, E., Engevik, K.A., Montrose, M.H., 2017. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 357–380. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105447>
- Anbalagan, M., Rowan, B.G., 2015. Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.016>
- Ariazi, E.A., Brailoiu, E., Yerrum, S., Shupp, H.A., Slifker, M.J., Cunliffe, H.E., Black, M.A., Donato, A.L., Arterburn, J.B., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Dun, N.J., Jordan, V.C., 2010. The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Inhibits Proliferation of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 70, 1184–1194. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3068>
- Brown, A.M., Jeltsch, J.-M., Roberts, M., Chambon, P., 1984. Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6344–6348.
- Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., Nakshatri, H., 2001. Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated Activation of Estrogen Receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 276, 9817–9824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010840200>
- Clark, D.E., Poteet-Smith, C.E., Smith, J.A., Lannigan, D.A., 2001. Rsk2 allosterically activates estrogen receptor  $\alpha$  by docking to the hormone-binding domain. *EMBO J.* 20, 3484–3494.
- Cundliffe, E., Davies, J.E., 1977. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, 491–499.
- Dai, Y., Xie, H., Xu, Y., 2017. Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on mouse endometrial stromal cells: Cell apoptosis and cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 572–577. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.103>
- Demaegdt, H., Daminet, B., Evrard, A., Scippo, M.-L., Muller, M., Pussemier, L., Callebaut, A., Vandermeiren, K., 2016. Endocrine activity of mycotoxins and mycotoxin mixtures. *Food Chem. Toxicol.* 96, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.033>
- Escrivá, L., Font, G., Manyes, L., 2015. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food Chem. Toxicol.* 78, 185–206. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.005>
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C.T., Hajšlová, J., Mayar, S., Krska, R., 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited “FAO estimate” of 25%. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 2773–2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- Gao, Y., Zhao, Y., Zhang, H., Zhang, P., Liu, J., Feng, Y., Men, Y., Li, L., Shen, W., Sun, Z., Min, L., 2019. Pubertal exposure to low doses of zearalenone disrupting spermatogenesis through ER $\alpha$  related genetic and epigenetic pathways. *Toxicol. Lett.* 315, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.08.007>
- Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., Lebailly, P., 2006. Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3479–3484. <https://doi.org/10.1021/jf060179i>
- Graziani, N.S., Carreras, H., Wannaz, E., 2019. Atmospheric levels of BPA associated with particulate matter in an urban environment. *Heliyon* 5, e01419.
- Hanoux, V., Eguida, J., Fleurot, E., Levallet, J., Bonnamy, P.-J., 2018. Increase in hyaluronic acid degradation decreases the expression of estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 476, 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.05.008>
- Hewitt, S.C., Korach, K.S., 2018. Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocr. Rev.* 39, 664–675. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00087>
- Huang, R., Li, J., Pan, F., Zhang, B., Yao, Y., 2020. The activation of GPER inhibits cells proliferation, invasion and EMT of triple-negative breast cancer via CD151/miR-199a-3p bio-axis. *Am. J. Transl. Res.* 12, 32.
- Iordanov, M.S., Pribnow, D., Magun, J.L., Dinh, T.-H., Pearson, J.A., Chen, S.L., Magun, B.E., 1997. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors

- of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3373–3381.
- Jia, R., Liu, W., Zhao, L., Cao, L., Shen, Z., 2020. Low doses of individual and combined deoxynivalenol and zearalenone in naturally moldy diets impair intestinal functions via inducing inflammation and disrupting epithelial barrier in the intestine of piglets. *Toxicol. Lett.* 333, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.032>
- Jiang, J., Sarwar, N., Peston, D., Kulinskaya, E., Shousha, S., Coombes, R.C., Ali, S., 2007. Phosphorylation of Estrogen Receptor- $\alpha$  at Ser<sup>167</sup> Is Indicative of Longer Disease-Free and Overall Survival in Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 13, 5769–5776. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0822>
- Kalagatur, N.K., Abd\_Allah, E.F., Poda, S., Kadirvelu, K., Hashem, A., Mudili, V., Siddaiah, C., 2021. Quercetin mitigates the deoxynivalenol mycotoxin induced apoptosis in SH-SY5Y cells by modulating the oxidative stress mediators. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 465–477.
- Kolesarova, A., Medvedova, M., Halenar, M., Sirotkin, A.V., Bulla, J., 2017. The influence of deoxynivalenol and zearalenone on steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells *in vitro*. *J. Environ. Sci. Health Part B* 52, 823–832. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1356175>
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B., Gustafsson, J.-Å., 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor B. *Endocrinology* 139, 4252–4263. [https://doi.org/0013-7227/98/\\$03.00/0](https://doi.org/0013-7227/98/$03.00/0)
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P., Watanabe, H., 1987. Risk Assessment of the Mycotoxin Zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7, 253–306.
- La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 45–57. <https://doi.org/0.1038/s41574-019-0273-8>
- Lannigan, D.A., 2003. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68, 1–9.
- Laskin, J.D., Heck, D.E., Laskin, D.L., 2002. The Ribotoxic Stress Response as a Potential Mechanism for MAP Kinase Activation in Xenobiotic Toxicity. *Toxicol. Sci.* 69, 289–291.
- Liang, Z., Ren, Z., Gao, S., Chen, Y., Yang, Y., Yang, D., Deng, J., Zuo, Z., Wang, Y., Shen, L., 2015. Individual and combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on mouse kidney. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 686–691. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.029>
- Ma, R., Zhang, L., Liu, M., Su, Y.-T., Xie, W.-M., Zhang, N.-Y., Dai, J.-F., Wang, Y., Rajput, S., Qi, D.-S., Karrow, N., Sun, L.-H., 2018. Individual and Combined Occurrence of Mycotoxins in Feed Ingredients and Complete Feeds in China. *Toxins* 10, 113. <https://doi.org/10.3390/toxins10030113>
- Mishra, S., Srivastava, S., Divakar, A., Mandal, P., Dewangan, J., Chaturvedi, S., Wahajuddin, M., Kumar, S., Tripathi, A., Rath, S.K., 2020. Celecoxib reduces Deoxynivalenol induced proliferation, inflammation and protein kinase C translocation via modulating downstream targets in mouse skin. *Chem. Biol. Interact.* 326, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109128>
- Mishra, S., Tripathi, A., Chaudhari, B.P., Dwivedi, P.D., Pandey, H.P., Das, M., 2014. Deoxynivalenol induced mouse skin cell proliferation and inflammation via MAPK pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.003>
- Moon, Y., Pestka, J.J., 2002. Vomitoxin-Induced Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Macrophages Mediated by Activation of ERK and p38 but Not JNK Mitogen-Activated Protein Kinases. *Toxicol. Sci.* 69, 373–382.
- Ndossi, D.G., Frizzell, C., Tremoen, N.H., Fæste, C.K., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G.S., Sørli, M., Connolly, L., Ropstad, E., 2012. An *in vitro* investigation of endocrine disrupting effects of trichothecenes deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 toxins. *Toxicol. Lett.* 214, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.005>
- Palumbo, R., Crisci, A., Venâncio, A., Cortiñas Abrahantes, J., Dorne, J.-L., Battilani, P., Toscano, P., 2020. Occurrence and Co-Occurrence of Mycotoxins in Cereal-Based Feed and Food. *Microorganisms* 8, 74. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010074>

- Pan, X., Whitten, D.A., Wu, M., Chan, C., Wilkerson, C.G., Pestka, J.J., 2013. Global protein phosphorylation dynamics during deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response in the macrophage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.007>
- Pandey, D.P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M., Picard, D., 2009. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J.* 28, 523–532. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.304>
- Périan, S., Vanacker, J.-M., 2020. GPER as a Receptor for Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs). *Front. Endocrinol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00545>
- Pitt, J., 1996. What are mycotoxins? *Aust Mycotoxin Newsl* 7, 1.
- Qin, C., Burghardt, R., Smith, R., Wormke, M., Stewart, J., Safe, S., 2003. Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Agonists Induce Proteasome-dependent Degradation of Cyclin D1 and Estrogen Receptor alpha in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 63, 958–964.
- Read, L.D., Snider, C.E., Miller, J.S., Greene, G.L., KatzEAEilenbogen, B.S., 1988. Ligand-modulated regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in human breast cancer cell lines. *Mol. Endocrinol.* 2, 263–271.
- Ren, Z., Deng, H., Deng, Y., Liang, Z., Deng, J., Zuo, Z., Hu, Y., Shen, L., Yu, S., Cao, S., 2017. Combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative injury and apoptosis in porcine splenic lymphocytes in vitro. *Exp. Toxicol. Pathol.* 69, 612–617. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.05.008>
- Richard, J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>
- Ropejko, K., Twarużek, M., 2021. Zearalenone and Its Metabolites—General Overview, Occurrence, and Toxicity. *Toxins* 13, 35. <https://doi.org/10.3390/toxins13010035>
- Shifrin, V.I., Anderson, P., 1999. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 13985–13992.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R., 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip. Toxicol.* 3. <https://doi.org/10.2478/v10102-010-0019-x>
- Sprando, R.L., Collins, T.F.X., Black, T.N., Olejnik, N., Rorie, J.I., Eppley, R.M., Ruggles, D.I., 2005. Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. *Food Chem. Toxicol.* 43, 623–635. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.017>
- Suzuki, T., Hayashi, S., Miki, Y., Nakamura, Y., Moriya, T., Sugawara, A., Ishida, T., Ohuchi, N., Sasano, H., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocr. Relat. Cancer* 233–250. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01075>
- Tassis, P.D., Tsakmakidis, I.A., Nagl, V., Reisinger, N., Tzika, E., Gruber-Dorninger, C., Michos, I., Mittas, N., Basioura, A., Schatzmayr, D., 2020. Individual and Combined In Vitro Effects of Deoxynivalenol and Zearalenone on Boar Semen. *Toxins* 12, 495. <https://doi.org/10.3390/toxins12080495>
- Thapa, A., Horgan, K.A., White, B., Walls, D., 2021. Deoxynivalenol and Zearalenone—Synergistic or Antagonistic Agri-Food Chain Co-Contaminants? *Toxins* 13, 561. <https://doi.org/10.3390/toxins13080561>
- Tsakmakidis, I., Lymberopoulos, A., Alexopoulos, C., Boscós, C., Kyriakis, S., 2006. In vitro Effect of Zearalenone and ?-Zearalenol on Boar Sperm Characteristics and Acrosome Reaction. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 394–401. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00679.x>
- Ueno, Y., 1978. Mode of action of trichothecenes, in: *Mycotoxins in Foodstuffs*–3. Elsevier, pp. 1737–1745.
- van der Fels-Klerx, H., Focker, M., De Rijk, T., Liu, C., 2021. Mycotoxins in wheat cultivated in the Netherlands: results from eight years of field surveys. *Mycotoxin Res.* 37, 183–192.
- Wang, Zhang, Wang, Yang, Wu, Zhang, Zhang, Yang, Qi, 2019. Deoxynivalenol Inhibits Porcine Intestinal Trefoil Factors Expression in Weanling Piglets and IPEC-J2 Cells. *Toxins* 11, 670. <https://doi.org/10.3390/toxins11110670>



- WHO, 2016. New IARC report urges action against widespread mycotoxin contamination in developing countries (Press release No. 242). International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France.
- Willemsen, P., Scippo, M.-L., Kausel, G., Figueroa, J., Maghuin-Rogister, G., Martial, J.A., Muller, M., 2004. Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 655–663. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2217-2>
- Xu, X., Dai, H., Geng, J., Wan, X., Huang, X., Li, F., Jiang, D., Wang, C., 2015. Rapamycin increases CCN2 expression of lung fibroblasts via phosphoinositide 3-kinase. *Lab. Invest.* 95, 846–859.
- Yamnik, R.L., Holz, M.K., 2010. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor  $\alpha$  serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett.* 584, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.041>
- Zain, M.E., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.* 15, 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>
- Zatecka, E., Ded, L., Elzeinova, F., Kubatova, A., Dorosh, A., Margaryan, H., Dostalova, P., Korenkova, V., Hoskova, K., Peknicova, J., 2014. Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice. *Reprod. Toxicol.* 45, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.01.003>
- Zhao, F., Li, R., Xiao, S., Diao, H., El Zowalaty, A.E., Ye, X., 2014. Multigenerational exposure to dietary zearalenone (ZEA), an estrogenic mycotoxin, affects puberty and reproduction in female mice. *Reprod. Toxicol.* 47, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.06.005>
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>

## FIGURES CAPTIONS

**Figure 1. Effects of DON on viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines.** A crystal violet cell proliferation assay was performed after: **A** and **B**, a 72h incubation with increasing concentrations of DON in (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231 cells; **C**, a 72h incubation with E2 ( $10^{-10}$  M) alone or combined with increasing concentrations of DON in MCF-7 cells; **D**, a 45 min pre-incubation in presence or absence of G36 ( $10^{-5}$  M) followed by a 72h exposure to DON ( $10^{-6}$  M) in MCF-7 cells. All results are expressed as percentage of cells number relative to the control condition. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 3 independent experiments. Statistical significance was analysed by a paired t-test (A, B and D) or an ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test (C). Different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to (A and B) the control condition, (D) the corresponding condition without DON.

**Figure 2. Effect of DON on estrogens-responsive genes expression in MCF-7 (A-C) and MDA-MB-231 cell lines (D-F).** Cells were incubated for 6h with increasing concentrations of DON or E2 ( $10^{-10}$  M). After extraction of total RNA, *TFF1/PS2* (A and D), *PR* (B and E) and *CTGF* (C and F) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *GAPDH* mRNA level. ND, not detected. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 3 (C-F) or 4 (A, B) independent experiments. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  indicate significant difference compared to control condition.

**Figure 3. Effect of DON combined with E2 (A and B) and ZEN (C and D) on estrogens-responsive genes expression in MCF-7 cell line.** Cells were incubated for 6h with E2 ( $10^{-10}$  M) and ZEN ( $10^{-7}$  M) alone or in combination with increasing concentrations of DON. After extraction of total RNA, *TFF1/PS2* (A and C) and *PR* (B and D) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *GAPDH* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 3 independent experiments. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  indicate significant difference compared to control with E2 or ZEN.

**Figure 4. Effect of ERs antagonists on DON-induced estrogens-responsive genes expression in MCF-7 cell line.** Cells were pre-incubated for 45 min with (A and B) 4-OH-TAM ( $10^{-6}$  M) or (C) G36 ( $10^{-5}$  M) and then incubated for 6h with increasing concentrations of DON. After extraction of total RNA, *TFF1/PS2* (A), *PR* (B) and *CTGF* (C) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *GAPDH* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 3 (B), 4 (C) or 5 (A) independent experiments. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the corresponding condition without antagonist.

**Figure 5. Effect of *ESR1* silencing on DON-induced estrogens-responsive genes expression in MCF-7 cell line.** MCF-7 cells were transfected with siRNA targeting *ESR1* mRNA (*ESR1*-siRNA) or an off-target siRNA (control-siRNA) used as a negative control.

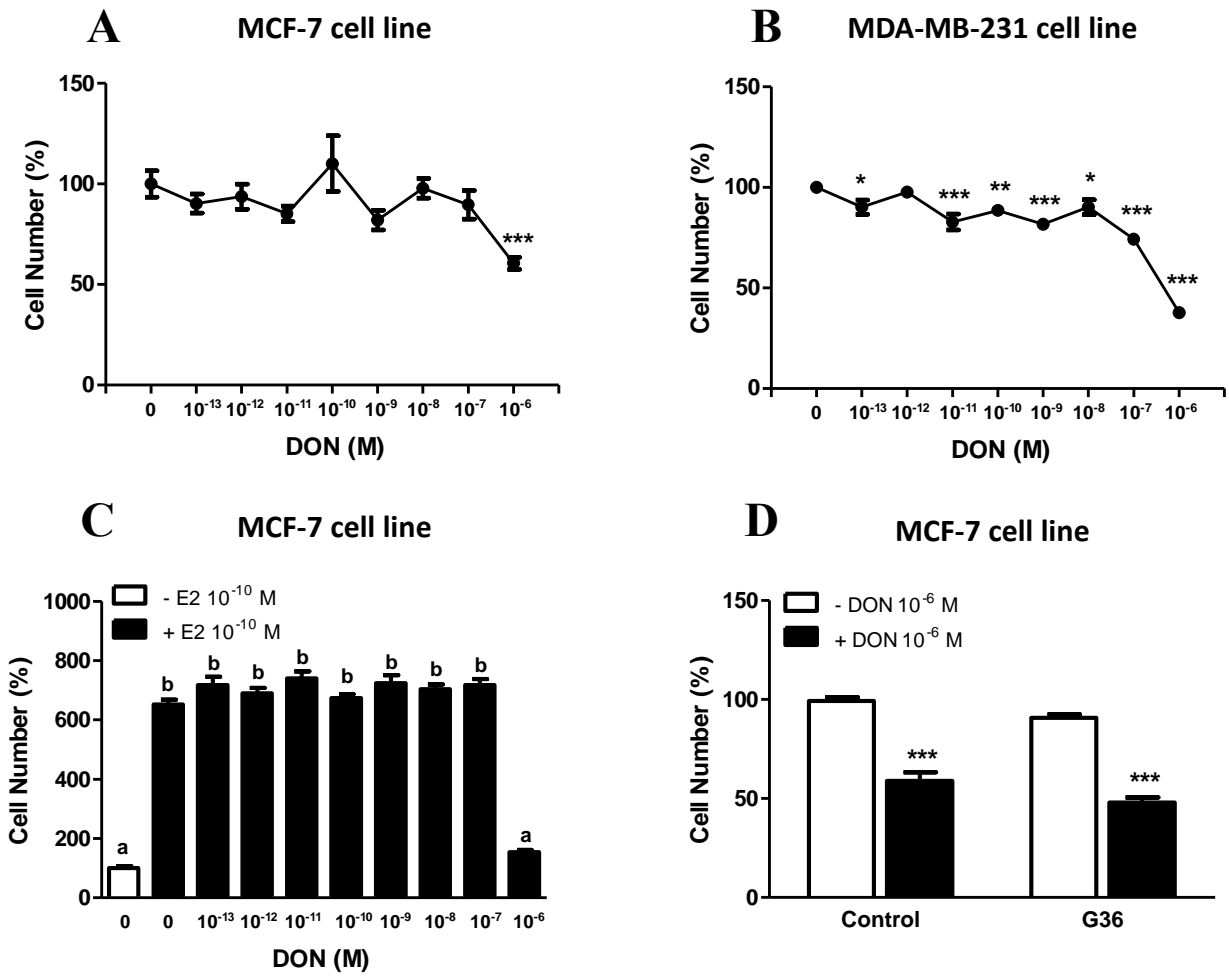
48h post-transfection, cells were incubated for 6h with increasing concentrations of DON or E2 ( $10^{-10}$  M). After extraction of total RNA, *TFF1/PS2* (A and C) and *PR* (B and D) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *GAPDH* mRNA level. A and B, results obtained for cells transfected with control-siRNA and ESR1-siRNA. C and D, focus on the results obtained for cells transfected with ESR1-siRNA only. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 3 independent experiments. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant difference compared to the corresponding condition in MCF-7 transfected with control-siRNA (A and B) or the control condition in MCF-7 transfected with ESR1-siRNA (C and D).

**Figure 6. Effect of *PPAR* $\gamma$ 2 silencing on induction of estrogens-responsive genes expression by DON combined with E2 (A and B) or ZEN (C and D) in MCF-7 cell line.** MCF-7 cells were transfected with siRNA targeting *PPAR* $\gamma$ 2 mRNA (*PPAR* $\gamma$ 2-siRNA) or an off-target siRNA (control-siRNA) used as a negative control. 24h post-transfection, cells were incubated for 6h with E2 ( $10^{-10}$  M) or ZEN ( $10^{-7}$  M) alone or in combination with DON ( $10^{-5}$  M). After extraction of total RNA, *TFF1/PS2* (A and C) and *PR* (B and D) mRNA expression was quantified by RT-qPCR, mRNA levels of the targeted genes were normalized against *GAPDH* mRNA level. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 3 independent experiments. Statistical significance was analysed by an ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. Different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

**Figure 7. Effect of DON on ER $\alpha$  phosphorylation level in MCF-7 cell line.** MCF-7 cells were incubated for 30 min with DON ( $10^{-5}$  M) or EGF (10 ng/mL), used as a positive control. ER $\alpha$  phosphorylation at serine 167 site (ER $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup>) was analysed by Western Blot from whole cell lysates. A, representative Western Blot of ER $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup>, total ER $\alpha$  served as loading control. B, diagram of ER $\alpha$  p-Ser<sup>167</sup> staining quantification obtained using the Image J software and normalized against the corresponding total ER $\alpha$  value. Data are shown as mean  $\pm$  SEM for 3 independent experiments. Statistical significance was analysed by a paired t-test. \* $p < 0.05$  indicate significant difference compared to control condition.

**Figure 8. Schematic illustration of the main outcomes of the study and the proposed mechanisms for DON's effects on estrogenic signaling in MCF-7 cells.** We demonstrate that a short 6h exposure to DON induces estrogens-responsive genes expression. This scheme summarizes the different mechanisms investigated in our study to explain this effect (boxed in bold), as well as some mechanisms non investigated in our study but suggested by our results in the light of literature data. We show that DON-induced estrogens-responsive genes expression results neither from direct binding of DON to GPER and to ER $\alpha$ , nor from its antagonistic activity on *PPAR* $\gamma$ 2. Rather, we hypothesize that DON could trigger the ribotoxic stress response or other mechanisms, thus activating intracellular signaling cascades which in turn induce the ligand-independent activation of ER $\alpha$  through the phosphorylation of the receptor at Ser<sup>167</sup> site evidenced in our study. Activation of such signaling cascades could also induce *TFF1/PS2* and *CTGF* gene expression in an ER-independent manner, as observed in our study.

Figure 1



**Figure 2**

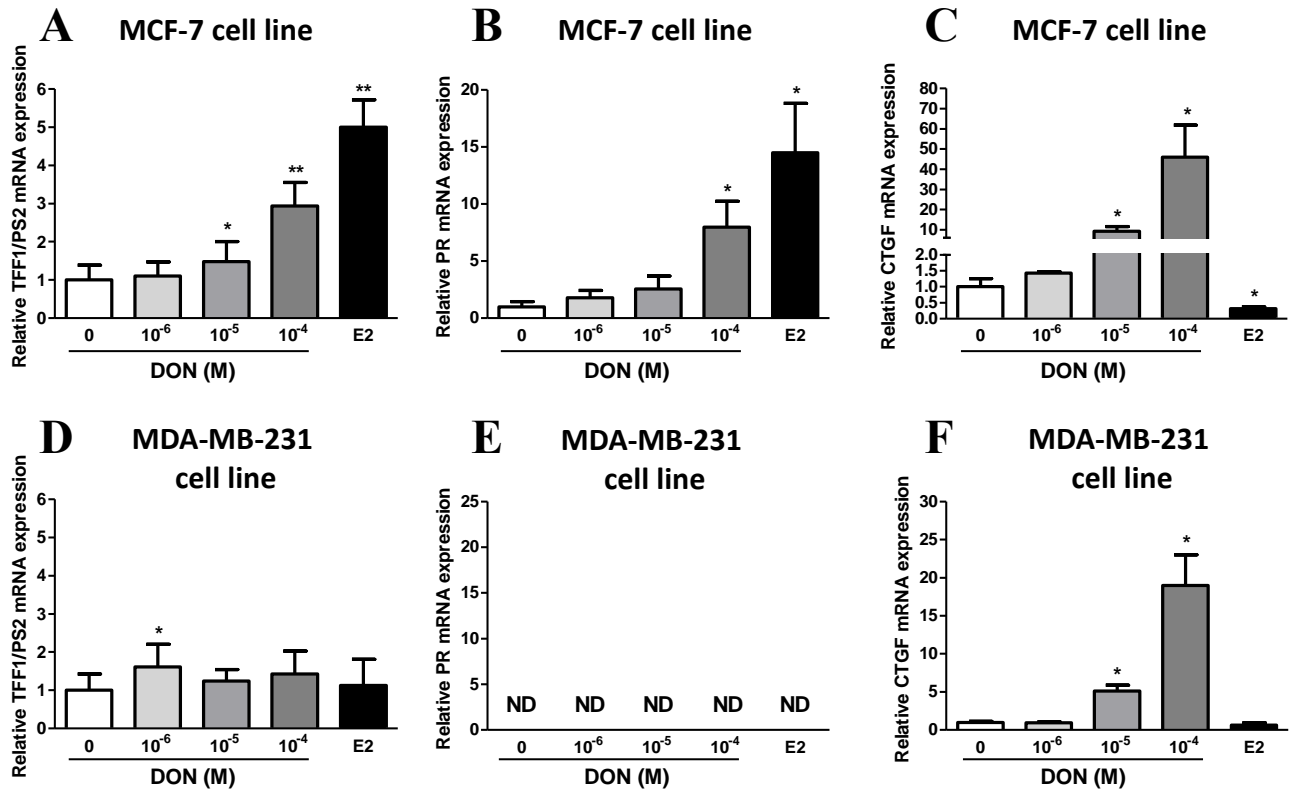


Figure 3

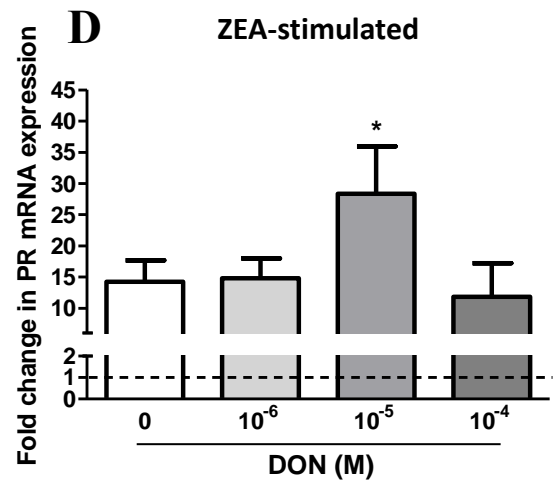
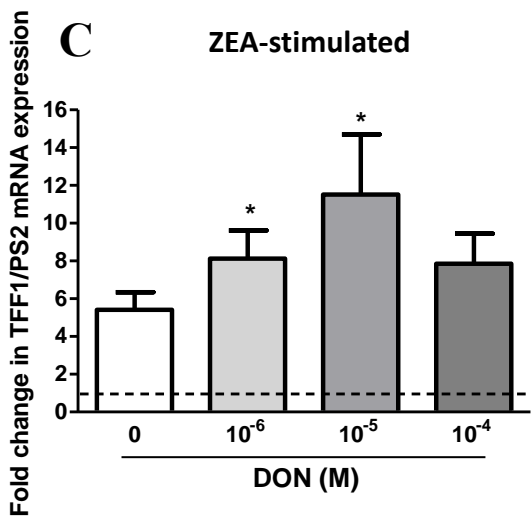
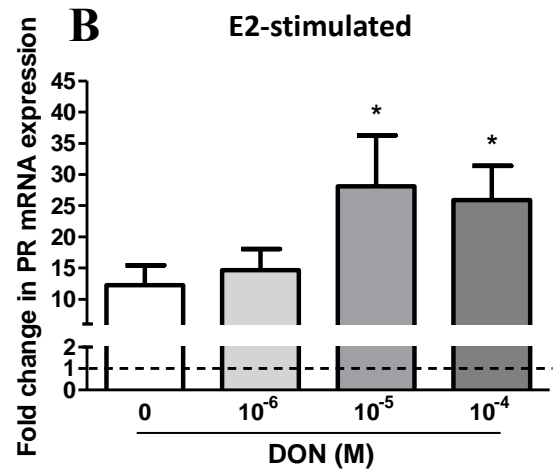
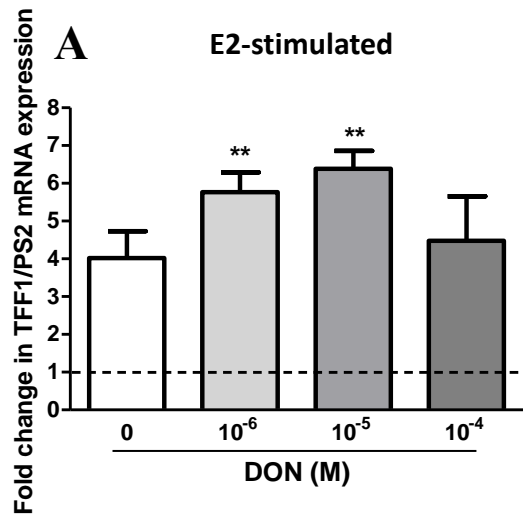


Figure 4

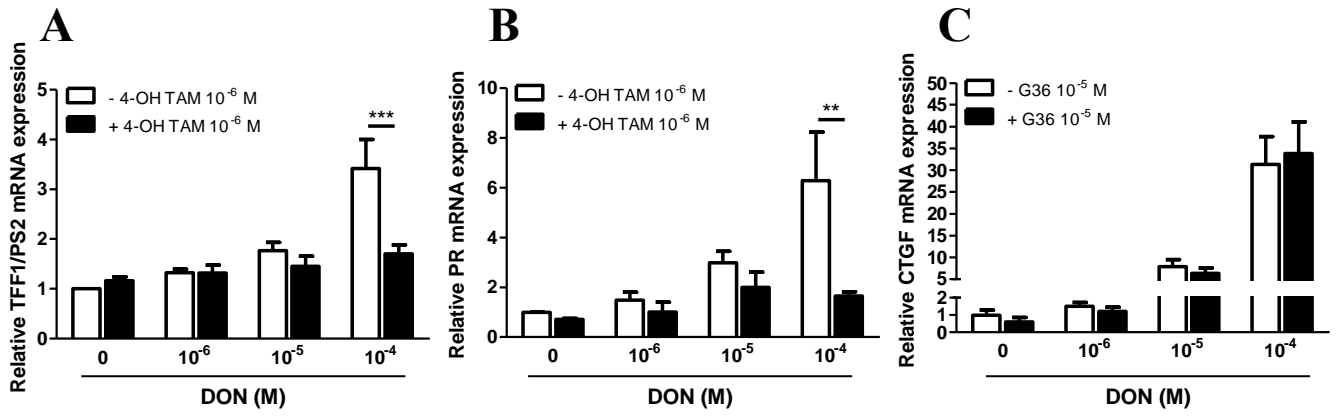


Figure 5

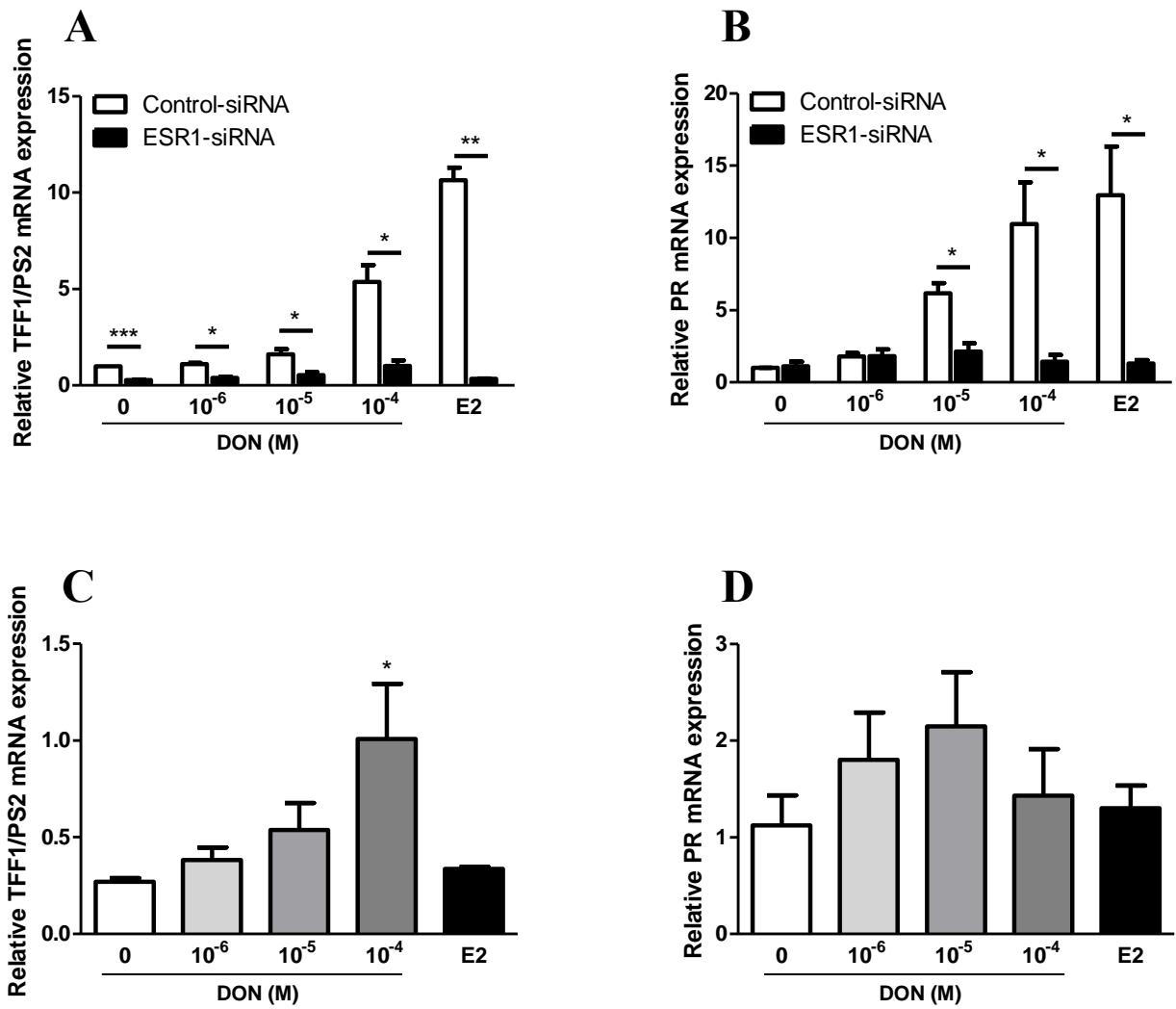




Figure 6

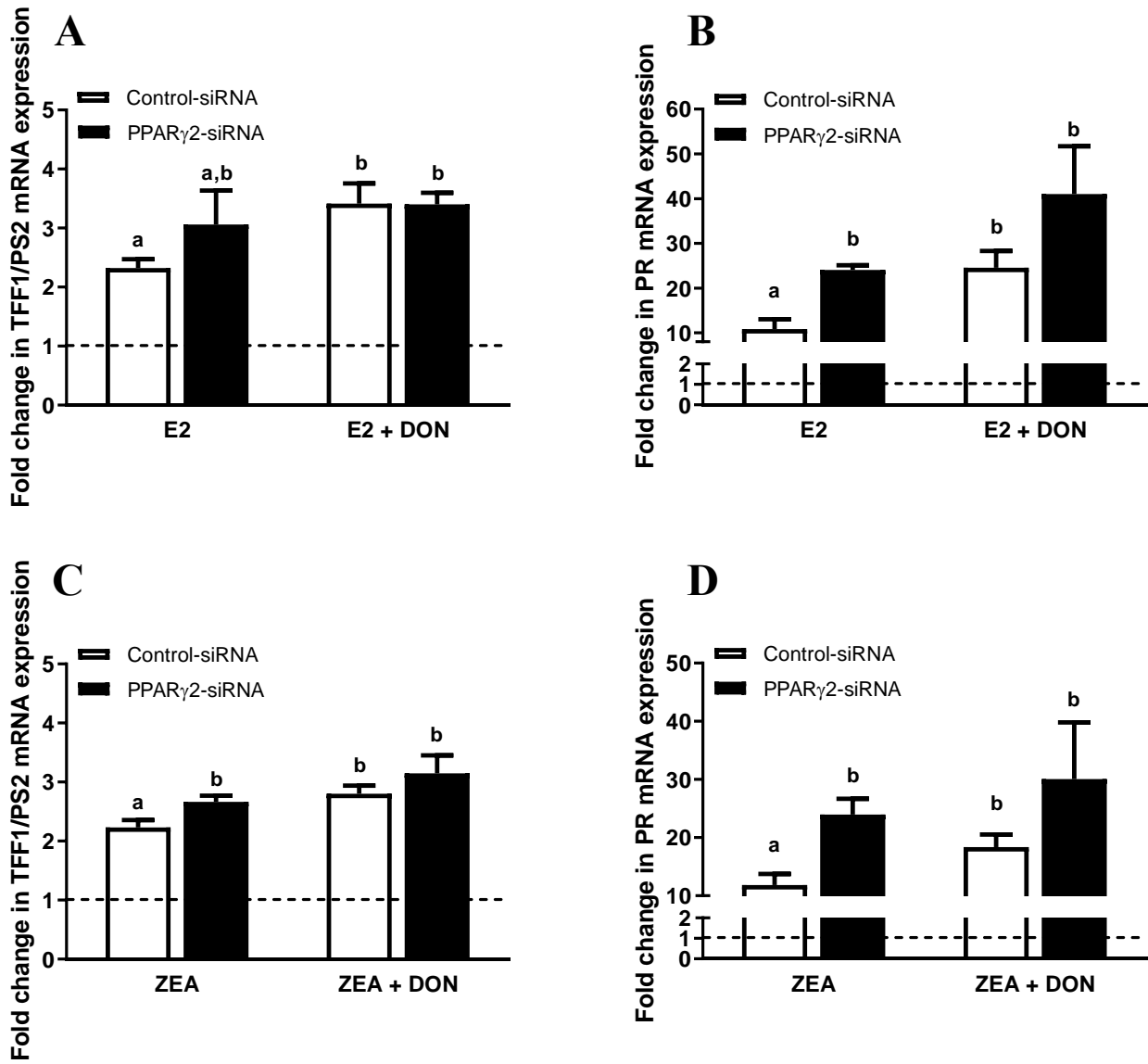


Figure 7

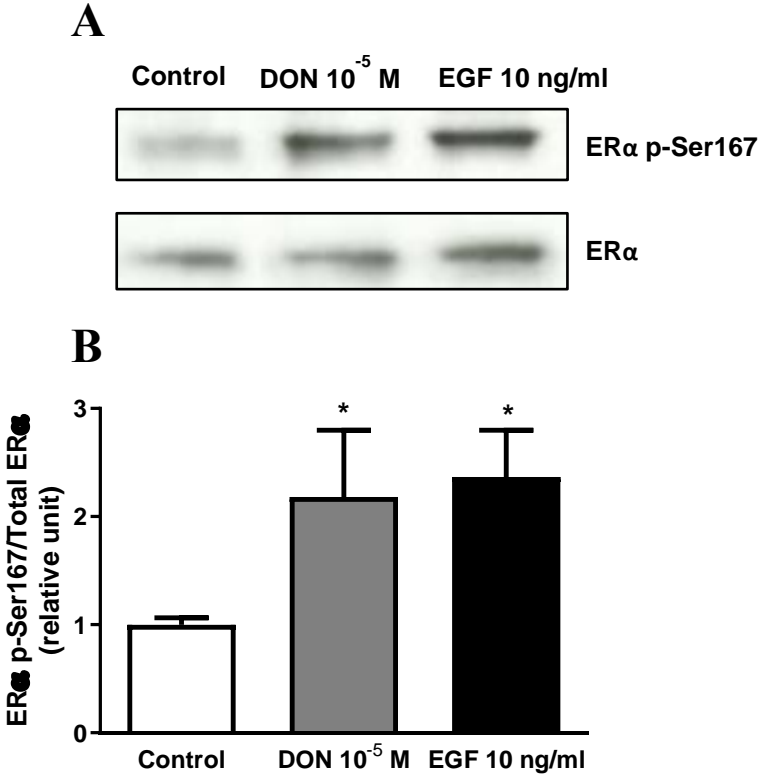
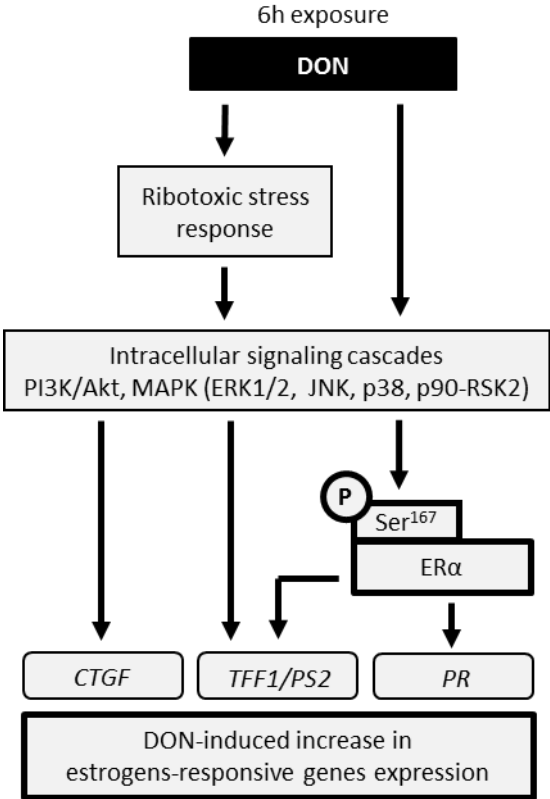


Figure 8



**Table 1.** Primers used in real time PCR.

Gene	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Size (pb)
<i>GAPDH</i>	AGCCGCATCTTCTTTTGC	AATGAAGGGGTCATTGATGG	162
<i>TFF1/PS2</i>	CACCATCGAGAACAAGGTGA	AGCCCTTATTTGCACACTGG	161
<i>PR</i>	TCGAGCTCACAGCGTTTCTA	CACCATCCCTGCCAATATCT	183
<i>CTGF</i>	TACCAATGACAACGCCTCCT	CCGTCGGTACATACTCCAGA	207



---

# DISCUSSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

---



## | Effets des œstrogènes et des xœstrogènes sur le testicule

Depuis plusieurs décennies, un déclin de la fertilité masculine est observé dans de nombreuses régions du globe (Bay et al., 2006; Carlsen et al., 1992; Mascarenhas et al., 2012; Sharpe, 2006). L'incidence croissante d'anomalies de l'appareil reproducteur masculin et la détérioration de la santé reproductive chez l'homme ont été associées à l'essor de l'industrialisation qui a massivement contribué à la contamination de l'environnement par divers polluants (Rim, 2017; Skakkebaek et al., 2016). Depuis les années 1990, l'hypothèse a été émise que l'ensemble de ces altérations pourrait être la conséquence de l'exposition aux perturbateurs endocriniens (Sharpe & Skakkebaek, 1993). En effet, de nombreuses hormones interviennent dans le développement et le maintien de la fonction reproductive. En particulier, il est aujourd'hui admis que les œstrogènes jouent un rôle important dans la régulation de la spermatogenèse (Carreau et al., 2012, 2011). Dans ce contexte, il apparaît nécessaire d'évaluer l'impact des xœstrogènes (perturbateurs endocriniens capables d'interférer avec la signalisation œstrogénique) sur le testicule.

La précédente étude *in vivo* conduite dans notre laboratoire a mis en évidence des effets différentiels de l'E2 (20 µg/kg de poids corporel/jour) et du BPA (50 µg/kg de poids corporel/jour) sur le testicule du rat prépubère. En effet, cette étude révèle qu'une exposition prépubère à l'E2 retarde la mise en place de la spermatogenèse chez les animaux immatures tandis qu'un traitement au BPA promeut sa progression (Brouard et al., 2016). Néanmoins, ces altérations dans la mise en place de la spermatogenèse en période prépubère ne semblent pas altérer son déroulement chez les animaux adultes (**Article 1**). De même, une exposition à ces substances en période pubère, c'est-à-dire lorsque la spermatogenèse est déjà mise en place (Campion et al., 2013; Malkov et al., 1998; Picut et al., 2015), ne semble pas affecter le déroulement de celle-ci à l'issue du traitement chez les animaux adultes (**Article 1**). L'ensemble de ces travaux désigne ainsi la période prépubère comme une fenêtre de sensibilité accrue aux œstrogènes et aux xœstrogènes.

Par ailleurs, ces études *in vivo* soulignent un point intéressant concernant l'effet du BPA sur la BHT. En effet, une altération de la BHT est observée lorsque l'analyse du testicule est conduite immédiatement après l'exposition au BPA, aussi bien en période prépubère qu'en période pubère (Brouard et al., 2016 ; **Article 1**). Cependant, cet effet n'est pas retrouvé dans le testicule des animaux adultes exposés au cours de la période prépubère (**Article 1**). Ce résultat suggère que la période de 45 jours entre la fin du traitement et l'analyse permet la restauration de la BHT. Des résultats similaires ont été récemment rapportés chez des souris prépubères exposées au BPA (50 µg/kg de poids corporel/jour). Le niveau protéique de l'Occludine est diminué à l'issue du traitement, mais restauré 60 jours plus tard (T. Cao et al., 2020).



Ainsi, l'effet délétère du BPA sur la BHT apparait réversible. Les mécanismes d'action mis en jeu dans l'altération de la BHT par le BPA ainsi que dans la restauration de celle-ci nécessitent d'être clarifiés. A cette fin, des études *ex vivo* (explants testiculaires), ou *in vitro* (cellules de Sertoli isolées) pourront être conduites afin d'étudier plus précisément l'effet et les mécanismes d'action du BPA sur la fonctionnalité de la BHT. La perméabilité de la BHT pourrait être évaluée grâce à la mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (TER) (Mruk & Cheng, 2011) ou en utilisant des « traceurs » biologiquement inertes (Rondanino et al., 2017). Certaines études suggèrent l'implication de la signalisation androgénique dans la restauration de l'intégrité de la BHT (Cai et al., 2011; Chen et al., 2008; Li et al., 2013). Afin d'explorer cette hypothèse, des agonistes et des antagonistes du récepteur aux androgènes pourraient être utilisés.

Du point de vue de l'exposition humaine, la mise en place de processus permettant de restaurer les potentielles altérations induites par une exposition au BPA semble actuellement peu probable. En effet, les études de biosurveillance indiquent une exposition continue de la population humaine au BPA, de la vie fœtale à l'âge adulte (Classens et al., 2021 ; Dualde et al., 2015 ; Engel et al., 2006). Nos études soulignent ainsi l'importance de réduire le niveau d'exposition de la population au BPA.

Nous avons cherché à étudier plus en détail les effets directs et les mécanismes d'action des œstrogènes et des xœstrogènes dans le testicule au cours de la fenêtre de la période prépubère ciblée lors des études *in vivo* (15 à 30 jpp) (**Articles 2 et 3**). Une approche *in vivo* n'est pas adaptée à l'étude des effets directs de ces molécules sur le testicule car les œstrogènes et les xœstrogènes exercent des effets indirects sur la gonade mâle au travers de leur impact sur l'axe HPG, compliquant ainsi l'identification de leurs effets directs.

Dans ce contexte, les études conduites sur des lignées cellulaires ou des cellules testiculaires isolées ont grandement contribué à la compréhension des effets et des mécanismes d'action des œstrogènes et des xœstrogènes dans le testicule (Akingbemi et al., 2004; Chimento et al., 2012, 2010; Lucas et al., 2014). Ces approches *in vitro* permettent de contrôler avec une grande précision des paramètres tels que la concentration des molécules étudiées et la durée de l'exposition. Elles permettent par ailleurs d'employer facilement des agonistes, des antagonistes ou des inhibiteurs des différents acteurs impliqués dans la signalisation œstrogénique afin de clarifier les mécanismes d'action des molécules étudiées dans un type cellulaire donné. Cependant, les approches *in vitro* ne tiennent pas compte des interactions entre les différents types cellulaires qui composent le testicule. Or, celles-ci permettent l'établissement de régulations paracrines indispensables à la mise en place et au bon déroulement de la spermatogenèse.

Les approches *ex vivo* se situent à l'interface de ces deux approches classiques. Ce type d'approche offre les mêmes avantages qu'une approche *in vitro* tout en préservant l'architecture testiculaire et les interactions paracrines existant entre les différents types cellulaires du testicule. Par ailleurs, l'étude des effets directs des œstrogènes et des xœstrogènes sur le testicule est facilitée par cette approche qui permet de s'affranchir des effets indirects qu'exercent ces molécules au travers de leur impact sur l'axe HPG. De plus, les échantillons « contrôle » et « traité » peuvent provenir d'un même organe, limitant ainsi la variabilité interindividuelle et augmentant la sensibilité de l'analyse. De cette manière, les approches *ex vivo* permettent également de réduire le nombre d'animaux utilisés dans une étude. L'utilisation d'approches *ex vivo* se révèle ainsi pertinente, aussi bien pour évaluer les effets directs des œstrogènes et des xœstrogènes dans le testicule, que pour clarifier leurs mécanismes d'action. De ce fait, de nombreuses études emploient ce type d'approche aujourd'hui (De Gendt et al., 2009; Desdoits-Lethimonier et al., 2017; Eladak et al., 2015; Gaudriault et al., 2017; Goldstein et al., 2016; Livera et al., 2006; Pawlicki et al., 2019).

Au sein de notre laboratoire, le modèle de culture de tubes séminifères de rats développé par Parvinen et collaborateurs (Parvinen et al., 1991) a déjà été employé pour étudier le rôle des œstrogènes dans la régulation de la spermatogenèse (Bois et al., 2012, 2010). Cependant, les tubes séminifères de rats âgés de 20 jours et moins sont difficiles à dissocier et à manipuler (Bois, 2011). Par ailleurs, ce modèle n'était pas adapté aux travaux conduits dans le cadre de cette thèse car il exclut les cellules de Leydig situées dans le tissu interstitiel. Or, ces cellules sont responsables de la biosynthèse de stéroïdes qui exercent une régulation paracrine sur la spermatogenèse (Heinrich & DeFalco, 2020) et les cellules de Leydig sont une cible privilégiée de nombreux perturbateurs endocriniens (Svechnikov et al., 2010). Ainsi, il nous est apparu pertinent d'employer un modèle de culture organotypique utilisant des explants testiculaires issus de rats prépubères.

La mise au point de ce modèle, réalisée dans le cadre de cette thèse, a nécessité plusieurs étapes de développement et de validation. Plusieurs temps (6h à 18 jours), et techniques de culture (sur insert, sur bloc d'agarose ou en goutte inversée) ont été testés. Le principal critère pris en compte pour orienter les choix effectués dans le développement de ce modèle a été le maintien de l'architecture testiculaire des explants en culture. Au-delà de 4 jours, une désorganisation de l'architecture testiculaire a été observée, associée à la formation d'une zone de nécrose au centre des explants. Ainsi, nous avons déterminé une durée de culture maximale de 3 jours. Cependant, l'étude de l'expression protéique de SCP3 (marqueur de méiose) et de CREM (marqueur des cellules post-méiotiques) par immunohistochimie a indiqué que le processus de méiose est maintenu dans les explants testiculaires après 3 jours de culture. D'autre part, un test de stimulation à la forskoline ( $10^{-5}$  M) a confirmé le maintien de l'activité stéroïdogène des explants testiculaires à l'issue d'une

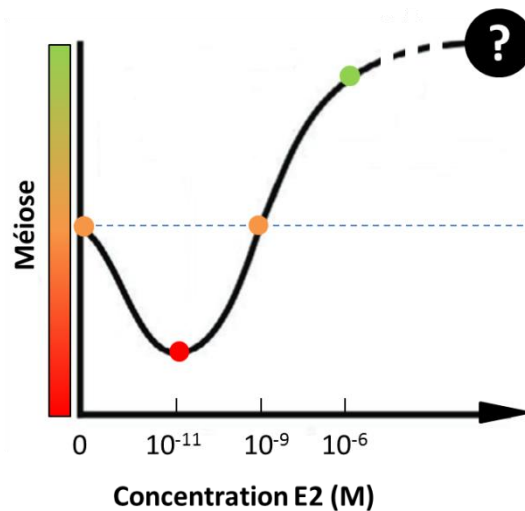
culture de 3 jours. La durée de culture de 6h s'est avérée suffisante pour qu'un traitement à l'E2 modifie l'expression de gènes œstrogéno-régulés. Ainsi, cette durée de culture de 6h a été choisie pour évaluer l'impact des œstrogènes et des xœstrogènes sur l'expression de différents gènes d'intérêt dans les explants testiculaires.

Grâce à ce modèle de culture organotypique, nous avons pu étudier l'impact des œstrogènes et des xœstrogènes sur la stéroïdogénèse (analyse de l'expression génique des enzymes de la stéroïdogénèse et mesure du niveau de 17 $\beta$ -œstradiol et de testostérone sécrétés dans le milieu de culture par les explants testiculaires) et la spermatogénèse (analyse de l'expression génique des protéines impliquées dans la formation de la BHT et de marqueurs de la progression de la spermatogénèse, analyse de l'expression protéique de marqueurs de la prolifération et de la méiose) dans les explants testiculaires de rats de 15, 20 et 25 *jpp*. Ces différents âges, compris dans la fenêtre de la période prépubère étudiée avec l'approche *in vivo* (15 à 30 *jpp*), ont été ciblés car ils correspondent à des stades déterminants de la progression de la spermatogénèse chez le rat (Malkov et al., 1998; Picut et al., 2015) :

- 15 *jpp* : mise en place de la BHT et initiation de la méiose
- 20 *jpp* : la BHT est assemblée, apparition des spermatoocytes pachytènes
- 25 *jpp* : la BHT est fonctionnelle, apparition des spermatides rondes

Les trois molécules étudiées grâce à ce modèle, *i.e.* l'E2, le BPA et la ZEA, sont capables d'interagir avec les ERs (ESR1, ESR2 et GPER) (Kuiper et al., 1998; Thomas & Dong, 2006). Ainsi, avant d'étudier leur impact dans les explants testiculaires de rats prépubères, le profil d'expression des ERs dans le testicule d'animaux de 15, 20 et 25 *jpp* a été dressé. L'expression génique d'*Esr1* et *Esr2* dans le testicule est stable au cours de cette période, tandis que celle de *Gper* varie avec l'âge. En effet, à 20 et 25 *jpp*, le niveau des transcrits de *Gper* représente le double de celui mesuré à 15 *jpp*. Toutefois, quel que soit l'âge considéré, l'expression génique d'*Esr1* est plus importante que celle de *Gper*, et les transcrits d'*Esr2* sont tout juste détectables (**Article 2**). En accord avec d'autres données évaluant le niveau des transcrits des ERs chez le rat adulte (Hutson et al., 2019; Pelletier et al., 2000), il apparaît que le récepteur ESR1 soit l'ER majoritairement exprimé dans le testicule de rat prépubère. De ce fait, la protéine ESR1 a été recherchée par immunohistochimie chez ces animaux immatures. ESR1 n'est pas détectée dans le testicule de rat de 15 *jpp*, mais est localisée dans les tubes séminifères chez les rats de 20 et 25 *jpp* (**Article 2**). En conséquence, les effets des œstrogènes et des xœstrogènes sur le testicule de rat prépubère ont été évalués dans des explants testiculaires issus de rat de 20 et 25 *jpp*. Par ailleurs, ESR1 étant l'ER majoritairement exprimé dans le testicule de ces animaux, l'implication de ce récepteur dans les effets de ces molécules a été étudiée (**Articles 2 et 3**).

Dans les explants testiculaires issus de rat de 25 *jpp*, des effets différentiels de l'E2 sur la progression de la spermatogenèse sont observés selon la concentration utilisée. En effet, un apport exogène d'E2 à de faibles concentrations ( $10^{-11}$  M) inhibe le processus de méiose, tandis que des concentrations intermédiaires ( $10^{-9}$  M) n'ont pas d'effet et que de fortes concentrations ( $10^{-6}$  M) exercent un effet stimulateur sur ce paramètre (**Article 2**). Ainsi, cette approche *ex vivo* souligne l'existence d'une relation non-monotone complexe entre la concentration d'E2 et l'effet de cette substance sur le processus de méiose dans les explants testiculaires issus de rat de 25 *jpp* (Figure 35).



**Figure 35 : Effet de l'E2 sur la méiose dans les explants testiculaires de rat de 25 *jpp***

Ce graphe illustre la relation non-monotone qui existe entre la concentration d'E2 et l'effet de cette substance sur le processus de méiose. Dans les explants testiculaires de rat de 25 *jpp*, l'E2 à  $10^{-11}$  M inhibe la méiose (rouge), l'E2 à  $10^{-9}$  M n'a pas d'effet sur ce paramètre (orange) tandis que l'E2 à  $10^{-6}$  M stimule la méiose (vert).

Si l'existence de telles relations dose-effet non-monotones est bien documentée (Calabrese, 2001; Hill et al., 2018; Vandenberg et al., 2012), il n'en demeure pas moins complexe d'identifier les mécanismes à l'origine de ces relations. Différentes hypothèses mécanistiques peuvent être avancées pour expliquer ce type d'effet (Lagarde et al., 2015; Vandenberg et al., 2012). Dans le cas de cette approche *ex vivo*, l'une d'entre elles a retenu notre attention pour de futures investigations. Ces effets différentiels dépendants de la concentration d'E2 pourraient être expliqués par la différence d'affinité relative de l'E2 pour les trois ERs (Lagarde et al., 2015 ; Vandenberg et al., 2012). En effet, l'E2 a une affinité similaire pour ESR1 et ESR2, mais présente une plus faible affinité pour GPER (Blair et al., 2000; Thomas et al., 2005). Ainsi, à de faibles concentrations, l'E2 pourrait se fixer préférentiellement à ESR1 (ER majoritaire dans le testicule de rat de 25 *jpp*), alors qu'à de fortes concentrations l'E2 pourrait également se fixer de manière importante à GPER en raison de la saturation des récepteurs ESR1. Afin d'étudier cette hypothèse, des agonistes et des antagonistes des différents ERs pourraient être utilisés. Il serait notamment intéressant de déterminer si de fortes

concentrations d'E2 ( $10^{-6}$  M) sont capables d'induire une augmentation de l'expression du marqueur de méiose en présence d'un antagoniste de GPER (G15 et G36).

Par ailleurs, à une même concentration ( $10^{-11}$  M), l'E2 semble promouvoir la progression de la spermatogenèse dans les explants testiculaires issus de rats de 20 *jpp*, mais l'inhiber dans ceux issus de rats de 25 *jpp* (**Article 2**). Cet effet différentiel de l'E2 selon l'âge considéré au sein de la période prépubère (20 ou 25 *jpp*) est en accord avec d'autres études. En effet, une étude *in vivo* démontre que chez des rats exposés à l'œstradiol benzoate dès la période néonatale, la première vague de spermatogenèse débute normalement mais est interrompue au stade spermatocytes pachytènes, et le développement testiculaire est inhibé à partir de 25 *jpp* (Steinberger & Duckett, 1965). De plus, dans des explants testiculaires de souris de 5 *jpp*, une exposition de 20 jours à l'éthynil œstradiol ( $10^{-9}$  M) entraîne une diminution du nombre de spermatides rondes lors de la première vague de spermatogenèse (Nakamura et al., 2019). Ces données, ainsi que notre étude *ex vivo*, sont cohérentes avec le retard de la mise en place de la spermatogenèse observé chez les rats de 30 *jpp* exposés à l'E2 de 15 à 30 *jpp* dans notre précédente étude *in vivo* (Brouard et al., 2016). L'effet inhibiteur des œstrogènes sur la spermatogenèse observé à 25 *jpp* intervient au moment du pic de la vague d'apoptose qui accompagne la mise en place de la spermatogenèse (Moreno et al., 2006). De façon intéressante, les spermatocytes pachytènes ont été identifiés comme les cellules les plus affectées par cette vague d'apoptose (Jahnukainen et al., 2004). Or, une étude *in vitro* conduite sur des spermatocytes pachytènes isolés de testicule de rat adulte indique un effet pro-apoptotique de l'E2 ( $10^{-7}$  M) sur ces cellules (Chimento et al., 2010). En conséquence, un apport exogène en E2 pourrait accroître l'impact de cette vague d'apoptose sur les cellules germinales, notamment en promouvant l'apoptose des spermatocytes pachytènes, et ainsi retarder la progression de la spermatogenèse. Afin d'explorer cette hypothèse, un comptage cellulaire pourrait être réalisé, et le niveau d'apoptose au sein des tubes séminifères pourrait être évalué grâce à un marquage TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling*). Par ailleurs, cette analyse pourrait également être effectuée grâce à l'immunomarquage de protéines activées durant le processus d'apoptose telle que la caspase-3 active (Moreno et al., 2006).

La période d'exposition apparaît également être un facteur déterminant de l'impact des xénoœstrogènes dans le testicule prépubère. En effet, alors que le BPA module la biosynthèse des stéroïdes et promeut la progression de la spermatogenèse dans les explants testiculaires issus de rat de 20 *jpp*, le même traitement n'a aucun effet sur ces paramètres dans les explants testiculaires issus de rat de 25 *jpp* (**Article 3**). L'effet stimulateur du BPA sur la progression de la spermatogenèse observé chez les rats de 30 *jpp* après une exposition continue de 15 à 30 *jpp* (Brouard et al., 2016)

semble ainsi résulter d'évènements survenant à 20 *jpp*. Par ailleurs, la ZEA stimule la biosynthèse des stéroïdes dans les explants testiculaires issus de rats de 20 et 25 *jpp*, mais son effet stimulateur sur la spermatogenèse n'est observé que dans les explants testiculaires issus de rats de 25 *jpp* (**Article 3**). Les deux xénoestrogènes étudiés grâce à cette approche *ex vivo* semblent ainsi exercer des effets similaires dans le testicule de rat prépubère, mais à des moments distincts. Cela semble refléter l'existence de différents mécanismes d'action du BPA et de la ZEA. En effet, dans les explants testiculaires de rat de 20 *jpp*, les effets du BPA semblent impliquer les ERs nucléaires, notamment ESR1 (ER majoritaire dans le testicule de rat prépubère) (**Article 3**). La raison pour laquelle le BPA n'exerce aucun effet dans les explants testiculaires issus de rats de 25 *jpp* reste toutefois à éclaircir, d'autant que l'expression des ERs dans le testicule ne varie pas entre 20 et 25 *jpp* (expression génique d'*Esr1*, *Esr2* et *Gper* ; expression protéique d'ESR1) (**Article 2**). Contrairement au BPA, les effets de la ZEA dans le testicule de rat prépubère ne semblent pas impliquer ESR1 (**Article 3**). De prochaines études devront être conduites pour élucider les mécanismes d'action de ces xénoestrogènes dans le testicule de rat prépubère. Pour cela, différents agonistes et antagonistes des ERs pourraient être utilisés.

Globalement, cette étude *ex vivo* renforce l'idée que la période prépubère constitue une fenêtre de sensibilité aux xénoestrogènes, tout en soulignant l'existence de différentes fenêtres de sensibilité au BPA et à la ZEA. Néanmoins, l'exposition humaine aux xénoestrogènes apparaît continue tout au long de la vie (Classens et al., 2021 ; Dualde et al., 2015 ; Engel et al., 2006 ; Leblanc et al., 2005). Dans ce contexte, la perturbation des fonctions testiculaires est susceptible de se produire durant toute la période prépubère, avec des moments spécifiques de plus grande sensibilité à certains composés qu'à d'autres. De plus, des études de biosurveillance mettent en évidence une exposition simultanée à de nombreux composés œstrogéniques (Fleck et al., 2016; Teeguarden et al., 2016). Ceci est particulièrement préoccupant car il est difficile de prévoir l'effet de mélange de composés œstrogéniques, à partir de l'effet individuel de chaque substance (Conley et al., 2016). Par exemple, notre étude *in vivo* démontre l'impact d'une exposition combinée à l'E2 et au BPA sur l'expression génique de *Gper* alors que l'E2 ou le BPA seul n'avait pas d'effet sur ce paramètre (**Article 1**). Ainsi, de prochains travaux devront évaluer l'effet combiné, ou l'effet « cocktail », des œstrogènes et/ou des xénoestrogènes dans les explants testiculaires de rat prépubère.

## | Effet du déoxynivalénol sur la signalisation œstrogénique

La dernière partie de ces travaux s'est intéressée aux effets du DON sur la signalisation œstrogénique (**Article 4**). Produit par les mêmes champignons que la ZEA, le DON compte à la fois parmi les mycotoxines les plus abondantes et celles possédant les profils toxicologiques les plus préoccupants (Garon et al., 2006; Ma et al., 2018). A l'heure actuelle, le DON n'est pas décrit comme un xœstrogène, mais comme un puissant inhibiteur de la synthèse protéique (Cundliffe & Davies, 1977; Ueno, 1978). Cependant, certaines études suggèrent l'existence d'autres mécanismes d'action (Demaegdt et al., 2016 ; Ndossi et al., 2012). Ces données nous ont conduits à émettre l'hypothèse que le DON pourrait moduler la signalisation œstrogénique. Notamment, le DON exerce une activité antagoniste sur le récepteur PPAR $\gamma$  (Demaegdt et al., 2016), dont l'activation induit la dégradation du récepteur ESR1 par le protéasome (Suzuki et al., 2006 ; Qin et al., 2003).

Notre étude *in vitro* démontre que le DON induit l'activation de la signalisation œstrogénique dans les cellules de carcinome mammaire MCF-7. Cependant, il apparaît clairement que celle-ci s'effectue selon un mécanisme d'action indépendant du récepteur PPAR $\gamma$  (**Article 4**). Ainsi, nous avons cherché à évaluer l'implication des récepteurs aux œstrogènes dans l'activation de la signalisation œstrogénique induite par le DON. Nos résultats excluent l'implication du récepteur transmembranaire GPER dans cet effet. En revanche, l'activation du récepteur ESR1 est requise, bien que la voie classique dépendante du ligand ne semble pas être impliquée. L'analyse du niveau de phosphorylation de ce récepteur indique que le DON induit la phosphorylation du résidu sérine 167 (Ser<sup>167</sup>) du récepteur ESR1 (**Article 4**). Ainsi, ces travaux démontrent, pour la première fois à notre connaissance, que le DON perturbe la signalisation œstrogénique au travers de l'activation du récepteur ESR1 selon la voie indépendante du ligand.

Afin d'évaluer l'implication de la voie indépendante du ligand dans l'activation de la signalisation œstrogénique induite par le DON, notre étude s'est concentrée sur la phosphorylation du résidu Ser<sup>167</sup> du récepteur ESR1. En effet, ce résidu présente un intérêt particulier dans les cellules MCF-7 car sa phosphorylation est associée à la résistance aux traitements anti-œstrogéniques dans les cellules de carcinome mammaire (Campbell et al., 2001; Jiang et al., 2007). Cependant, de nombreux autres sites peuvent intervenir dans l'activation indépendante du ligand du récepteur ESR1 (Lannigan, 2003). Afin d'étudier l'ensemble des modifications post-traductionnelles de ESR1 potentiellement induites par le DON, la technique de spectrométrie de masse pourrait être employée. Cette technique en constante évolution, initialement employée pour l'identification et la quantification des protéines, constitue aujourd'hui une approche de choix pour l'analyse qualitative et quantitative des modifications post-traductionnelles d'une protéine donnée (Doll & Burlingame,

2015). En effet, la spectrométrie de masse permet de détecter et de localiser de façon exhaustive et hautement résolutive les modifications post-traductionnelles d'une protéine. De plus, la spectrométrie de masse peut être utilisée pour quantifier ces modifications post-traductionnelles, aussi bien à l'échelle de la protéine qu'au niveau de sites particuliers (Doll & Burlingame, 2015). D'un point de vue pratique, ces analyses pourraient être effectuées avec le soutien technique de la plateforme PROTEOGEN (Unité de service EMERODE, Université de Caen Normandie) qui dispose des équipements et de l'expérience nécessaires à la mise en œuvre de ces travaux.

Par ailleurs, les mécanismes d'action du DON mis en jeu en amont de la phosphorylation du récepteur ESR1 restent à déterminer. Concernant la phosphorylation du résidu Ser<sup>167</sup> identifiée dans notre étude, différentes hypothèses peuvent être avancées. Le DON pourrait notamment induire cet événement au travers de l'activation des voies PI3K/Akt et MAPK (ERK1/2, JNK, p38, p90-RSK2) (Mishra et al., 2020, 2014). Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans la phosphorylation du récepteur ESR1 induite par le DON, l'activation des kinases impliquées dans ces cascades de signalisation cellulaires pourrait être étudiée par Western Blot, et différents inhibiteurs de ces cascades de signalisation cellulaires pourraient être utilisés.

Outre ces analyses permettant d'affiner la compréhension des mécanismes d'action du DON dans les cellules MCF-7 *in vitro*, cette étude ouvre une nouvelle perspective en lien avec les autres travaux développés dans cette thèse. En effet, dans le contexte des thématiques développées par notre laboratoire, l'identification d'effets du DON sur la signalisation œstrogénique soulève la question de l'impact de cette mycotoxine sur le testicule. A l'heure actuelle, un nombre limité d'études se sont intéressées à l'effet du DON sur la gonade mâle. Des études *in vivo* rapportent un impact négatif du DON sur la stéroïdogénèse testiculaire (Z. Cao et al., 2020; Sprando et al., 2005), les cellules de Sertoli et la BHT (Z. Cao et al., 2020), ainsi que sur la spermatogénèse (Sprando et al., 2005, 1999; Yang et al., 2019). En conséquence, le DON induit une diminution de la concentration spermatique et de la mobilité spermatozoïdes et augmente le nombre de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques (Z. Cao et al., 2020; Sprando et al., 2005; Yang et al., 2019). Cependant, ces études sont exclusivement conduites chez des animaux adultes. Or, comme discuté précédemment, la période prépubère constitue une fenêtre de sensibilité accrue aux xénoœstrogènes, et l'exposition des enfants au DON est parfois plus importante que celle des adultes (Leblanc et al., 2005). Ainsi, il apparaît pertinent d'évaluer l'effet du DON dans le testicule immature. Par ailleurs, les mécanismes d'action du DON responsables des effets décrits dans le testicule appellent à être identifiés. De la même manière que pour l'E2, le BPA, et la ZEA, les effets et les mécanismes d'action du DON dans le testicule immature pourront être étudiés grâce au modèle de culture organotypique de testicule de rat prépubère développé au cours de cette thèse.



De plus, cette approche *ex vivo* pourra être employée pour évaluer l'effet d'une exposition simultanée au DON et à la ZEA sur le testicule immature. En effet, le DON et la ZEA sont produits par les champignons du genre *Fusarium*. Ainsi, les denrées alimentaires sont fréquemment contaminées simultanément par ces deux mycotoxines (Ma et al., 2018; Palumbo et al., 2020; van der Fels-Klerx et al., 2021). Dans ce contexte, notre étude *in vitro* (conduite dans des cellules de carcinome mammaire) démontre une induction de l'expression des gènes œstrogéno-régulés plus importante en présence de DON et de ZEA qu'en présence de chacune de ces mycotoxines isolée, soulignant ainsi l'existence d'effet combiné du DON et de la ZEA sur l'induction de la signalisation œstrogénique (**Article 4**). Par ailleurs, plusieurs études ont examiné l'effet d'une exposition combinée au DON et à la ZEA sur des paramètres variés (Jia et al., 2020; Liang et al., 2015; Ren et al., 2017; Thapa et al., 2021) incluant la viabilité des spermatozoïdes (Tassis et al., 2020) ou la biosynthèse des hormones stéroïdes (Kolesarova et al., 2017). Ces études rapportent des effets sous-additifs, additifs ou synergiques du DON et de la ZEA, soulignant la difficulté de prédire l'impact de mélanges de mycotoxines à partir des effets des mycotoxines isolées (Thapa et al., 2021). L'ensemble de ces données soulignent la pertinence d'évaluer l'effet d'une exposition combinée au DON et à la ZEA sur le testicule prépubère. L'étude de l'effet du DON en combinaison avec deux de ses métabolites (le 3-acétylDON et le 15-acétylDON) présenterait également un intérêt, car ces derniers ont été identifiés comme agonistes des ERs (Demaegdt et al., 2016).

## | Conclusion générale

Pour conclure, les différentes approches conduites dans le cadre de cette thèse ont permis de préciser l'effet des œstrogènes et des xœstrogènes dans le testicule chez le rat. Les travaux *in vivo* indiquent qu'une exposition en période prépubère ou en période pubère à de faibles doses d'E2 et de BPA n'a qu'un impact limité sur le testicule adulte. Le BPA altère l'intégrité de la BHT, mais cet effet apparaît réversible avec le temps (**Article 1**). Les études *ex vivo* suggèrent que les effets du BPA et de l'E2 sur la progression de la spermatogenèse observés chez les rats de 30 *jpp* après une exposition de 15 à 30 *jpp* (Brouard et al., 2016) résultent d'évènements survenant à 20 et 25 *jpp* respectivement (**Articles 2 et 3**). Par ailleurs, ces études indiquent que l'E2, le BPA et la ZEA sont capables de perturber des paramètres liés à la stéroïdogénèse et à la spermatogenèse dans les explants testiculaires de rat immatures, confirmant que la période prépubère constitue une fenêtre de sensibilité aux œstrogènes et aux xœstrogènes (**Articles 2 et 3**). De plus, cette approche *ex vivo* révèle l'existence de fenêtres de sensibilité distinctes au BPA (20 *jpp*) et à la ZEA (25 *jpp*) au cours de la période prépubère (**Article 3**). Enfin, l'étude *in vitro* conduite dans les cellules de carcinome mammaire démontre, pour la première fois à notre connaissance, que le DON induit la signalisation œstrogénique au travers de l'activation du récepteur ESR1 selon la voie indépendante du ligand (**Article 4**).



---

# BIBLIOGRAPHIE

---



- Abdel-Maksoud, F.M., Ali, F.A.Z., Akingbemi, B.T., 2019. Prenatal exposures to bisphenol A and di (2-ethylhexyl) phthalate disrupted seminiferous tubular development in growing male rats. *Reprod. Toxicol.* 88, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.017>
- Abney, T.O., 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids* 64, 610–617.
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P., Marino, M., 2005. Palmitoylation-dependent estrogen receptor  $\alpha$  membrane localization: regulation by 17 $\beta$ -estradiol. *Mol. Biol. Cell* 16, 231–237. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0547>
- Adamo, C., Antignac, J.P., Auger, J., Balaguer, P., Bourc'His, D., Bujan, L., Chevrier, C., Cotinot, C., Cravedi, J.P., Laudet, V., Livera, G., Slama, R., 2010. Bisphénol A - Effet sur la reproduction (Rapport préliminaire). INSERM.
- Adegoke, E.O., Rahman, M.S., Pang, M.-G., 2020. Bisphenols Threaten Male Reproductive Health via Testicular Cells. *Front. Endocrinol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00624>
- Adlanmerini, M., Solinhac, R., Abot, A., Fabre, A., Raymond-Letron, I., Guihot, A.-L., Boudou, F., Sautier, L., Vessieres, E., Kim, S.H., Liere, P., Fontaine, C., Krust, A., Chambon, P., Katzenellenbogen, J.A., Gourdy, P., Shaul, P.W., Henrion, D., Arnal, J.-F., Lenfant, F., 2014. Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E283–E290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322057111>
- Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., Hardy, M.P., 2004. Inhibition of Testicular Steroidogenesis by the Xenoestrogen Bisphenol A Is Associated with Reduced Pituitary Luteinizing Hormone Secretion and Decreased Steroidogenic Enzyme Gene Expression in Rat Leydig Cells. *Endocrinology* 145, 592–603. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1174>
- Ali, S., Steinmetz, G., Montillet, G., Perrard, M.-H., Loundou, A., Durand, P., Guichaoua, M.-R., Prat, O., 2014. Exposure to Low-Dose Bisphenol A Impairs Meiosis in the Rat Seminiferous Tubule Culture Model: A Physiotoxicogenomic Approach. *PLoS ONE* 9, e106245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106245>
- Allard, E.K., Blanchard, K.T., Boekelheide, K., 1996. Exogenous stem cell factor (SCF) compensates for altered endogenous SCF expression in 2,5-hexanedione-induced testicular atrophy in rats. *Biol. Reprod.* 55, 185–193. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.185>
- Anbalagan, M., Rowan, B.G., 2015. Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.016>
- Andaluri, G., Manickavachagam, M., Suri, R., 2018. Plastic toys as a source of exposure to bisphenol-A and phthalates at childcare facilities. *Environ. Monit. Assess.* 190. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6438-9>
- Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., Mark, M., 2008. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ER $\beta$ -null mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 2433–2438.
- Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K.J., Walker, M., Fisher, J.S., Morley, M., Millar, M.R., Groome, N.P., Sharpe, R.M., 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to

adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141, 3898–3907. <https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7723>

## - B -

- Bacle, Dupuis, Belmouaz, Bauwens, Cambien, Venisse, Pierre-Eugene, Potin, Migeot, Ayraud-Thevenot, 2019. Overexposure to Bisphenol A and Its Chlorinated Derivatives of Patients with End-Stage Renal Disease during Online Hemodiafiltration. *Biomolecules* 9, 403. <https://doi.org/10.3390/biom9090403>
- Balasinor, N.H., D'Souza, R., Nanaware, P., Idicula-Thomas, S., Kedia-Mokashi, N., He, Z., Dym, M., 2010. Effect of high intratesticular estrogen on global gene expression and testicular cell number in rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 72.
- Balicco, A., Bidondo, M.-L., Fillol, C., Gane, J., Oleko, A., Saoudi, A., Zeghnoun, A., 2019. Imprégnation de la population française par les bisphénols A, S et F : Programme national de biosurveillance, Esteban 2014-2016 58.
- Baravalle, R., Ciaramella, A., Baj, F., Di Nardo, G., Gilardi, G., 2018. Identification of endocrine disrupting chemicals acting on human aromatase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1866, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.013>
- Barton, M., Filardo, E.J., Lolait, S.J., Thomas, P., Maggiolini, M., Prossnitz, E.R., 2018. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 176, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.021>
- Bay, K., Asklund, C., Skakkebaek, N.E., Andersson, A.-M., 2006. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.004>
- Belhassen, H., Jiménez-Díaz, I., Arrebola, J.P., Ghali, R., Ghorbel, H., Olea, N., Hedili, A., 2015. Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: A case-control study in Tunisia. *Chemosphere* 128, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.055>
- Ben Maamar, M., Lesné, L., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Lassurguère, J., Lavoué, V., Deceuninck, Y., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Pineau, C., Chevrier, C., Dejuq-Rainsford, N., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2015. An Investigation of the Endocrine-Disruptive Effects of Bisphenol A in Human and Rat Fetal Testes. *PLOS ONE* 10, e0117226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117226>
- Bennesch, M.A., Picard, D., 2015. Minireview: Tipping the Balance: Ligand-Independent Activation of Steroid Receptors. *Mol. Endocrinol.* 29, 349–363. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1315>
- Benzoni, E., Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Vigo, D., Visconti, A., 2008. Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reprod. Toxicol.* 25, 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.04.009>
- Bernier, M.R., Vandenberg, L.N., 2017. Handling of thermal paper: Implications for dermal exposure to bisphenol A and its alternatives. *PLOS ONE* 12, e0178449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178449>
- Billig, H., Furuta, I., Rivier, C., Tapanainen, J., Parvinen, M., Hsueh, A.J.W., 1995. Apoptosis in Testis Germ Cells: Developmental Changes in Gonadotropin Dependence and Localization to Selective Tubule Stages. *Endocrinology* 136, 5–12. <https://doi.org/10.1210/endo.136.1.7828558>

- Björnström, L., Sjöberg, M., 2005. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Mol. Endocrinol.* 19, 833–842. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
- Blaber, S.J., 1970. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella Lapillus*. *J. Molluscan Stud.* 39, 231–233. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.mollus.a065097>
- Blair, R.M., Fang, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., Sheehan, D.M., 2000. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.* 54, 138–153. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.138>
- Blanco-Rodriguez, J., Martinez-Garcia, C., 1996. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif.* 29, 13–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1996.tb00091.x>
- Blanco-Rodriguez, J., Martinez-Garcia, C., Porras, A., 2003. Correlation between DNA synthesis in the second, third and fourth generations of spermatogonia and the occurrence of apoptosis in both spermatogonia and spermatocytes. *Reproduction* 126, 661–668. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260661>
- Bois, C., 2011. Estrogènes & spermatogénèse chez le rat (Thèse de doctorat). Université de Caen.
- Bois, C., Delalande, C., Bouraïma-Lelong, H., Durand, P., Carreau, S., 2012. 17 $\beta$ -Estradiol regulates cyclin A1 and cyclin B1 gene expression in adult rat seminiferous tubules. *J. Mol. Endocrinol.* 48, 89–97. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0105>
- Bois, C., Delalande, C., Nurmio, M., Parvinen, M., Zanatta, L., Toppari, J., Carreau, S., 2010. Age- and cell-related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. *J. Mol. Endocrinol.* 45, 147–159. <https://doi.org/10.1677/JME-10-0041>
- Bourguiba, S., Chater, S., Delalande, C., Benahmed, M., Carreau, S., 2003a. Regulation of Aromatase Gene Expression in Purified Germ Cells of Adult Male Rats: Effects of Transforming Growth Factor  $\beta$ , Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , and Cyclic Adenosine 3',5'-Monosphosphate. *Biol. Reprod.* 69, 592–601. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013961>
- Bourguiba, S., Genissel, C., Lambard, S., Bouraïma, H., Carreau, S., 2003b. Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, 335–343. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00343-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00343-1)
- Bourguiba, S., Lambard, S., Carreau, S., 2003c. Steroids control the aromatase gene expression in purified germ cells from the adult male rat. *J. Mol. Endocrinol.* 31, 83–94.
- Breucker, H., Schäfer, E., Holstein, A.F., 1985. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. *Cell Tissue Res.* 240, 303–309. <https://doi.org/10.1007/BF00222339>
- Brinkworth, M.H., Weinbauer, G.F., Schlatt, S., Nieschlag, E., 1995. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *Reproduction* 105, 25–33. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1050025>
- Brouard, V., Guénon, I., Bouraïma-Lelong, H., Delalande, C., 2016. Differential effects of bisphenol A and estradiol on rat spermatogenesis' establishment. *Reprod. Toxicol.* 63, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.003>
- Brown, A.M., Jeltsch, J.-M., Roberts, M., Chambon, P., 1984. Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6344–6348.



- Bryan, G., Gibbs, P.E., Burt, G.R., Hummerstone, L.G., 1987. The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dog-whelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. *J. Marine Biol. Assoc. UK* 67, 525–544.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., Picard, D., 1996. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 15, 2174–2183.
- Buteau-Lozano, H., Ancelin, M., Lardeux, B., Milanini, J., Perrot-Appianat, M., 2002. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res.* 62, 4977–4984.

- C -

- Cai, G., Si, M., Li, X., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Liu, Z., Bian, J., 2019. Zearalenone induces apoptosis of rat Sertoli cells through Fas-Fas ligand and mitochondrial pathway. *Environ. Toxicol.* 34, 424–433. <https://doi.org/10.1002/tox.22696>
- Cai, H., Ren, Y., Li, X.-X., Yang, J.-L., Zhang, C.-P., Chen, M., Fan, C.-H., Hu, X.-Q., Hu, Z.-Y., Gao, F., Liu, Y.-X., 2011. Scrotal heat stress causes a transient alteration in tight junctions and induction of TGF- $\beta$  expression: Tight junctions and TGF- $\beta$  expression in heat-treated testes. *Int. J. Androl.* 34, 352–362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01089.x>
- Calabrese, E.J., 2001. Estrogen and related compounds: biphasic dose responses. *Crit. Rev. Toxicol.* 31, 503–515. <https://doi.org/10.1080/20014091111785>
- Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., Nakshatri, H., 2001. Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated Activation of Estrogen Receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 276, 9817–9824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010840200>
- Campion, S.N., Carvallo, F.R., Chapin, R.E., Nowland, W.S., Beauchamp, D., Jamon, R., Koitz, R., Winton, T.R., Cappon, G.D., Hurtt, M.E., 2013. Comparative assessment of the timing of sexual maturation in male Wistar Han and Sprague-Dawley rats. *Reprod. Toxicol.* 38, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.02.003>
- Cao, T., Cao, Y., Wang, H., Wang, P., Wang, X., Niu, H., Shao, C., 2020. The Effect of Exposure to Bisphenol A on Spermatozoon and the Expression of Tight Junction Protein Occludin in Male Mice. *Dose-Response* 18, 155932582092674. <https://doi.org/10.1177/1559325820926745>
- Cao, Z., Huang, W., Sun, Y., Li, Y., 2020. Deoxynivalenol induced spermatogenesis disorder by blood-testis barrier disruption associated with testosterone deficiency and inflammation in mice. *Environ. Pollut.* 264, 114748. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114748>
- Cariati, F., D’Uonno, N., Borrillo, F., Iervolino, S., Galdiero, G., Tomaiuolo, R., 2019. Bisphenol a: an emerging threat to male fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 17. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0447-6>
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* 305, 609–613. <https://doi.org/10.1136/bmj.305.6854.609>
- Carmeci, C., Thompson, D.A., Ring, H.Z., Francke, U., Weigel, R.J., 1997. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45, 607–617.

- Carpino, A., Pezzi, V., Rago, V., Bilinska, B., Ando', S., 2001. Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase in rat testis during postnatal development. *Tissue Cell* 33, 349–353. <https://doi.org/10.1054/tice.2001.0186>
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., 2012. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Adv. Med. Sci.* 57, 31–36. <https://doi.org/10.2478/v10039-012-0005-y>
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., 2011. Estrogens—new players in spermatogenesis. *Reprod. Biol.* 11, 174–193.
- Carreau, S., Genissel, C., Bilinska, B., Levallet, J., 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int. J. Androl.* 22, 211–223.
- Carreau, S., Silandre, D., Bourguiba, S., Hamden, K., Said, L., Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Delalande, C., 2007. Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 761–768.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin.
- Chang, C., Chen, Y.-T., Yeh, S.-D., Xu, Q., Wang, R.-S., Guillou, F., Lardy, H., Yeh, S., 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 6878–6881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307306101>
- Chemes, H., 1986. The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. *Endocrinology* 119, 1673–1681. <https://doi.org/10.1210/endo-119-4-1673>
- Chemes, H.E., Raj, H.G., 1979. The role of gonadotropins and testosterone on initiation of spermatogenesis in the immature rat. *Biol. Reprod.* 21, 241–249. <https://doi.org/10.1095/biolreprod21.1.241>
- Chen, B., Chen, D., Jiang, Z., Li, J., Liu, S., Dong, Y., Yao, W., Akingbemi, B., Ge, R., Li, X., 2014. Effects of Estradiol and Methoxychlor on Leydig Cell Regeneration in the Adult Rat Testis. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 7812–7826. <https://doi.org/10.3390/ijms15057812>
- Chen, C.W., Hurd, C., Vorojeikina, D.P., Arnold, S.F., Notides, A.C., 1997. Transcriptional activation of the human estrogen receptor by DDT isomers and metabolites in yeast and MCF-7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 53, 1161–1172. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(97\)00097-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(97)00097-x)
- Chen, L., Zhao, Y., Li, L., Xie, L., Chen, X., Liu, J., Li, X., Jin, L., Li, X., Ge, R.-S., 2018. Bisphenol A stimulates differentiation of rat stem Leydig cells in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 474, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.003>
- Chen, M., Cai, H., Yang, J.-L., Lu, C.-L., Liu, T., Yang, W., Guo, J., Hu, X.-Q., Fan, C.-H., Hu, Z.-Y., Gao, F., Liu, Y.-X., 2008. Effect of Heat Stress on Expression of Junction-Associated Molecules and Upstream Factors Androgen Receptor and Wilms' Tumor 1 in Monkey Sertoli Cells. *Endocrinology* 149, 4871–4882. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1093>
- Chen, X., Zhong, S., Zhang, M., Zhong, W., Bai, S., Zhao, Y., Li, C., Lu, S., Li, W., 2021. Urinary parabens, bisphenol A and triclosan in primiparas from Shenzhen, China: Implications for exposure and health risks. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 19, 251–259. <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00599-1>
- Cheng, C.Y., Wong, E.W.P., Yan, H.H.N., Mruk, D.D., 2010. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: New insights and advances. *Mol. Cell. Endocrinol.* 315, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.004>

- Chimento, A., Casaburi, I., Bartucci, M., Patrizii, M., Dattilo, R., Avena, P., Andò, S., Pezzi, V., Sirianni, R., 2013. Selective GPER activation decreases proliferation and activates apoptosis in tumor Leydig cells. *Cell Death Dis.* 4, e747–e747. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.275>
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., Ruggiero, C., Maggiolini, M., Andò, S., Pezzi, V., 2012. 17 $\beta$ -Estradiol activates GPER- and ESR1-dependent pathways inducing apoptosis in GC-2 cells, a mouse spermatocyte-derived cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.017>
- Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Andò, S., Maggiolini, M., Carreau, S., Pezzi, V., 2010. 17 $\beta$ -Estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER $\alpha$ . *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.035>
- Chimento, A., Sirianni, R., Zolea, F., Bois, C., Delalande, C., Andò, S., Maggiolini, M., Aquila, S., Carreau, S., Pezzi, V., 2011. Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax: Gper and ESR involvement in rat round spermatid maturation. *Int. J. Androl.* 34, 420–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01100.x>
- Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Pineda Torra, I., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.-C., Chapman, J., Najib, J., Staels, B., 1998. Activation of Proliferator-activated Receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  Induces Apoptosis of Human Monocyte-derived Macrophages. *J. Biol. Chem.* 273, 25573–25580. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25573>
- Claessens, J., Pirard, C., Charlier, C., 2022. Determination of contamination levels for multiple endocrine disruptors in hair from a non-occupationally exposed population living in Liege (Belgium). *Sci. Total Environ.* 815. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152734>
- Clark, D.E., Poteet-Smith, C.E., Smith, J.A., Lannigan, D.A., 2001. Rsk2 allosterically activates estrogen receptor  $\alpha$  by docking to the hormone-binding domain. *EMBO J.* 20, 3484–3494.
- Clermont, Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52, 198–236. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198>
- Clermont, Y., Bustos-Obregon, E., 1968. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted “in toto.” *Am. J. Anat.* 122, 237–247. <https://doi.org/10.1002/aja.1001220205>
- Clermont, Y., Harvey, S.C., 1972. Duration of the Cycle of the Seminiferous Epithelium of Normal, Hypophysectomized and Hypophysectomized-Hormone Treated Albino Rats. *Endocrinology* 76, 80–89. <https://doi.org/10.1210/endo-76-1-80>
- Clermont, Y., Leblond, C.P., Messier, B., 1959. Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Expérimentale* 48, 37–55.
- Colborn, T., Clement, C., 1992. *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functionnal Development: the Wildlife/Human Connection*, Princeton Scientific Publishing Company. ed, Advances in modern environmental toxicology. Princeton, N.J.
- Comşa, Ş., Cimpean, A.M., Raica, M., 2015. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Res.* 35, 3147–3154.
- Conley, J.M., Hannas, B.R., Furr, J.R., Wilson, V.S., Gray, L.E., 2016. A Demonstration of the Uncertainty in Predicting the Estrogenic Activity of Individual Chemicals and Mixtures From an *In Vitro* Estrogen Receptor Transcriptional Activation Assay (T47D-KBluc) to the *In Vivo* Uterotrophic Assay Using Oral Exposure. *Toxicol. Sci.* 153, 382–395. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw134>

- Cooke, P.S., Nanjappa, M.K., Ko, C., Prins, G.S., Hess, R.A., 2017. Estrogens in Male Physiology. *Physiol. Rev.* 97, 995–1043. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>
- Cooke, P.S., Walker, W.H., 2022. Nonclassical androgen and estrogen signaling is essential for normal spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 121, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.05.032>
- Covaci, A., Hond, E.D., Geens, T., Govarts, E., Koppen, G., Frederiksen, H., Knudsen, L.E., Mørck, T.A., Gutleb, A.C., Guignard, C., Cocco, E., Horvat, M., Heath, E., Kosjek, T., Mazej, D., Tratnik, J.S., Castaño, A., Esteban, M., Cutanda, F., Ramos, J.J., Berglund, M., Larsson, K., Jönsson, B.A.G., Biot, P., Casteleyn, L., Joas, R., Joas, A., Bloemen, L., Sepai, O., Exley, K., Schoeters, G., Angerer, J., Kolossa-Gehring, M., Fiddicke, U., Aerts, D., Koch, H.M., 2015. Urinary BPA measurements in children and mothers from six European member states: Overall results and determinants of exposure. *Environ. Res.* 141, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.008>
- Cowley, S., Hoare, S., Mosselman, S., Parker, M., 1997. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 19858–19862. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19858>
- Cripps, S.M., Mattiske, D.M., Black, J.R., Risbridger, G.P., Govers, L.C., Phillips, T.R., Pask, A.J., 2019. A loss of estrogen signaling in the aromatase deficient mouse penis results in mild hypospadias. *Differentiation* 109, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.09.001>
- Cundliffe, E., Davies, J.E., 1977. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, 491–499.

## - D -

- Dabeer, S., Afjal, M., Ahmad, S., Fatima, M., Habib, H., Parvez, S., Raisuddin, S., 2019. Transgenerational effect of parental obesity and chronic parental bisphenol A exposure on hormonal profile and reproductive organs of preadolescent Wistar rats of F1 generation: A one-generation study. *Hum. Exp. Toxicol.* 96032711987301. <https://doi.org/10.1177/0960327119873017>
- Damestoy, A., Perrard, M.-H., Vigier, M., Sabido, O., Durand, P., 2005. Transforming growth factor beta-1 decreases the yield of the second meiotic division of rat pachytene spermatocytes in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-22>
- De Gendt, K., McKinnell, C., Willems, A., Saunders, P.T.K., Sharpe, R.M., Atanassova, N., Swinnen, J.V., Verhoeven, G., 2009. Organotypic Cultures of Prepubertal Mouse Testes: A Method to Study Androgen Action in Sertoli Cells while Preserving their Natural Environment. *Biol. Reprod.* 81, 1083–1092. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078360>
- De Gendt, K., Swinnen, J.V., Saunders, P.T.K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lécureuil, C., Heyns, W., Carmeliet, P., Guillou, F., Sharpe, R.M., Verhoeven, G., 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 1327–1332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308114100>
- Delbès, G., Levacher, C., Duquenne, C., Racine, C., Pakarinen, P., Habert, R., 2005. Endogenous Estrogens Inhibit Mouse Fetal Leydig Cell Development via Estrogen Receptor  $\alpha$ . *Endocrinology* 146, 2454–2461. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1540>

- Demaegdt, H., Daminet, B., Evrard, A., Scippo, M.-L., Muller, M., Pussemier, L., Callebaut, A., Vandermeiren, K., 2016. Endocrine activity of mycotoxins and mycotoxin mixtures. *Food Chem. Toxicol.* 96, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.033>
- Desai, M., Ferrini, M.G., Jellyman, J.K., Han, G., Ross, M.G., 2018. In vivo and in vitro bisphenol A exposure effects on adiposity. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 9, 678–687. <https://doi.org/10.1017/S2040174418000600>
- Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Gaudriault, P., Zalko, D., Antignac, J.P., Deceuninck, Y., Platel, C., Dejuqc-Rainsford, N., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2017. Parallel assessment of the effects of bisphenol A and several of its analogs on the adult human testis. *Hum. Reprod.* 32, 1465–1473. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex093>
- Dhar, J.D., Setty, B.S., 1976. Epididymal response to exogenous testosterone in rats sterilized neonatally by estrogen. *Endokrinology* 68, 14–21.
- Di Donato, M., Cernerà, G., Giovannelli, P., Galasso, G., Bilancio, A., Migliaccio, A., Castoria, G., 2017. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 457, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.045>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Di Napoli, I., Tagliaferri, S., Sommella, E., Salviati, E., Porri, D., Raspini, B., Cena, H., Campiglia, P., La Rocca, C., Cerbo, R.M., De Giuseppe, R., 2021. Lifestyle Habits and Exposure to BPA and Phthalates in Women of Childbearing Age from Northern Italy: A Pilot Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 9710. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189710>
- Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Sassone-Corsi, P., 1998. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 13612–13617.
- Dodds, E.C., Goldberg, L., Lawson, W., Robinson, R., 1938. Oestrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds. *Nature* 141, 247–248.
- Dodds, E.C., Lawson, W., 1936. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137.
- Doll, S., Burlingame, A.L., 2015. Mass Spectrometry-Based Detection and Assignment of Protein Posttranslational Modifications. *ACS Chem. Biol.* 10, 63–71. <https://doi.org/10.1021/cb500904b>
- Dostalova, P., Zatecka, E., Dvorakova-Hortova, K., 2017. Of Oestrogens and Sperm: A Review of the Roles of Oestrogens and Oestrogen Receptors in Male Reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 904. <https://doi.org/10.3390/ijms18050904>
- D'Souza, R., Gill-Sharma, M.K., Pathak, S., Kedia, N., Kumar, R., Balasinar, N., 2005. Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 241, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.04.011>
- Dualde, P., Pardo, O., Corpas-Burgos, F., Kuligowski, J., Gormaz, M., Vento, M., Pastor, A., Yusà, V., 2019. Biomonitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. *Sci. Total Environ.* 668, 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.024>

Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., Mark, M., 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha and beta on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277–4291. <https://doi.org/10.1242/dev.127.19.4277>

## - E -

Ebling, F.J., Brooks, A.N., Cronin, A.S., Ford, H., Kerr, J.B., 2000. Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse. *Endocrinology* 141, 2861–2869. <https://doi.org/10.1210/endo.141.8.7596>

Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., Korach, K.S., 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796–4805. <https://doi.org/10.1210/endo.137.11.8895349>

Ejaredar, M., Lee, Y., Roberts, D.J., Sauve, R., Dewey, D., 2017. Bisphenol A exposure and children's behavior: A systematic review. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 27, 175–183. <https://doi.org/10.1038/jes.2016.8>

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.-J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2015. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.* 103, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.005>

Eladak, S., Moison, D., Guerquin, M.-J., Matilionyte, G., Kilcoyne, K., N'Tumba-Byn, T., Messiaen, S., Deceuninck, Y., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Antignac, J.-P., Mitchell, R., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2018. Effects of environmental Bisphenol A exposures on germ cell development and Leydig cell function in the human fetal testis. *PLoS One* 13.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.

Engel, S.M., Levy, B., Liu, Z., Kaplan, D., Wolff, M.S., 2006. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod. Toxicol.* 21, 110–112. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.07.007>

Eze, U.A., Huntriss, J.D., Routledge, M.N., Gong, Y.Y., 2019. In vitro effects of single and binary mixtures of regulated mycotoxins and persistent organochloride pesticides on steroid hormone production in MA-10 Leydig cell line. *Toxicol. In Vitro* 60, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.06.007>

## - F -

Fajas, L., Fruchart, J.-C., Auwerx, J., 1998. PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 438, 55–60. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01273-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01273-3)

Feng, Y., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Guo, Q., Shao, B., 2016. Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere* 147, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.081>

Fent, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 1–117.

Ferguson, L., Agoulnik, A.I., 2013. Testicular cancer and cryptorchidism. *Front. Endocrinol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00032>

- Filardo, E., Quinn, J., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., Thomas, P., 2007. Activation of the Novel Estrogen Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) at the Plasma Membrane. *Endocrinology* 148, 3236–3245. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1605>
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton Jr, A.R., Bland, K.I., 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.* 16, 70–84. <https://doi.org/10.1210/mend.16.1.0758>
- Filipiak, E., Walczak-Jedrzejska, R., Oszukowska, E., Guminska, A., Marchlewska, K., Kula, K., Slowikowska-Hilczer, J., 2010. Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis. *Folia Histochem. Cytobiol.* 47. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0049-4>
- Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C., Pointis, G., 2004. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.* 18, 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.01.002>
- Fisher, C.R., Graves, K.H., Parlow, A.F., Simpson, E.R., 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6965–6970. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6965>
- Fisher, J.S., Millar, M.R., Majdic, G., Saunders, P.T.K., Fraser, H.M., Sharpe, R.M., 1997. Immunolocalisation of oestrogen receptor- $\alpha$  within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J. Endocrinol.* 153, 485–495. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1530485>
- Fleck, S.C., Churchwell, M.I., Doerge, D.R., Teeguarden, J.G., 2016. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens II: Soy isoflavones and zearalenone in pregnant women. *Food Chem. Toxicol.* 95, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.05.021>
- Fliss, A.E., Benzeno, S., Rao, J., Caplan, A.J., 2000. Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72, 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00037-6)
- Flouriot, G., 2000. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J.* 19, 4688–4700. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4688>
- Flück, C.E., Miller, W.L., Auchus, R.J., 2003. The 17, 20-Lyase Activity of Cytochrome P450c17 from Human Fetal Testis Favors the  $\Delta^5$  Steroidogenic Pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3762–3766. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030143>
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., Evans, R.M., 1995. 15-deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . *Cell* 83, 803–812.
- Forsyth, D.M., Yoshizawa, T., Morooka, N., Tuite, J., 1977. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Appl. Environ. Microbiol. J.* 34, 547–552. <https://doi.org/10.1128/aem.34.5.547-552.1977>
- Fowler, K.A., Gill, K., Kirma, N., Dillehay, D.L., Tekmal, R.R., 2000. Overexpression of aromatase leads to development of testicular Leydig cell tumors: an in vivo model for hormone-mediated testicular cancer. *Am. J. Pathol.* 156, 347–353. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64736-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64736-0)
- Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M.M., Mizukami, Y., 2006. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 904–910. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.191>

- G -

- Gao, Y., Zhao, Y., Zhang, H., Zhang, P., Liu, J., Feng, Y., Men, Y., Li, L., Shen, W., Sun, Z., Min, L., 2019. Pubertal exposure to low doses of zearalenone disrupting spermatogenesis through ER $\alpha$  related genetic and epigenetic pathways. *Toxicol. Lett.* 315, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.08.007>
- Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., Lebailly, P., 2006. Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3479–3484. <https://doi.org/10.1021/jf060179i>
- Gaudriault, P., Mazaud-Guittot, S., Lavoué, V., Coiffec, I., Lesné, L., Dejuçq-Rainsford, N., Scholze, M., Kortenkamp, A., Jégou, B., 2017. Endocrine Disruption in Human Fetal Testis Explants by Individual and Combined Exposures to Selected Pharmaceuticals, Pesticides, and Environmental Pollutants. *Environ. Health Perspect.* 125, 87004. <https://doi.org/10.1289/EHP1014>
- Genissel, C., Levallet, J., Carreau, S., 2001. Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production. *J. Endocrinol.* 168, 95–105.
- Gibbs, P.E., Bryan, G., 1996. Reproductive Failure in the Gastropod *Nucella Lapillus* Associated with Imposex Caused by Tributyltin Pollution: A Review. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1507-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1507-7_13)
- Gill-Sharma, M.K., D'souza, S., Padwal, V., Balasinor, N., Aleem, M., Parte, P., Juneja, H.S., 2001. Antifertility effects of estradiol in adult male rats. *J. Endocrinol. Invest.* 24, 598–607.
- Goldstein, K.M., Seyler, D.E., Durand, P., Perrard, M.-H., Baker, T.K., 2016. Use of a rat ex-vivo testis culture method to assess toxicity of select known male reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.* 60, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.01.003>
- Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T., 2015. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.* 36, E1–E150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>
- Göttlicher, M., Heck, S., Herrlich, P., 1998. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.* 76, 480–489.
- Govers, L.C., Phillips, T.R., Mattiske, D.M., Rashoo, N., Black, J.R., Sinclair, A., Baskin, L.S., Risbridger, G.P., Pask, A.J., 2019. A critical role for estrogen signaling in penis development. *FASEB J.* 33, 10383–10392. <https://doi.org/10.1096/fj.201802586RR>
- Gray, L.E., Furr, J.R., Conley, J.M., Lambright, C.S., Evans, N., Cardon, M.C., Wilson, V.S., Foster, P.M., Hartig, P.C., 2019. A Conflicted Tale of Two Novel AR Antagonists In Vitro and In Vivo: Pyrifluquinazon Versus Bisphenol C. *Toxicol. Sci.* 168, 632–643. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz010>
- Graziani, N.S., Carreras, H., Wannaz, E., 2019. Atmospheric levels of BPA associated with particulate matter in an urban environment. *Heliyon* 5, e01419.
- Greco, T.L., Payne, A.H., 1994. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135, 262–268.
- Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., Shine, J., 1986. Sequence and Expression of Human Estrogen Receptor Complementary DNA. *Science* 231, 1150–1154. <https://doi.org/10.1126/science.3753802>



- Griffin, J.E., 1992. Androgen resistance-the clinical and molecular spectrum. *N. Engl. J. Med.* 326, 611–618. <https://doi.org/10.1056/NEJM199202273260906>
- Griswold, M.D., 2016. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol. Rev.* 96, 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>
- Griswold, M.D., 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.* 52, 211–216. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.2.211>
- Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 102, 680–688.
- Guo, J., Zhang, J., Wu, C., Xiao, H., Lv, S., Lu, D., Qi, X., Feng, C., Liang, W., Chang, X., Zhang, Y., Xu, H., Cao, Y., Wang, G., Zhou, Z., 2020. Urinary bisphenol A concentrations and adiposity measures at age 7 years in a prospective birth cohort. *Chemosphere* 251, 126340. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126340>

## - H -

- Haas, M.J., Raheja, P., Jaimungal, S., Sheikh-Ali, M., Mooradian, A.D., 2012. Estrogen-dependent inhibition of dextrose-induced endoplasmic reticulum stress and superoxide generation in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 2161–2167. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.009>
- Habert, R., Delbes, G., Duquenne, C., Livera, G., Levacher, C., 2006. Effets des estrogènes sur le développement du testicule pendant la vie fœtale et néonatale. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 34, 970–977. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2006.07.030>
- Hall, J.M., Couse, J.F., Korach, K.S., 2001. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 36869–36872. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100029200>
- Hall, J.M., Korach, K.S., 2002. Analysis of the Molecular Mechanisms of Human Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  Reveals Differential Specificity in Target Promoter Regulation by Xenoestrogens. *J. Biol. Chem.* 277, 44455–44461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200849200>
- Hallaj Salahipour, M., Hasanzadeh, S., Malekinejad, H., Razi, M., Farrokhi-Ardebili, F., 2019. Deoxynivalenol reduces quality parameters and increases DNA damage in mice spermatozoa. *Andrologia* 51, e13238. <https://doi.org/10.1111/and.13238>
- Hamid, N., Junaid, M., Pei, D.-S., 2021. Combined toxicity of endocrine-disrupting chemicals: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 215, 112136. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112136>
- Hanoux, V., Eguida, J., Fleurot, E., Levallet, J., Bonnamy, P.-J., 2018. Increase in hyaluronic acid degradation decreases the expression of estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 476, 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.05.008>
- Harris, E.P., Allardice, H.A., Schenk, A.K., Rissman, E.F., 2018. Effects of maternal or paternal bisphenol A exposure on offspring behavior. *Horm. Behav.* 101, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.09.017>
- Hase, T., Yoshimura, R., Mitsuhashi, M., Segawa, Y., Kawahito, Y., Wada, S., Nakatani, T., Sano, H., 2002. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists. *Urology* 60, 542–547. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(02\)01747-8](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(02)01747-8)

- Hayes, F.J., Decruz, S., Boepple, P.A., Crowley, W.F., 2001. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 53–58. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.1.7101>
- Hayes, F.J., Seminara, S.B., Decruz, S., Boepple, P.A., Crowley, W.F., 2000. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3027–3035. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6795>
- Heinrich, A., DeFalco, T., 2020. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology* 8, 903–914. <https://doi.org/10.1111/andr.12703>
- Herbst, A., Ulfelder, H., Poskanzer, D., 1971. Adenocarcinoma of the vagina, Association of Maternal Stilbestrol Therapy with Tumor Appearance in Young Women. *N. Engl. J. Med.* 284, 878–881.
- Hernandez-Quiles, M., Broekema, M.F., Kalkhoven, E., 2021. PPAR $\gamma$  in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Front. Endocrinol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.624112>
- Hess, R.A., Vogl, A.W., 2014. Sertoli cell anatomy and cytoskeleton, in: *Sertoli Cell Biology*. Elsevier, Waltham, MA.
- Hewitt, S.C., Korach, K.S., 2018. Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocr. Rev.* 39, 664–675. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00087>
- Hewitt, S.C., Winuthayanon, W., Lierz, S.L., Hamilton, K.J., Donoghue, L.J., Ramsey, J.T., Grimm, S.A., Arao, Y., Korach, K.S., 2017. Role of ER $\alpha$  in Mediating Female Uterine Transcriptional Responses to IGF1. *Endocrinology* 158, 2427–2435. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00349>
- Hikim, A.P., Wang, C., Leung, A., Swerdloff, R.S., 1995. Involvement of Apoptosis in the Induction of Germ Cell Degeneration in Adult Rats after Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist Treatment. *Endocrinology* 136, 2770–2775. <https://doi.org/10.1210/endo.136.6.7750502>
- Hill, C.E., Myers, J.P., Vandenberg, L.N., 2018. Nonmonotonic Dose–Response Curves Occur in Dose Ranges That Are Relevant to Regulatory Decision-Making. *Dose-Response* 16, 155932581879828. <https://doi.org/10.1177/1559325818798282>
- Holdcraft, R.W., Braun, R.E., 2004. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 131, 459–467. <https://doi.org/10.1242/dev.00957>
- Horwitz, K.B., Costlow, M.E., McGuire, W.L., 1975. MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids* 26, 785–795.
- Howard, S.G., 2019. Exposure to environmental chemicals and type 1 diabetes: an update. *J. Epidemiol. Community Health* 73, 483–488. <https://doi.org/10.1136/jech-2018-210627>
- Huang, R., Liu, Z., Yuan, S., Yin, H., Dang, Z., Wu, P., 2017. Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000–2016) and its risk analysis. *Environ. Pollut.* 230, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.026>
- Huckins, C., 1971. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 169, 533–557. <https://doi.org/10.1002/ar.1091690306>
- Huckins, C., Clermont, Y., 1968. Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early postnatal life. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 51, 341–354.

- Huhtaniemi, I., Ikonen, M., Vihko, R., 1970. Presence of Testosterone and Other Neutral Steroids in Human Fetal Testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 715–720. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90640-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90640-6)
- Hunt, D.M., Lau, I.-F., Saksena, S.K., Chang, M.-C., 1978. Endocrinological and physiological features after steroid treatment of male rats. *Arch. Androl.* 1, 311–320.
- Hunt, D.M., Saksena, S.K., Chang, M.C., 1979. Effects of Estradiol-17/ $\beta$  on Reproduction in Adult Male Rats. *Arch. Androl.* 2, 129–133.
- Hutson, D.D., Gurralla, R., Ogola, B.O., Zimmerman, M.A., Mostany, R., Satou, R., Lindsey, S.H., 2019. Estrogen receptor profiles across tissues from male and female *Rattus norvegicus*. *Biol. Sex Differ.* 10. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0219-9>
- Hutson, J.M., 2000. Cryptorchidism and Hypospadias.
- Hutson, J.M., Balic, A., Nation, T., Southwell, B., 2010. Cryptorchidism. *Semin. Pediatr. Surg.* 19, 215–224. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2010.04.001>
- Hutson, J.M., Southwell, B., Li, R., Lie, G., Ismail, K., Harisis, G., Chen, N., 2013. The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism. *Endocr. Rev.* 34, 725–752. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1089>

- I -

- Iida, H., Maehara, K., Doiguchi, M., Mōri, T., Yamada, F., 2003. Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells. *Reprod. Toxicol.* 17, 457–464. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(03\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(03)00034-0)
- Inoue, K., Kawahito, Y., Tsubouchi, Y., Kohno, M., Yoshimura, R., Yoshikawa, T., Sano, H., 2001. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  in Renal Cell Carcinoma and Growth Inhibition by Its Agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 727–732. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5640>
- Iordanov, M.S., Pribnow, D., Magun, J.L., Dinh, T.-H., Pearson, J.A., Chen, S.L., Magun, B.E., 1997. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3373–3381.
- Iwata, Y., Miyamoto, S., Takamura, M., Yanagisawa, H., Kasuya, A., 2001. Interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its agonists: docking study of oximes having 5-benzyl-2,4-thiazolidinedione. *J. Mol. Graph. Model.* 19, 536–542. [https://doi.org/10.1016/s1093-3263\(01\)00086-9](https://doi.org/10.1016/s1093-3263(01)00086-9)

- J -

- Jahnukainen, K., Chrysis, D., Hou, M., Parvinen, M., Eksborg, S., Söder, O., 2004. Increased Apoptosis Occurring During the First Wave of Spermatogenesis Is Stage-Specific and Primarily Affects Midpachytene Spermatocytes in the Rat Testis. *Biol. Reprod.* 70, 290–296. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018390>
- Jee, Y., Noh, E.-M., Cho, E.-S., Son, H.-Y., 2010. Involvement of the Fas and Fas ligand in testicular germ cell apoptosis by zearalenone in rat. *J. Vet. Sci.* 11, 115. <https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.2.115>

- Jégou, B., Pineau, C., Dupaix, A., 1995. La cellule de Sertoli : actualisation du concept de cellule nourricière. *médecine/sciences* 11, 519–527.
- Jeminiwa, B.O., Knight, R.C., Abbot, K.L., Pondugula, S.R., Akingbemi, B.T., 2021. Gonadal sex steroid hormone secretion after exposure of male rats to estrogenic chemicals and their combinations. *Mol. Cell. Endocrinol.* 533, 111332. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111332>
- Jensen, E.V., 1962. On the Mechanism of Estrogen Action. *Perspect. Biol. Med.* 6, 47–60. <https://doi.org/10.1353/pbm.1963.0005>
- Jia, R., Liu, W., Zhao, L., Cao, L., Shen, Z., 2020. Low doses of individual and combined deoxynivalenol and zearalenone in naturally moldy diets impair intestinal functions via inducing inflammation and disrupting epithelial barrier in the intestine of piglets. *Toxicol. Lett.* 333, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.032>
- Jiang, J., Sarwar, N., Peston, D., Kulinskaya, E., Shousha, S., Coombes, R.C., Ali, S., 2007. Phosphorylation of Estrogen Receptor- $\alpha$  at Ser167 Is Indicative of Longer Disease-Free and Overall Survival in Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 13, 5769–5776. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0822>
- Jin, Y., Wang, L., Fu, Z., 2013. Oral exposure to atrazine modulates hormone synthesis and the transcription of steroidogenic genes in male peripubertal mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 184, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.01.010>
- Jo, M.J., Park, J.-H., An, K.-A., Choi, H., Kang, Y.-S., Hwang, M., 2020. Quantification of bisphenols in Korean urine using online solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 80. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103491>
- John, N., Rehman, H., Razak, S., David, M., Ullah, W., Afsar, T., Almajwal, A., Alam, I., Jahan, S., 2019. Comparative study of environmental pollutants bisphenol A and bisphenol S on sexual differentiation of anteroventral periventricular nucleus and spermatogenesis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 17. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0491-x>
- Jørgensen, N., Müller, J., Giwercman, A., Visfeldt, T., Møller, H., Skakkebaek, N.E., 1995. DNA content and expression of tumour markers in germ cells adjacent to germ cell tumours in childhood: probably a different origin for infantile and adolescent germ cell tumours. *J. Pathol.* 176, 269–278. <https://doi.org/10.1002/path.1711760309>
- Joseph, A., Shur, B.D., Hess, R.A., 2011. Estrogen, Efferent Ductules, and the Epididymis. *Biol. Reprod.* 84, 207–217. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087353>
- Joseph, A., Shur, B.D., Ko, C., Chambon, P., Hess, R.A., 2010. Epididymal Hypo-Osmolality Induces Abnormal Sperm Morphology and Function in the Estrogen Receptor Alpha Knockout Mouse1. *Biol. Reprod.* 82, 958–967. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080366>

## - K -

- Kahsai, T.Z., Enders, G.C., Gunwar, S., Brunmark, C., Wieslander, J., Kalluri, R., Zhou, J., Noelken, M.E., Hudson, B.G., 1997. Seminiferous Tubule Basement Membrane. *J. Biol. Chem.* 272, 17023–17032.
- Kalfa, N., Sultan, C., Baskin, L.S., 2010. Hypospadias: etiology and current research. *Urol. Clin. North Am.* 37, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2010.03.010>

- Kamińska, A., Pardyak, L., Marek, S., Górowska-Wójtowicz, E., Kotula-Balak, M., Bilińska, B., Hejmej, A., 2018. Bisphenol A and dibutyl phthalate affect the expression of juxtacrine signaling factors in rat testis. *Chemosphere* 199, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.011>
- Karnam, S.S., Ghosh, R.C., Mondal, S., Mondal, M., 2015. Evaluation of subacute bisphenol – A toxicity on male reproductive system. *Vet. World* 8, 738–744. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.738-744>
- Kaufman, R.H., Binder, G.L., Gray, P.M., Adam, E., 1977. Upper genital tract changes associated with exposure in utero to diethylstilbestrol. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 128, 51–59. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(77\)90294-0](https://doi.org/10.1016/0002-9378(77)90294-0)
- Keri, R.A., Ho, S.-M., Hunt, P.A., Knudsen, K.E., Soto, A.M., Prins, G.S., 2007. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* 24, 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.008>
- Kharrazian, D., 2014. The Potential Roles of Bisphenol A (BPA) Pathogenesis in Autoimmunity. *Autoimmune Dis.* 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/743616>
- Kim, I.-H., Son, H.-Y., Cho, S.-W., Ha, C.-S., Kang, B.-H., 2003. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol. Lett.* 138, 185–192.
- Kim, K., Thu, N., Saville, B., Safe, S., 2003. Domains of Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) Required for ER $\alpha$ /Sp1-Mediated Activation of GC-Rich Promoters by Estrogens and Antiestrogens in Breast Cancer Cells. *Mol. Endocrinol.* 17, 804–817. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0406>
- Klinge, C.M., 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 29, 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>
- Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Nebbia, C.S., Oswald, I.P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., De Saeger, S., Eriksen, G.S., Farmer, P., Fremy, J., Gong, Y.Y., Meyer, K., Naegeli, H., Parent-Massin, D., Rietjens, I., van Egmond, H., Altieri, A., Eskola, M., Gergelova, P., Ramos Bordajandi, L., Benkova, B., Dörr, B., Gkrillas, A., Gustavsson, N., van Manen, M., Edler, L., 2017. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J.* 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>
- Koike, E., Yanagisawa, R., Win-Shwe, T.-T., Takano, H., 2018. Exposure to low-dose bisphenol A during the juvenile period of development disrupts the immune system and aggravates allergic airway inflammation in mice. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 32, 2058738418774897.
- Kolesarova, A., Medvedova, M., Halenar, M., Sirotkin, A.V., Bulla, J., 2017. The influence of deoxynivalenol and zearalenone on steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells *in vitro*. *J. Environ. Sci. Health Part B* 52, 823–832. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1356175>
- Kondarewicz, A., Kolasa, A., Zawiślak, B., Baranowska-Bosiacka, I., Marchlewicz, M., Wenda-Różewicka, L., Wiszniewska, B., 2012. Testis morphology in rats chronically treated with letrozole, an aromatase inhibitor. *Folia Histochem. Cytobiol.* 49, 677–684. <https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0091>
- Kortenkamp, A., Faust, M., Scholze, M., Backhaus, T., 2007. Low-Level Exposure to Multiple Chemicals: Reason for Human Health Concerns? *Environ. Health Perspect.* 115, 106–114. <https://doi.org/10.1289/ehp.9358>

- Krege, J., Hodgin, J., Couse, J., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J., Sar, M., Korach, K., Gustafsson, J., Smithies, O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 15677–15682. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15677>
- Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., Walczak, J., Buszewski, B., 2018. Microbiology neutralization of zearalenone using *Lactococcus lactis* and *Bifidobacterium* sp. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 943–952. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0555-8>
- Kubota, Y., Temelcos, C., Bathgate, R.A.D., Smith, K.J., Scott, D., Zhao, C., Hutson, J.M., 2002. The role of insulin 3, testosterone, Müllerian inhibiting substance and relaxin in rat gubernacular growth. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 900–905. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.10.900>
- Kuciel-Lisieska, G., Obremski, K., Stelmachów, J., Gajęcka, M., Zielonka, L., Jakimiuk, E., Gajęcki, M., 2008. The presence of zearalenone in blood plasma in women with neoplastic lesions in a mammary gland. *Bull. Vet. Inst. Puławy.*
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 5925–5930. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B., Gustafsson, J.-Å., 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor B. *Endocrinology* 139, 4252–4263. <https://doi.org/10.1210/endo.139.11.4252>
- Kumar, A., Dumasia, K., Deshpande, S., Balasinar, N.H., 2017. Direct regulation of genes involved in sperm release by estrogen and androgen through their receptors and coregulators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 171, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.02.017>
- Kumar, N., Srivastava, S., Burek, M., Förster, C.Y., Roy, P., 2016. Assessment of estradiol-induced gene regulation and proliferation in an immortalized mouse immature Sertoli cell line. *Life Sci.* 148, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.027>
- Kurebayashi, H., 2003. Disposition of a Low Dose of 14C-Bisphenol A in Male Rats and Its Main Biliary Excretion as BPA Glucuronide. *Toxicol. Sci.* 73, 17–25. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg040>
- Kurosumi, M., Ishimura, K., Fujita, H., Osawa, Y., 1985. Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. *Histochemistry* 83, 401–404. <https://doi.org/10.1007/BF00509199>

## - L -

- La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- La Rosa, P., Pellegrini, M., Totta, P., Acconcia, F., Marino, M., 2014. Xenoestrogens Alter Estrogen Receptor (ER)  $\alpha$  Intracellular Levels. *PLoS ONE* 9, e88961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088961>
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S., Belzunces, L., Edmond, C., Guerbet, M., Rousselle, C., 2015. Non-monotonic dose-response relationship and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ. Health* 14. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-14-13>
- Lannigan, D.A., 2003. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68, 1–9.

- Lassen, T.H., Frederiksen, H., Jensen, T.K., Petersen, J.H., Joensen, U.N., Main, K.M., Skakkebaek, N.E., Juul, A., Jørgensen, N., Andersson, A.-M., 2014. Urinary Bisphenol A Levels in Young Men: Association with Reproductive Hormones and Semen Quality. *Environ. Health Perspect.* 122, 478–484. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307309>
- Leblanc, J.-C., Tard, A., Volatier, J.-L., Verger, P., 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Addit. Contam.* 22, 652–672. <https://doi.org/10.1080/02652030500159938>
- Leblond, C.P., Clermont, Y., 1952. Spermiogenesis of Rat, Mouse, Hamster and Guinea Pig as Revealed by the “Periodic Acid-Fuchsin Sulfurous Acid” Technique. *Am. J. Anat.* 90, 167–215. <https://doi.org/10.1002/aja.1000900202>
- Lee, A.V., Oesterreich, S., Davidson, N.E., 2015. MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 107, djv073-djv073. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv073>
- Lee, J.-H., Yi, S.-K., Kim, S.-Y., Kim, J.-S., Son, S.-A., Jeong, S.-H., Kim, J.-B., 2017. Salivary bisphenol A levels and their association with composite resin restoration. *Chemosphere* 172, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.123>
- Lee, K.-H., Hess, R.A., Bahr, J.M., Lubahn, D.B., Taylor, J.A., Bunick, D., 2000. Estrogen Receptor alpha Has a Functional Role in the Mouse Rete Testis and Efferent Ductules. *Biol. Reprod.* 63, 1873–1880. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1873>
- Lei, Z.M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X., Rao, C.V., 2001. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 15, 184–200. <https://doi.org/10.1210/mend.15.1.0586>
- Levallet, J., Bilinska, B., Mittre, H., Genissel, C., Fresnel, J., Carreau, S., 1998. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol. Reprod.* 58, 919–926.
- Leydig, F., 1850. Zur Anatomie der Männlichen Geschlechtsorgane und Analdrüsen der Säugethiere. *Z. Für Wiss. Zool.* 2, 1–57.
- Li, D.-K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L.J., Gao, E., Yuan, W., 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil. Steril.* 95, 625–630.e4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.09.026>
- Li, J., Guo, C., Wu, J., 2019. 15-Deoxy- $\Delta$ -12,14-Prostaglandin J2 (15d-PGJ2), an Endogenous Ligand of PPAR- $\gamma$ : Function and Mechanism. *PPAR Res.* 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/7242030>
- Li, J., Mao, R., Zhou, Q., Ding, L., Tao, J., Ran, M.-M., Gao, E.-S., Yuan, W., Wang, J.-T., Hou, L.-F., 2016. Exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of ERK signal pathway. *Toxicol. Mech. Methods* 26, 180–188. <https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1139024>
- Li, X., Nokkala, E., Yan, W., Streng, T., Saarinen, N., Wärrri, A., Huhtaniemi, I., Santti, R., Mäkelä, S., Poutanen, M., 2001. Altered Structure and Function of Reproductive Organs in Transgenic Male Mice Overexpressing Human Aromatase. *Endocrinology* 142, 2435–2442.
- Li, X., Rahman, N., 2008. Impact of androgen/estrogen ratio: Lessons learned from the aromatase over-expression mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.07.025>
- Li, X., Strauss, L., Kaatrasalo, A., Mayerhofer, A., Huhtaniemi, I., Santti, R., Mäkelä, S., Poutanen, M., 2006. Transgenic Mice Expressing P450 Aromatase as a Model for Male Infertility Associated

- with Chronic Inflammation in the Testis. *Endocrinology* 147, 1271–1277. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0654>
- Li, X.-X., Chen, S.-R., Shen, B., Yang, J.-L., Ji, S.-Y., Wen, Q., Zheng, Q.-S., Li, L., Zhang, J., Hu, Z.-Y., Huang, X.-X., Liu, Y.-X., 2013. The Heat-Induced Reversible Change in the Blood-Testis Barrier (BTB) Is Regulated by the Androgen Receptor (AR) via the Partitioning-Defective Protein (Par) Polarity Complex in the Mouse. *Biol. Reprod.* 89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109405>
- Li, Y., Wang, J.-P., Santen, R.J., Kim, T.-H., Park, H., Fan, P., Yue, W., 2010. Estrogen Stimulation of Cell Migration Involves Multiple Signaling Pathway Interactions. *Endocrinology* 151, 5146–5156. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1506>
- Liang, S., Yin, L., Shengyang Yu, K., Hofmann, M.-C., Yu, X., 2017. High-Content Analysis Provides Mechanistic Insights into the Testicular Toxicity of Bisphenol A and Selected Analogues in Mouse Spermatogonial Cells. *Toxicol. Sci.* 155, 43–60. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw178>
- Liang, Z., Ren, Z., Gao, S., Chen, Y., Yang, Y., Yang, D., Deng, J., Zuo, Z., Wang, Y., Shen, L., 2015. Individual and combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on mouse kidney. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 686–691. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.029>
- Liao, Y., Peng, Z., Chen, L., Nüssler, A.K., Liu, L., Yang, W., 2018. Deoxynivalenol, gut microbiota and immunotoxicity: A potential approach? *Food Chem. Toxicol.* 112, 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.013>
- Lind, P.M., Lind, L., 2018. Endocrine-disrupting chemicals and risk of diabetes: an evidence-based review. *Diabetologia* 61, 1495–1502. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4621-3>
- Lippman, M.E., Bolan, G., 1975. Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature* 256, 592–593. <https://doi.org/10.1038/256592a0>
- Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., He, M., Lu, Y., Wu, H., Pi, H., Luo, X., Zhang, Y., Zhong, M., Yu, Z., Zhou, Z., 2013. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death Dis.* 4, e676–e676. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.203>
- Liu, C., Duan, W., Zhang, L., Xu, S., Li, R., Chen, C., He, M., Lu, Y., Wu, H., Yu, Z., Zhou, Z., 2014. Bisphenol A exposure at an environmentally relevant dose induces meiotic abnormalities in adult male rats. *Cell Tissue Res.* 355, 223–232. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1723-6>
- Liu, Q., Wang, Y., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Zheng, W., Huang, Q., Liu, Z., Bian, J., 2014. Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression. *Toxicol. In Vitro* 28, 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.01.013>
- Liu, X., Matsushima, A., Nakamura, M., Costa, T., Nose, T., Shimohigashi, Y., 2012. Fine spatial assembly for construction of the phenol-binding pocket to capture bisphenol A in the human nuclear receptor estrogen-related receptor  $\gamma$ . *J. Biochem. (Tokyo)* 151, 403–415. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs008>
- Liu, X., Matsushima, A., Okada, H., Shimohigashi, Y., 2010. Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERR $\gamma$  between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen. *J. Biochem. (Tokyo)* 148, 247–254. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq056>
- Liu, X., Matsushima, A., Okada, H., Tokunaga, T., Isozaki, K., Shimohigashi, Y., 2007. Receptor binding characteristics of the endocrine disruptor bisphenol A for the human nuclear estrogen-related receptor  $\gamma$ . Chief and corroborative hydrogen bonds of the bisphenol A phenol-hydroxyl group with Arg316 and Glu275 residues. *FEBS J.* 274, 6340–6351. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06152.x>



- Livera, G., Delbes, G., Pairault, C., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2006. Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res.* 324, 507–521. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0167-7>
- Löfroth, M., Ghasemimehr, M., Falk, A., Vult von Steyern, P., 2019. Bisphenol A in dental materials – existence, leakage and biological effects. *Heliyon* 5, e01711. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01711>
- Long, M., Yang, S., Dong, S., Chen, X., Zhang, Y., He, J., 2017. Characterization of semen quality, testicular marker enzyme activities and gene expression changes in the blood testis barrier of Kunming mice following acute exposure to zearalenone. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 27235–27243. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0299-1>
- Lucas, T.F.G., Lazari, M.F.M., Porto, C.S., 2014. Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.015>
- Lucas, T.F.G., Royer, C., Siu, E.R., Lazari, M.F.M., Porto, C.S., 2010. Expression and Signaling of G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER) in Rat Sertoli Cells. *Biol. Reprod.* 83, 307–317. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084160>
- Lucas, T.F.G., Siu, E.R., Esteves, C.A., Monteiro, H.P., Oliveira, C.A., Porto, C.S., Lazari, M.F.M., 2008. 17Beta-Estradiol Induces the Translocation of the Estrogen Receptors ESR1 and ESR2 to the Cell Membrane, MAPK3/1 Phosphorylation and Proliferation of Cultured Immature Rat Sertoli Cells. *Biol. Reprod.* 78, 101–114. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063909>
- Lv, Y., Li, L., Fang, Y., Chen, P., Wu, S., Chen, X., Ni, C., Zhu, Q., Huang, T., Lian, Q., Ge, R.-S., 2019. In utero exposure to bisphenol A disrupts fetal testis development in rats. *Environ. Pollut.* 246, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.006>

## - M -

- Ma, R., Zhang, L., Liu, M., Su, Y.-T., Xie, W.-M., Zhang, N.-Y., Dai, J.-F., Wang, Y., Rajput, S., Qi, D.-S., Karrow, N., Sun, L.-H., 2018. Individual and Combined Occurrence of Mycotoxins in Feed Ingredients and Complete Feeds in China. *Toxins* 10, 113. <https://doi.org/10.3390/toxins10030113>
- Macheroni, C., Lucas, T.F.G., Porto, C.S., 2020. The role of estrogen receptors in rat Sertoli cells at different stages of development. *Heliyon* 6, e05363. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05363>
- Maekawa, M., Kamimura, K., Nagano, T., 1996. Peritubular Myoid Cells in the Testis: Their Structure and Function. *Arch. Histol. Cytol.* 59, 1–13. <https://doi.org/10.1679/aohc.59.1>
- Maffini, M.V., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2006. Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. *Mol. Cell. Endocrinol.* 254–255, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.04.033>
- Maggi, A., 2011. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 1054–1060. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.05.001>
- Malkov, M., Fisher, Y., Don, J., 1998. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 59, 84–92. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.84>

- Maneix, L., Antonson, P., Humire, P., Rochel-Maia, S., Castañeda, J., Omoto, Y., Kim, H.-J., Warner, M., Gustafsson, J.-\AAke, 2015. Estrogen receptor  $\beta$  exon 3-deleted mouse: The importance of non-ERE pathways in ER $\beta$  signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5135–5140.
- Mao, N., Gao, Q., Hu, H., Zhu, T., Hao, L., 2019. BPA disrupts the cardioprotection by 17 $\beta$ -oestradiol against ischemia/reperfusion injury in isolated guinea pig hearts. *Steroids* 146, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.03.006>
- Marghani, B.H., Ateya, A.I., Saleh, R.M., Halawa, A.A., Eltaysh, R.A., Awadin, W.F., Elseady, Y.Y., 2018. Bisphenol A Down-Regulates The mRNA Expression of Steroidogenic Genes and Induces Histopathological Changes in Testes Of Rats. *J. Vet. Healthc.* 1, 32–44. <https://doi.org/10.14302/issn.2575-1212.jvhc-18-2012>
- Marino, M., Galluzzo, P., Ascenzi, P., 2006. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr. Genomics* 7, 497–508. <https://doi.org/10.2174/138920206779315737>
- Mascarenhas, M.N., Cheung, H., Mathers, C.D., Stevens, G.A., 2012. Measuring infertility in populations: constructing a standard definition for use with demographic and reproductive health surveys. *Popul. Health Metr.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1478-7954-10-17>
- Mather, J.P., Attie, K.M., Woodruff, T.K., Rice, G.C., Phillips, D.M., 1990. Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis. *Endocrinology* 127, 3206–3214. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-3206>
- Mather, J.P., Gunsalus, G.L., Musto, N.A., Cheng, C.Y., Parvinen, M., Wright, W., Pérez-Infante, V., Margioris, A., Liotta, A., Becker, R., Krieger, D.T., Bardin, C.W., 1983. The hormonal and cellular control of Sertoli cell secretion. *J. Steroid Biochem.* 19, 41–51.
- Matsumoto, A., Kunugita, N., Kitagawa, K., Isse, T., Oyama, T., Foureman, G.L., Morita, M., Kawamoto, T., 2003. Bisphenol A levels in human urine. *Environ. Health Perspect.* 111, 101–104. <https://doi.org/10.1289/ehp.5512>
- Matsushima, A., Kakuta, Y., Teramoto, T., Koshiba, T., Liu, X., Okada, H., Tokunaga, T., Kawabata, S.-I., Kimura, M., Shimohigashi, Y., 2007. Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma. *J. Biochem. (Tokyo)* 142, 517–524. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm158>
- Matthews, J.B., Twomey, K., Zacharewski, T.R., 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149–157. <https://doi.org/10.1021/tx0001833>
- Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 37–43.
- McGee, S.R., Narayan, P., 2013. Precocious Puberty and Leydig Cell Hyperplasia in Male Mice With a Gain of Function Mutation in the LH Receptor Gene. *Endocrinology* 154, 3900–3913. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2179>
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., O'Malley, B.W., 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20, 321–344. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0366>
- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., de Kretser, D.M., Pratis, K., Robertson, D.M., 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 149–179. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.149>
- Meachem, S.J., McLachlan, R.I., de Kretser, D.M., Robertson, D.M., Wreford, N.G., 1996. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and

- spermatogenic cell numbers. *Biol. Reprod.* 54, 36–44. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.36>
- Meachem, S.J., Ruwanpura, S.M., Ziolkowski, J., Ague, J.M., Skinner, M.K., Loveland, K.L., 2005. Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *J. Endocrinol.* 186, 429–446. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06121>
- Meeker, J.D., Ehrlich, S., Toth, T.L., Wright, D.L., Calafat, A.M., Trisini, A.T., Ye, X., Hauser, R., 2010. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic☆☆☆. *Reprod. Toxicol.* 30, 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.005>
- Men, Y., Zhao, Y., Zhang, P., Zhang, H., Gao, Y., Liu, J., Feng, Y., Li, L., Shen, W., Sun, Z., Min, L., 2019. Gestational exposure to low-dose zearalenone disrupting offspring spermatogenesis might be through epigenetic modifications. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 125, 382–393. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13243>
- Meng, J., Holdcraft, R.W., Shima, J.E., Griswold, M.D., Braun, R.E., 2005. Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 16696–16700. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506084102>
- Métivier, R., Penot, G., Flouriot, G., Pakdel, F., 2001. Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol. Endocrinol.* 15, 1953–1970. <https://doi.org/10.1210/mend.15.11.0727>
- Mieusset, R., Bujan, L., Mondinat, C., Mansat, A., Pontonnier, F., Grandjean, H., 1987. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil. Steril.* 48, 1006–1011. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59600-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59600-9)
- Mishra, S., Srivastava, S., Divakar, A., Mandal, P., Dewangan, J., Chaturvedi, S., Wahajuddin, M., Kumar, S., Tripathi, A., Rath, S.K., 2020. Celecoxib reduces Deoxynivalenol induced proliferation, inflammation and protein kinase C translocation via modulating downstream targets in mouse skin. *Chem. Biol. Interact.* 326, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109128>
- Mishra, S., Tripathi, A., Chaudhari, B.P., Dwivedi, P.D., Pandey, H.P., Das, M., 2014. Deoxynivalenol induced mouse skin cell proliferation and inflammation via MAPK pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.003>
- Mok, K.-W., Mruk, D.D., Lee, W.M., Cheng, C.Y., 2011. A study to assess the assembly of a functional blood-testis barrier in developing rat testes. *Spermatogenesis* 1, 270–280. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.3.17998>
- Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.015>
- Monsees, T.K., Franz, M., Gebhardt, S., Winterstein, U., Schill, W.-B., Hayatpour, J., 2000. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia* 32, 239–246.
- Moon, Y., Pestka, J.J., 2002. Vomitoxin-Induced Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Macrophages Mediated by Activation of ERK and p38 but Not JNK Mitogen-Activated Protein Kinases. *Toxicol. Sci.* 69, 373–382.
- Moreno, R.D., Lizama, C., Urzúa, N., Vergara, S.P., Reyes, J.G., 2006. Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res.* 325, 533–540. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0186-4>

- Mosselman, S., Polman, J., Dijkema, R., 1996. ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392, 49–53. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00782-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00782-x)
- Mowa, C.N., Iwanaga, T., 2001. Expression of estrogen receptor-alpha and-beta mRNAs in the male reproductive system of the rat as revealed by in situ hybridization. *J. Mol. Endocrinol.* 26, 165–174.
- Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2015. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr. Rev.* 36, 564–591. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1101>
- Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2011. An In Vitro System to Study Sertoli Cell Blood-Testis Barrier Dynamics, in: Turksen, K. (Ed.), *Permeability Barrier*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 237–252.
- Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 25, 747–806. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0022>
- Mueller, E., Sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, R.M., Martin, K.J., Zhang, M., Fletcher, C., Singer, S., Spiegelman, B.M., 1998. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR $\gamma$ . *Mol. Cell* 1, 465–470. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80047-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80047-7)

- N -

- Nakamura, D., Yanagiba, Y., Duan, Z., Ito, Y., Okamura, A., Asaeda, N., Tagawa, Y., Li, C., Taya, K., Zhang, S.-Y., 2010. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol. Lett.* 194, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.002>
- Nakamura, N., Sloper, D.T., Del Valle, P.L., 2019. Evaluation of an in vitro mouse testis organ culture system for assessing male reproductive toxicity. *Birth Defects Res.* 111, 70–77. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1431>
- Nanjappa, M.K., Hess, R.A., Medrano, T.I., Locker, S.H., Levin, E.R., Cooke, P.S., 2016. Membrane-Localized Estrogen Receptor 1 Is Required for Normal Male Reproductive Development and Function in Mice. *Endocrinology* 157, 2909–2919. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1085>
- Nanjappa, M.K., Simon, L., Akingbemi, B.T., 2012. The Industrial Chemical Bisphenol A (BPA) Interferes with Proliferative Activity and Development of Steroidogenic Capacity in Rat Leydig Cells. *Biol. Reprod.* 86. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095349>
- Ndossi, D.G., Frizzell, C., Tremoen, N.H., Fæste, C.K., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G.S., Sørli, M., Connolly, L., Ropstad, E., 2012. An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of trichothecenes deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 toxins. *Toxicol. Lett.* 214, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.005>
- Nef, S., Parada, L.F., 1999. Cryptorchidism in mice mutant for Insl3. *Nat. Genet.* 22, 295–299. <https://doi.org/10.1038/10364>
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J.-Å., 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 81, 1535–1565. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1535>
- Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H., Yokota, H., 2010. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ. Health Perspect.* 118, 1196–1203. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901575>

N'Tumba-Byn, T., Moison, D., Lacroix, M., Lecureuil, C., Lesage, L., Prud'homme, S.M., Pozzi-Gaudin, S., Frydman, R., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2012. Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function. *PLoS ONE* 7, e51579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051579>

- 0 -

O'Donnell, L., McLachlan, R.I., Robertson, D.M., 1994. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology* 135, 2608–2614. <https://doi.org/10.1210/endo.135.6.7988449>

O'Donnell, L., McLachlan, R.I., Wreford, N.G., de Kretser, D.M., Robertson, D.M., 1996. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 55, 895–901. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.4.895>

O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I., Stanton, P.G., 2011. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis* 1, 14–35. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525>

Oliver, E., Stukenborg, J. -B., 2020. Rebuilding the human testis in vitro. *Andrology* 8, 825–834. <https://doi.org/10.1111/andr.12710>

O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., Hansen, U., 2004. Genomic Targets of Nuclear Estrogen Receptors. *Mol. Endocrinol.* 18, 1859–1875. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0044>

OMS, 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors.

Orth, J.M., 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* 203, 485–492. <https://doi.org/10.1002/ar.1092030408>

Orth, J.M., Gunsalus, G.L., Lamperti, A.A., 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122, 787–794. <https://doi.org/10.1210/endo-122-3-787>

O'Shaughnessy, P.J., 2014. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.010>

O'Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., Abel, M., 2012. Testicular Development in Mice Lacking Receptors for Follicle Stimulating Hormone and Androgen. *PLoS ONE* 7, e35136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035136>

O'Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K., Abel, M.H., 2010. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction* 139, 177–184. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0377>

Otto, C., Fuchs, I., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Andreasen, P., Schwarz, G., Altmann, H., Klewer, M., Schoor, M., Vonk, R., Fritzemeier, K.-H., 2009. GPR30 Does Not Mediate Estrogenic Responses in Reproductive Organs in Mice. *Biol. Reprod.* 80, 34–41. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071175>

- P -

- Palumbo, R., Crisci, A., Venâncio, A., Cortiñas Abrahantes, J., Dorne, J.-L., Battilani, P., Toscano, P., 2020. Occurrence and Co-Occurrence of Mycotoxins in Cereal-Based Feed and Food. *Microorganisms* 8, 74. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010074>
- Pan, P., Ma, F., Wu, K., Yu, Y., Li, Y., Li, Z., Chen, X., Huang, T., Wang, Y., Ge, R., 2020. Maternal exposure to zearalenone in masculinization window affects the fetal Leydig cell development in rat male fetus. *Environ. Pollut.* 263, 114357. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114357>
- Pan, X., Whitten, D.A., Wu, M., Chan, C., Wilkerson, C.G., Pestka, J.J., 2013. Global protein phosphorylation dynamics during deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response in the macrophage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.007>
- Pang, J., Zhou, Q., Sun, X., Li, L., Zhou, B., Zeng, F., Zhao, Y., Shen, W., Sun, Z., 2017. Effect of low-dose zearalenone exposure on reproductive capacity of male mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 333, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.08.011>
- Parvinen, M., Söder, O., Mali, P., Fröysa, B., Ritsén, E.M., 1991. In vitro stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule segments by interleukin-1 alpha. *Endocrinology* 129, 1614–1620. <https://doi.org/10.1210/endo-129-3-1614>
- Pastore, M.B., Landeros, R.V., Chen, D., Magness, R.R., 2019. Structural analysis of estrogen receptors: interaction between estrogen receptors and cav-1 within the caveolae<sup>†</sup>. *Biol. Reprod.* 100, 495–504. <https://doi.org/10.1093/biolre/iory188>
- Patel, S., Homaei, A., Raju, A.B., Meher, B.R., 2018. Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it. *Biomed. Pharmacother.* 102, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.078>
- Paulose, T., Speroni, L., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2015. Estrogens in the wrong place at the wrong time: Fetal BPA exposure and mammary cancer. *Reprod. Toxicol.* 54, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.09.012>
- Pawlicki, P., Duliban, M., Tuz, R., Ptak, A., Milon, A., Gorowska-Wojtowicz, E., Tworzydło, W., Płachno, B.J., Bilinska, B., Knapczyk-Stwora, K., Kotula-Balak, M., 2019. Do G-protein coupled estrogen receptor and bisphenol A analogs influence on Leydig cell epigenetic regulation in immature boar testis ex vivo? *Anim. Reprod. Sci.* 207, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.006>
- Pedram, A., Razandi, M., Lewis, M., Hammes, S., Levin, E.R., 2014. Membrane-Localized Estrogen Receptor  $\alpha$  Is Required for Normal Organ Development and Function. *Dev. Cell* 29, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.016>
- Pelletier, G., Labrie, C., Labrie, F., 2000. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.* 165, 359–370.
- Peng, C.-Y., Tsai, E.-M., Kao, T.-H., Lai, T.-C., Liang, S.-S., Chiu, C.-C., Wang, T.-N., 2019. Canned food intake and urinary bisphenol a concentrations: a randomized crossover intervention study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 27999–28009. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05534-y>
- Perera, L., Li, Y., Coons, L.A., Houtman, R., van Beuningen, R., Goodwin, B., Auerbach, S.S., Teng, C.T., 2017. Binding of bisphenol A, bisphenol AF, and bisphenol S on the androgen receptor: Coregulator recruitment and stimulation of potential interaction sites. *Toxicol. In Vitro* 44, 287–302. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.020>

- Peretz, J., Vrooman, L., Ricke, W.A., Hunt, P.A., Ehrlich, S., Hauser, R., Padmanabhan, V., Taylor, H.S., Swan, S.H., VandeVoort, C.A., Flaws, J.A., 2014. Bisphenol A and Reproductive Health: Update of Experimental and Human Evidence, 2007–2013. *Environ. Health Perspect.* 122, 775–786. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307728>
- Perez-Lobato, R., Mustieles, V., Calvente, I., Jimenez-Diaz, I., Ramos, R., Caballero-Casero, N., López-Jiménez, F.J., Rubio, S., Olea, N., Fernandez, M.F., 2016. Exposure to bisphenol A and behavior in school-age children. *NeuroToxicology* 53, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.001>
- Perrard, M.-H., Vigier, M., Damestoy, A., Chapat, C., Silandre, D., Rudkin, B.B., Durand, P., 2007.  $\beta$ -nerve growth factor participates in an auto/paracrine pathway of regulation of the meiotic differentiation of rat spermatocytes. *J. Cell. Physiol.* 210, 51–62. <https://doi.org/10.1002/jcp.20805>
- Pestka, J.J., 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 84, 663–679. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0579-8>
- Picut, C.A., Remick, A.K., de Rijk, E.P.C.T., Simons, M.L., Stump, D.G., Parker, G.A., 2015. Postnatal Development of the Testis in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Toxicol. Pathol.* 43, 326–342. <https://doi.org/10.1177/0192623314547279>
- Pillay, D., Chuturgoon, A.A., Nevines, E., Manickum, T., Deppe, W., Dutton, M.F., 2002. The quantitative analysis of zearalenone and its derivatives in plasma of patients with breast and cervical cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 946–951. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.166>
- Pilutin, A., Misiakiewicz-Has, K., Kolasa, A., Baranowska-Bosiacka, I., Marchlewicz, M., Wiszniewska, B., 2014. The immunoexpression of androgen receptor, estrogen receptors alpha and beta, vanilloid type 1 receptor and cytochrome p450 aromatase in rats testis chronically treated with letrozole, an aromatase inhibitor. *Folia Histochem. Cytobiol.* 52, 206–217. <https://doi.org/10.5603/FHC.2014.0024>
- Pitt, J., 1996. What are mycotoxins? *Aust Mycotoxin Newsl* 7, 1.
- Pöllänen, P., Söder, O., Parvinen, M., 1989. Interleukin-1 alpha stimulation of spermatogonial proliferation in vivo. *Reprod. Fertil. Dev.* 1, 85–87. <https://doi.org/10.1071/rd9890085>
- Print, C., Loveland, K.L., 2000. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 22, 423–430. [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)

- Q -

- Qi, S., Fu, W., Wang, C., Liu, C., Quan, C., Kourouma, A., Yan, M., Yu, T., Duan, P., Yang, K., 2014. BPA-induced apoptosis of rat Sertoli cells through Fas/FasL and JNKs/p38 MAPK pathways. *Reprod. Toxicol.* 50, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.10.013>
- Qin, C., Burghardt, R., Smith, R., Wormke, M., Stewart, J., Safe, S., 2003. Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Agonists Induce Proteasome-dependent Degradation of Cyclin D1 and Estrogen Receptor alpha in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 63, 958–964.

- R -

- Rahman, M.S., Kwon, W.-S., Lee, J.-S., Yoon, S.-J., Ryu, B.-Y., Pang, M.-G., 2015. Bisphenol-A Affects Male Fertility via Fertility-related Proteins in Spermatozoa. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep09169>
- Rajasärkkä, J., Pernica, M., Kuta, J., Lašňák, J., Šimek, Z., Bláha, L., 2016. Drinking water contaminants from epoxy resin-coated pipes: A field study. *Water Res.* 103, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.027>
- Ramaswamy, S., Weinbauer, G.F., 2014. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/testosterone. *Spermatogenesis* 4, e996025. <https://doi.org/10.1080/21565562.2014.996025>
- Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., Levin, E.R., 2002. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocrinol.* 16, 100–115. <https://doi.org/10.1210/mend.16.1.0757>
- Read, L.D., Snider, C.E., Miller, J.S., Greene, G.L., Katzeneilenbogen, B.S., 1988. Ligand-modulated regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in human breast cancer cell lines. *Mol. Endocrinol.* 2, 263–271.
- Ren, Z., Deng, H., Deng, Y., Liang, Z., Deng, J., Zuo, Z., Hu, Y., Shen, L., Yu, S., Cao, S., 2017. Combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative injury and apoptosis in porcine splenic lymphocytes in vitro. *Exp. Toxicol. Pathol.* 69, 612–617. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.05.008>
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2005. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science* 307, 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>
- Richardson, T.E., Yu, A.E., Wen, Y., Yang, S.-H., Simpkins, J.W., 2012. Estrogen Prevents Oxidative Damage to the Mitochondria in Friedreich's Ataxia Skin Fibroblasts. *PLoS ONE* 7, e34600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034600>
- Richburg, J.H., Redenbach, D.M., Boekelheide, K., 1994. Seminiferous Tubule Fluid Secretion Is a Sertoli Cell Microtubule-Dependent Process Inhibited by 2,5-Hexanedione Exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128, 302–309. <https://doi.org/10.1006/taap.1994.1210>
- Rim, K.-T., 2017. Reproductive Toxic Chemicals at Work and Efforts to Protect Workers' Health: A Literature Review. *Saf. Health Work* 8, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2017.04.003>
- Riu, A., Grimaldi, M., Le Maire, A., Bey, G., Phillips, K., Boulahtouf, A., Perdu, E., Zalko, D., Bourguet, W., Balaguer, P., 2011a. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 119, 1227–1232. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003328>
- Riu, A., Le Maire, A., Grimaldi, M., Audebert, M., Hillenweck, A., Bourget, W., Balaguer, P., Zalko, D., 2011b. Characterization of novel ligands of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and PPAR $\gamma$ : the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol. Sci.* 122, 372–382. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr132>
- Robertson, K.M., O'Donnell, L., Jones, M.E., Meachem, S.J., Boon, W.C., Fisher, C.R., Graves, K.H., McLachlan, R.I., Simpson, E.R., 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 7986–7991. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7986>



- Robertson, K.M., O'Donnell, L., Simpson, E.R., Jones, M.E., 2002. The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinology* 143, 2913–2921. <https://doi.org/10.1210/endo.143.8.8957>
- Robertson, K.M., Simpson, E.R., Lacham-Kaplan, O., Jones, M.E., 2001. Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. *J. Androl.* 22, 825–830.
- Rodprasert, W., Virtanen, H.E., Mäkelä, J.-A., Toppari, J., 2020. Hypogonadism and Cryptorchidism. *Front. Endocrinol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00906>
- Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I., Vassalli, P., 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.* 16, 2262–2270. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2262>
- Roelofs, M.J.E., Berg, M. van den, Bovee, T.F.H., Piersma, A.H., Duursen, M.B.M. va., 2015. Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. *Toxicology* 329, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.01.003>
- Rondanino, C., Maouche, A., Dumont, L., Oblette, A., Rives, N., 2017. Establishment, maintenance and functional integrity of the blood–testis barrier in organotypic cultures of fresh and frozen/thawed prepubertal mouse testes. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 23, 304–320. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax017>
- Rotimi, O.A., Olawole, T.D., De Campos, O.C., Adelani, I.B., Rotimi, S.O., 2021. Bisphenol A in Africa: A review of environmental and biological levels. *Sci. Total Environ.* 764, 142854. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142854>
- Rouiller-Fabre, V., Levacher, C., Pairault, C., Racine, C., Moreau, E., Olasso, R., Livera, G., Migrenne, S., Delbes, G., Habert, R., 2003. Development of the foetal and neonatal testis. *Andrologia* 35, 79–83. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2003.00540.x>
- Royer, C., Lucas, T.F.G., Lazari, M.F.M., Porto, C.S., 2012. 17Beta-Estradiol Signaling and Regulation of Proliferation and Apoptosis of Rat Sertoli Cells1. *Biol. Reprod.* 86. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096891>
- Rubin, B.S., Schaeberle, C.M., Soto, A.M., 2019. The Case for BPA as an Obesogen: Contributors to the Controversy. *Front. Endocrinol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00030>
- Russell, L., 1977. Movement of Spermatocytes from the Basal to the Adluminal Compartment of the Rat Testis. *Am. J. Anat.* 148, 313–328. <https://doi.org/10.1002/aja.1001480303>
- Russell, L., Corbin, T., Borg, K., Renato de Franca, L., Grasso, P., Bartke, A., 1993. Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone Is Capable of Exerting a Biological Effect in the Adult Hypophysectomized Rat by Reducing the Numbers of Degeneratin Germ Cells. *Endocrinology* 133, 2062–2070. <https://doi.org/10.1210/endo.133.5.8404654>
- Russell, L.D., Chiarini-Garcia, H., Korsmeyer, S.J., Knudson, C.M., 2002. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 66, 950–958. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.950>
- Russo, G., Barbato, F., Mita, D.G., Grumetto, L., 2019. Occurrence of Bisphenol A and its analogues in some foodstuff marketed in Europe. *Food Chem. Toxicol.* 131, 110575. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110575>
- Ruwanpura, S.M., McLachlan, R.I., Stanton, P.G., Loveland, K.L., Meachem, S.J., 2008. Pathways involved in testicular germ cell apoptosis in immature rats after FSH suppression. *J. Endocrinol.* 197, 35–43. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0637>

- S -

- Sáenz de Rodríguez, C.A., 1984. Environmental hormone contamination in Puerto Rico. *N. Engl. J. Med.* 310, 1741–1742. <https://doi.org/10.1056/NEJM198406283102612>
- Sáenz de Rodríguez, C.A., Bongiovanni, A.M., Conde de Borrego, L., 1985. An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. *J. Pediatr.* 107, 393–396. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(85\)80513-8](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(85)80513-8)
- Salian, S., Doshi, T., Vanage, G., 2009. Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A. *Life Sci.* 85, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.04.005>
- Sanchis, Y., Coscollà, C., Corpas-Burgos, F., Vento, M., Gormaz, M., Yusà, V., 2020. Biomonitoring of bisphenols A, F, S and parabens in urine of breastfeeding mothers: Exposure and risk assessment. *Environ. Res.* 185. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109481>
- Santoro, A., Chianese, R., Troisi, J., Richards, S., Nori, S.L., Fasano, S., Guida, M., Plunck, E., Viggiano, A., Pierantoni, R., Meccariello, R., 2019. Neuro-toxic and reproductive effects of BPA. *Curr. Neuropharmacol.* 17. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190726112101>
- Sarigiannis, D.A., Tratnik, J.S., Mazej, D., Kosjek, T., Heat, E., Horvat, M., Anesti, O., Karakitsios, S.P., 2019. Risk characterization of bisphenol-A in the Slovenian population starting from human biomonitoring data. *Environ. Res.* 170, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.056>
- Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F., DeAngelo, D., Partridge, J., Holden, S., Chen, L., Singer, S., Fletcher, C., Spiegelman, B., 1998. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat. Med.* 4, 1046–1052. <https://doi.org/10.1038/2030>
- Saunders, P.T., Fisher, J.S., Sharpe, R.M., Millar, M.R., 1998. Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J. Endocrinol.* 156, R13-17.
- Savard, C., Nogues, P., Boyer, A., Chorfi, Y., 2016. Prevention of deoxynivalenol- and zearalenone-associated oxidative stress does not restore MA-10 Leydig cell functions. *Toxicology* 341–343, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.01.003>
- Schatzmayr, G., Streit, E., 2013. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin J.* 6, 213–222. <https://doi.org/10.3920/WMJ2013.1572>
- Seachrist, D.D., Bonk, K.W., Ho, S.-M., Prins, G.S., Soto, A.M., Keri, R.A., 2016. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* 59, 167–182. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.09.006>
- Serra, H., Beausoleil, C., Habert, R., Minier, C., Picard-Hagen, N., Michel, C., 2019. Evidence for Bisphenol B Endocrine Properties: Scientific and Regulatory Perspectives. *Environ. Health Perspect.* 127, 106001. <https://doi.org/10.1289/EHP5200>
- Sertoli, E., 1865. Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. *Morgagni* 7, 31–40.
- Shafei, A., Ramzy, M.M., Hegazy, A.I., Husseny, A.K., EL-hadary, U.G., Taha, M.M., Mosa, A.A., 2018. The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. *Gene* 647, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.016>

- Sharpe, R.M., 2006. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 91–110. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.005>
- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet* 341, 1392–1395. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90953-e](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90953-e)
- Sheikh, I.A., Yasir, M., Abu-Elmagd, M., Dar, T.A., Abuzenadah, A.M., Damanhour, G.A., Al-Qahtani, M., Beg, M.A., 2016. Human sex hormone-binding globulin as a potential target of alternate plasticizers: an in silico study. *BMC Struct. Biol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12900-016-0067-3>
- Shetty, G., Krishnamurthy, H., Krishnamurthy, H.N., Bhatnagar, S., Moudgal, R.N., 1998. Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*). *Steroids* 63, 414–420. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(98\)00042-7](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(98)00042-7)
- Shetty, G., Krishnamurthy, H., Krishnamurthy, H.N., Bhatnagar, S., Moudgal, R.N., 1997. Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61, 157–166.
- Shi, M., Sekulovski, N., MacLean, J.A., Hayashi, K., 2018. Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Male Reproductive Functions in Mice. *Toxicol. Sci.* 163, 620–631. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy061>
- Shifrin, V.I., Anderson, P., 1999. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 13985–13992.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Scrimo, P.J., Merchenthaler, I., 1998. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 63, 498–504.
- Sidorkiewicz, I., Czerniecki, J., Jarzabek, K., Zbucka-Krętowska, M., Wołczyński, S., 2018. Cellular, transcriptomic and methylome effects of individual and combined exposure to BPA, BPF, BPS on mouse spermatocyte GC-2 cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 359, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.006>
- Siersbaek, R., Kumar, S., Carroll, J.S., 2018. Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor  $\alpha$  function in breast cancer. *Genes Dev.* 32, 1141–1154. <https://doi.org/10.1101/gad.316646.118>
- Silandre, D., Delalande, C., Durand, P., Carreau, S., 2007. Three promoters PII, PI.f, and PI.tr direct the expression of aromatase (cyp19) gene in male rat germ cells. *J. Mol. Endocrinol.* 39, 169–181. <https://doi.org/10.1677/JME-07-0046>
- Silber, S.J., 2010. Sperm retrieval for azoospermia and intracytoplasmic sperm injection success rates – A personal overview. *Hum. Fertil.* 13, 247–256. <https://doi.org/10.3109/14647273.2010.534529>
- Simpson, E., 2003. Sources of estrogen and their importance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, 225–230. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00360-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00360-1)
- Singh, J., O'Neill, C., Handelsman, D.J., 1995. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice 136, 5311–5321. <https://doi.org/10.1210/endo.136.12.7588276>
- Sinkevicius, K.W., Burdette, J.E., Woloszyn, K., Hewitt, S.C., Hamilton, K., Sugg, S.L., Temple, K.A., Wondisford, F.E., Korach, K.S., Woodruff, T.K., Greene, G.L., 2008. An Estrogen Receptor- $\alpha$

- Knock-In Mutation Provides Evidence of Ligand-Independent Signaling and Allows Modulation of Ligand-Induced Pathways in Vivo. *Endocrinology* 149, 2970–2979. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1526>
- Sinkevicius, K.W., Laine, M., Lotan, T.L., Woloszyn, K., Richburg, J.H., Greene, G.L., 2009. Estrogen-Dependent and -Independent Estrogen Receptor- $\alpha$  Signaling Separately Regulate Male Fertility. *Endocrinology* 150, 2898–2905. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1016>
- Sirianni, R., Chimento, A., Ruggiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Andò, S., Maggiolini, M., Pezzi, V., 2008. The Novel Estrogen Receptor, G Protein-Coupled Receptor 30, Mediates the Proliferative Effects Induced by 17 $\beta$ -Estradiol on Mouse Spermatogonial GC-1 Cell Line. *Endocrinology* 149, 5043–5051. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1593>
- Skafar, D.F., Zhao, C., 2008. The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine* 33, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9054-1>
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Swan, S.H., Sapra, K.J., Ziebe, S., Priskorn, L., Juul, A., 2016. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol. Rev.* 96, 55–97. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2015>
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* 16, 972–978. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.972>
- Skinner, M.K., 1991. Cell-Cell Interaction in the Testis. *Endocr. Rev.* 12, 45–77. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-1-45>
- Smith, B.E., Braun, R.E., 2012. Germ Cell Migration Across Sertoli Cell Tight Junctions. *Science* 338, 798–802. <https://doi.org/10.1126/science.1219969>
- Söder, O., Bang, P., Wahab, A., Parvinen, M., 1992. Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis. *Endocrinology* 131, 2344–2350. <https://doi.org/10.1210/endo.131.5.1425434>
- Song, J.-L., Zhang, G.-L., 2021. Deoxynivalenol and Zearalenone: Different Mycotoxins with Different Toxic Effects in the Sertoli Cells of *Equus asinus*. *Cells* 10, 1898. <https://doi.org/10.3390/cells10081898>
- Song, R.X., Barnes, C.J., Zhang, Z., Bao, Y., Kumar, R., Santen, R.J., 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor  $\alpha$  to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 2076–2081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308334100>
- Sprando, R.L., Collins, T.F.X., Black, T.N., Olejnik, N., Rorie, J.I., Eppley, R.M., Ruggles, D.I., 2005. Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. *Food Chem. Toxicol.* 43, 623–635. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.017>
- Sprando, R.L., Pestka, J., Collins, T.F.X., Rorie, J., O'donnell, M., Hinton, D., Chirtel, S., 1999. The Effect of Vomitoxin (Deoxynivalenol) on Testicular Morphology, Testicular Spermatid Counts and Epididymal Sperm Counts in IL-6KO [B6129-IL6< tmlKopf>(IL-6 gene deficient)] and WT [B6129F2 (wild type to B6129-IL6 with an intact IL-6 gene)] mice. *Food Chem. Toxicol.* 37, 1073–1079.
- Srivastava, S., Gupta, P., 2018. Alteration in apoptotic rate of testicular cells and sperms following administration of Bisphenol A (BPA) in Wistar albino rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 21635–21643. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2229-2>

- Steinberger, E., Duckett, G.E., 1965. Effect of estrogen or testosterone on initiation and maintenance of spermatogenesis in the rat. *Endocrinology* 76, 1184–1189.
- Sullivan, R., Mieuisset, R., 2016. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum. Reprod. Update* 22, 574–587. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>
- Susiarjo, M., Sasson, I., Mesaros, C., Bartolomei, M.S., 2013. Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLoS Genet.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003401>
- Suzuki, T., Hayashi, S., Miki, Y., Nakamura, Y., Moriya, T., Sugawara, A., Ishida, T., Ohuchi, N., Sasano, H., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocr. Relat. Cancer* 233–250. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01075>
- Svechnikov, K., Izzo, G., Landreh, L., Weisser, J., Söder, O., 2010. Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2010/684504>

## - T -

- Tait, S., Carli, F., Busani, L., Ciociaro, D., Della Latta, V., Deodati, A., Fabbrizi, E., Pala, A.P., Maranghi, F., Tassinari, R., Toffol, G., Cianfarani, S., Gastaldelli, A., La Rocca, C., LIFE PERSUADED Project Group, 2021. Italian Children Exposure to Bisphenol A: Biomonitoring Data from the LIFE PERSUADED Project. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 18, 11846. <https://doi.org/10.3390/ijerph182211846>
- Tassis, P.D., Tsakmakidis, I.A., Nagl, V., Reisinger, N., Tzika, E., Gruber-Dorninger, C., Michos, I., Mittas, N., Basioura, A., Schatzmayr, D., 2020. Individual and Combined In Vitro Effects of Deoxynivalenol and Zearalenone on Boar Semen. *Toxins* 12, 495. <https://doi.org/10.3390/toxins12080495>
- Taylor, S.E., Martin-Hirsch, P.L., Martin, F.L., 2010. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer Lett.* 288, 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.06.017>
- Teeguarden, J.G., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Doerge, D.R., 2016. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women. *Food Chem. Toxicol.* 92, 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.023>
- Teerds, K., Rijntjes, E., 2007. Dynamics of Leydig Cell Regeneration After EDS, in: Payne, A.H., Hardy, M.P. (Eds.), *The Leydig Cell in Health and Disease*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 91–116.
- Teerds, K.J., Huhtaniemi, I.T., 2015. Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Hum. Reprod. Update* 21, 310–328. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv008>
- Thapa, A., Horgan, K.A., White, B., Walls, D., 2021. Deoxynivalenol and Zearalenone—Synergistic or Antagonistic Agri-Food Chain Co-Contaminants? *Toxins* 13, 561. <https://doi.org/10.3390/toxins13080561>
- Thayer, K.A., Doerge, D.R., Hunt, D., Schurman, S.H., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Garantziotis, S., Kissling, G.E., Easterling, M.R., Bucher, J.R., Birnbaum, L.S., 2015. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ. Int.* 83, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.008>
- Thomas, P., Dong, J., 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.017>

- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146, 624–632. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>
- Thompson, E.W., Blackshaw, A.W., Raychoudhury, S.S., 1995. Secreted Products and Extracellular Matrix from Testicular Peritubular Myoid Cells Influence Androgen-Binding Protein Secretion by Sertoli Cells in Culture. *J. Androl.* 16, 28–35.
- Thuillier, R., Manku, G., Wang, Y., Culty, M., 2009. Changes in MAPK pathway in neonatal and adult testis following fetal estrogen exposure and effects on rat testicular cells. *Microsc. Res. Tech.* 72, 773–786. <https://doi.org/10.1002/jemt.20756>
- Thuillier, R., Mazer, M., Manku, G., Boisvert, A., Wang, Y., Culty, M., 2010. Interdependence of Platelet-Derived Growth Factor and Estrogen-Signaling Pathways in Inducing Neonatal Rat Testicular Gonocytes Proliferation. *Biol. Reprod.* 82, 825–836. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081729>
- Tiwari, D., Vanage, G., 2013. Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. *Reprod. Toxicol.* 40, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.05.013>
- Toporova, L., Balaguer, P., 2020. Nuclear receptors are the major targets of endocrine disrupting chemicals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 502, 110665. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110665>
- Toyama, Y., Yuasa, S., 2004. Effects of neonatal administration of 17 $\beta$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis. *Reprod. Toxicol.* 19, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.08.003>
- Tsakmakidis, I.A., Lymberopoulos, A.G., Khalifa, T.A.A., Boscós, C.M., Saratsi, A., Alexopoulos, C., 2008. Evaluation of zearalenone and alpha-zearalenol toxicity on boar sperm DNA integrity. *J. Appl. Toxicol.* 28, 681–688. <https://doi.org/10.1002/jat.1322>
- Tsakmakidis, I., Lymberopoulos, A., Alexopoulos, C., Boscós, C., Kyriakis, S., 2006. In vitro Effect of Zearalenone and alpha-Zearalenol on Boar Sperm Characteristics and Acrosome Reaction. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 394–401. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00679.x>
- Tvrđá, E., Greifova, Ďuračka, M., Ondruska, L., Halenár, M., Kolesárová, A., 2021. Comparative analysis of the detrimental in vitro effects of three fusariotoxins on the selected structural and functional characteristics of rabbit spermatozoa. *Drug Chem. Toxicol.* 11. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1962690>

## - U -

- Ueno, Y., 1978. Mode of action of trichothecenes, in: *Mycotoxins in Foodstuffs–3*. Elsevier, pp. 1737–1745.
- Ueno, Y., Tashiro, F., Kobayashi, T., 1983. Species differences in zearalenone-reductase activity. *Food Chem. Toxicol.* 21, 167–173. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(83\)90232-6](https://doi.org/10.1016/0278-6915(83)90232-6)
- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Razak, S., Rauf, N., Khan, M., Mahboob, S., 2019. Prenatal BPA and its analogs BPB, BPF, and BPS exposure and reproductive axis function in the male offspring of Sprague Dawley rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 38, 1344–1365. <https://doi.org/10.1177/0960327119862335>
- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H., Siddiqui, M.F., Butt, M.A., 2018a. Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere* 209, 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.089>

- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Turi, N., Ullah, W., Siddiqui, M.F., Zakria, M., Lodhi, K.Z., Khan, M.M., 2018b. Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A and its analogue bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: A focus on the possible hormonal mode of action. *Food Chem. Toxicol.* 121, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.024>
- Upmeier, A., Degen, G.H., Diel, P., Michna, H., Bolt, H.M., 2000. Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Arch. Toxicol.* 74, 431–436.
- Urriola-Muñoz, P., Lagos-Cabré, R., Moreno, R.D., 2014. A Mechanism of Male Germ Cell Apoptosis Induced by Bisphenol-A and Nonylphenol Involving ADAM17 and p38 MAPK Activation. *PLoS ONE* 9, e113793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113793>
- Urry, R.L., Carrell, D.T., Starr, N.T., Snow, B.W., Middleton, R.G., 1994. The incidence of antisperm antibodies in infertility patients with a history of cryptorchidism. *J. Urol.* 151, 381–383. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)34954-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)34954-6)

- V -

- van der Fels-Klerx, H., Focker, M., De Rijk, T., Liu, C., 2021. Mycotoxins in wheat cultivated in the Netherlands: results from eight years of field surveys. *Mycotoxin Res.* 37, 183–192.
- van Dissel-Emiliani, F.M., Grootenhuis, A.J., de Jong, F.H., de Rooij, D.G., 1989. Inhibin reduces spermatogonial numbers in testes of adult mice and Chinese hamsters. *Endocrinology* 125, 1899–1903. <https://doi.org/10.1210/endo-125-4-1898>
- Van Pelt, A.M., De Rooij, D.G., Van Der Burg, B., Van Der Saag, P.T., Gustafsson, J.-Å., Kuiper, G.G., 1999. Ontogeny of estrogen receptor- $\beta$  expression in rat testis. *Endocrinology* 140, 478–483.
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F.J., Schoenfelder, G., 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 118, 1055–1070. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers, J.P., 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 24, 139–177. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>
- Vaucher, L., Funaro, M.G., Mehta, A., Mielnik, A., Bolyakov, A., Prossnitz, E.R., Schlegel, P.N., Paduch, D.A., 2014. Activation of GPER-1 Estradiol Receptor Downregulates Production of Testosterone in Isolated Rat Leydig Cells and Adult Human Testis. *PLoS ONE* 9, e92425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092425>
- Verhoeven, G., Willems, A., Denolet, E., Swinnen, J.V., De Gendt, K., 2010. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 1537–1556. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0117>
- Verma, R., Krishna, A., 2017. Effect of Letrozole, a selective aromatase inhibitor, on testicular activities in adult mice: Both in vivo and in vitro study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 241, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.02.028>

- Viguier-Martinez, M.C., Hochereau de Reviere, M.T., Barenton, B., Perreau, C., 1983. Effect of a non-steroidal antiandrogen, flutamide, on the hypothalamo-pituitary axis, genital tract and testis in growing male rats: endocrinological and histological data. *Acta Endocrinol Copenh* 102. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1020299>
- Viñas, R., Jeng, Y.-J., Watson, C.S., 2012. Non-Genomic Effects of Xenoestrogen Mixtures. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 2694–2714. <https://doi.org/10.3390/ijerph9082694>
- Vitku, J., Sosvorova, L., Chlupacova, T., Hampl, R., Hill, M., Sobotka, V., Heracek, J., Bicikova, M., Starka, L., 2015. Differences in bisphenol A and estrogen levels in the plasma and seminal plasma of men with different degrees of infertility. *Physiol. Res.* 64, S303-311. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933090>
- vom Saal, F.S., Timms, B.G., Montano, M.M., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Dhar, M.D., Ganjam, V.K., Parmigiani, S., Welshons, W.V., 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2056–2061. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.2056>
- Vornberger, W., Prins, G., Musto, N.A., Suarez-Quian, C.A., 1994. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134, 2307–2316.
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J., 2014. The many faces of estrogen signaling. *Biochem. Medica* 24, 329–342. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.035>

- W -

- Wahab-Wahlgren, A., 2003. EGF stimulates rat spermatogonial DNA synthesis in seminiferous tubule segments in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201, 39–46. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00002-9)
- Walczak-Jędrzejowska, R., Marchlewska, K., Oszukowska, E., Filipiak, E., Słowikowska-Hilczer, J., Kula, K., 2013. Estradiol and testosterone inhibit rat seminiferous tubule development in a hormone-specific way. *Reprod. Biol.* 13, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.07.005>
- Walczak-Jędrzejowska, R., Słowikowska-Hilczer, J., Marchlewsk, K., Oszukowska, E., Kula, K., 2007. During seminiferous tubule maturation testosterone and synergistic action of FSH with estradiol support germ cell survival while estradiol alone has pro-apoptotic effect. *Folia Histochem. Cytobiol.* 45, 59–64.
- Wang, B., Zheng, W., Feng, N., Wang, T., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Liu, Z., Bian, J., 2018. The Effects of Autophagy and PI3K/AKT/m-TOR Signaling Pathway on the Cell-Cycle Arrest of Rats Primary Sertoli Cells Induced by Zearalenone. *Toxins* 10, 398. <https://doi.org/10.3390/toxins10100398>
- Wang, C., Fu, W., Quan, C., Yan, M., Liu, C., Qi, S., Yang, K., 2015. The role of Pten/Akt signaling pathway involved in BPA-induced apoptosis of rat sertoli cells. *Environ. Toxicol.* 30, 793–802. <https://doi.org/10.1002/tox.21958>
- Wang, H., Ding, Z., Shi, Q.-M., Ge, X., Wang, H.-X., Li, M.-X., Chen, G., Wang, Q., Ju, Q., Zhang, J.-P., Zhang, M.-R., Xu, L.-C., 2017. Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve androgen receptor signaling pathway. *Toxicology* 387, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.007>



- Wang, X., Ha, D., Yoshitake, R., Chan, Y.S., Sadava, D., Chen, S., 2021. Exploring the Biological Activity and Mechanism of Xenoestrogens and Phytoestrogens in Cancers: Emerging Methods and Concepts. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8798. <https://doi.org/10.3390/ijms22168798>
- Wang, Y., Zheng, W., Bian, X., Yuan, Y., Gu, J., Liu, X., Liu, Z., Bian, J., 2014. Zearalenone induces apoptosis and cytoprotective autophagy in primary Leydig cells. *Toxicol. Lett.* 226, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.003>
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., Deuel, T.F., 2005. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1023–1027. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.226>
- Warth, B., Sulyok, M., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Krska, R., 2013. New insights into the human metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicol. Lett.* 220, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.04.012>
- Weikum, E.R., Liu, X., Ortlund, E.A., 2018. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci.* 27, 1876–1892. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>
- Welsh, M., Saunders, P.T.K., Atanassova, N., Sharpe, R.M., Smith, L.B., 2009. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* 23, 4218–4230. <https://doi.org/10.1096/fj.09-138347>
- Willems, A., Batlouni, S.R., Esnal, A., Swinnen, J.V., Saunders, P.T.K., Sharpe, R.M., França, L.R., De Gendt, K., Verhoeven, G., 2010. Selective Ablation of the Androgen Receptor in Mouse Sertoli Cells Affects Sertoli Cell Maturation, Barrier Formation and Cytoskeletal Development. *PLoS ONE* 5, e14168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014168>
- Williams, K., McKinnell, C., Saunders, P.T., Walker, M., Fisher, J.S., Turner, K.J., Atanassova, N., Sharpe, M., 2001. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum. Reprod. Update* 7, 236–247. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.3.236>
- Wisniewski, P., Romano, R.M., Kizys, M.M.L., Oliveira, K.C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M.I., Dias-da-Silva, M.R., Romano, M.A., 2015. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. *Toxicology* 329, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.01.002>
- Wong, E.W.P., Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2008. Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 692–708. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.006>

- X -

- Xie, M., Bu, P., Li, F., Lan, S., Wu, H., Yuan, L., Wang, Y., 2016. Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget* 7, 10606. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7218>
- Xu, J., Huang, G., Guo, T., 2016. Developmental Bisphenol A Exposure Modulates Immune-Related Diseases. *Toxics* 4, 23. <https://doi.org/10.3390/toxics4040023>
- Xu, M.-L., Hu, J., Guo, B.-P., Niu, Y.-R., Xiao, C., Xu, Y.-X., 2016. Exploration of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in zearalenone-treated rat sertoli cells: Exploration of Apoptotic Pathways in Zea-Treated Rat Sertoli Cells. *Environ. Toxicol.* 31, 1731–1739. <https://doi.org/10.1002/tox.22175>

- Y -

- Yamnik, R.L., Holz, M.K., 2010. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor  $\alpha$  serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett.* 584, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.041>
- Yang, J., Wang, J., Guo, W., Ling, A., Luo, A., Liu, D., Yang, X., Zhao, Z., 2019. Toxic Effects and Possible Mechanisms of Deoxynivalenol Exposure on Sperm and Testicular Damage in BALB/c Mice. *J. Agric. Food Chem.* 67, 2289–2295. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04783>
- Yang, J., Zhang, Y., Wang, Y., Cui, S., 2007. Toxic effects of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.10.013>
- Ye, L., Li, X., Li, L., Chen, H., Ge, R.-S., 2017. Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells. *Front. Physiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00430>
- Yeh, S., Tsai, M.-Y., Xu, Q., Mu, X.-M., Lardy, H., Huang, K.-E., Lin, H., Yeh, S.-D., Altuwaijri, S., Zhou, X., 2002. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 13498–13503. <https://doi.org/10.1073/pnas.212474399>
- Young, L.G., McGirr, L., Valli, V.E., Lumsden, J.H., Lun, A., 1983. Vomitoxin in corn fed to young pigs. *J. Anim. Sci.* 57, 655–664. <https://doi.org/10.2527/jas1983.573655x>

- Z -

- Zatecka, E., Ded, L., Elzeinova, F., Kubatova, A., Dorosh, A., Margaryan, H., Dostalova, P., Korenkova, V., Hoskova, K., Peknicova, J., 2014. Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice. *Reprod. Toxicol.* 45, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.01.003>
- Zhang, L., Li, X., Zhao, L., Zhang, L., Zhang, G., Wang, J., Wei, L., 2009. Nongenomic effect of estrogen on the MAPK signaling pathway and calcium influx in endometrial carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 106, 553–562. <https://doi.org/10.1002/jcb.22017>
- Zhao, C., Gao, H., Liu, Y., Papoutsis, Z., Jaffrey, S., Gustafsson, J.-Å., Dahlman-Wright, K., 2010. Genome-Wide Mapping of Estrogen Receptor- $\beta$ -Binding Regions Reveals Extensive Cross-Talk with Transcription Factor Activator Protein-1. *Cancer Res.* 70, 5174–5183. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4407>
- Zheng, W.-L., Pan, S., Wang, G., Wang, Y.J., Liu, Q., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X.Z., Liu, Z.P., Bian, J.C., 2016. Zearalenone impairs the male reproductive system functions via inducing structural and functional alterations of sertoli cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 42, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.013>
- Zheng, W.-L., Wang, B., Si, M., Zou, H., Song, R., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Zhu, G., Bai, J., Bian, J., Liu, Z., 2018a. Zearalenone altered the cytoskeletal structure via ER stress- autophagy- oxidative stress pathway in mouse TM4 Sertoli cells. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21567-8>
- Zheng, W.-L., Wang, B.-J., Wang, L., Shan, Y.-P., Zou, H., Song, R.-L., Wang, T., Gu, J.-H., Yuan, Y., Liu, X.-Z., Zhu, G.-Q., Bai, J.-F., Liu, Z.-P., Bian, J.-C., 2018b. ROS-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Zearalenone in Mouse Sertoli Cells via ER Stress and the ATP/AMPK Pathway. *Toxins* 10, 24. <https://doi.org/10.3390/toxins10010024>

- Zhou, S., Wang, Y., Ma, L., Chen, X., Lü, Y., Ge, F., Chen, Y., Chen, X., Lian, Q., Jin, X.-D., Ge, R.-S., 2018. Zearalenone Delays Rat Leydig Cell Regeneration. *Toxicol. Sci.* 164, 60–71. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy077>
- Zhou, X., 2010. Roles of Androgen Receptor in Male and Female Reproduction: Lessons From Global and Cell-Specific Androgen Receptor Knockout (ARKO) Mice. *J. Androl.* 31, 235–243. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.009266>
- Zhou, Y., Zhang, D., Sun, D., Cui, S., 2020. Zearalenone affects reproductive functions of male offspring via transgenerational cytotoxicity on spermatogonia in mouse. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 234, 108766. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108766>
- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.-N., Noya, D., Rao, M.S., Reddy, J.K., 1995. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7921–7925.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>
- Zirkin, B.R., Papadopoulos, V., 2018. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol. Reprod.* 99, 101–111.