



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

**par : Hussein AJJ**

**Influence des micropolluants en mélange sur la croissance de  
tumeurs testiculaires d'origine germinale**

**Le 06 novembre 2014**

**Membres du jury :**

<b>Rapporteurs :</b>	Jean-François BODART	Professeur, Université de Lille1
	Franck CHESNEL	Professeur, Université de Rennes1 Rennes
<b>Examineurs :</b>	Nicolas ETIQUE	Maître de Conférences, Université de Reims
	Stéphane FLAMENT	Professeur, Université de Lorraine
	Hélène DUMOND	Maître de conférences, Université de Lorraine
<b>Membre invité :</b>	Denyse BAGREL	Professeur, Université de Lorraine

---

**UMR7039 CNRS-Université de Lorraine, Centre de Recherche en Automatique de  
Nancy, Faculté des sciences et Technologie, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy.**

## Remerciements

Ce travail a été effectué à l'Université de Lorraine au sein du laboratoire CRAN UMR7039 CNRS-UL, grâce à un partenariat avec l'ANSES (APR-EST08-09).

Avant d'exposer mes travaux, je voudrais tout d'abord remercier le gouvernement Syrien de m'avoir accordé une bourse ainsi que l'Université de Tichrine qui ont permis cette réalisation.

Je tiens également à remercier Monsieur le professeur Stéphane Flament pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. Je lui suis reconnaissant de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence et de sa rigueur scientifique. Il a dirigé mes travaux de recherche attentivement malgré ses nombreuses charges. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je suis très honoré de l'avoir eu pour encadrant. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Madame Hélène Dumond, sans vos conseils, vos corrections et vos directives, la route de la thèse aurait été plus dure. Au cours de l'élaboration de cette thèse, vous avez été toujours là pour me soutenir, m'écouter, et pour m'assurer toute l'aide possible. Je suis ravi d'avoir travaillé en votre compagnie outre votre appui scientifique.

J'exprime tous mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail : Mr. Jean-François Bodart et Mr. Franck Chesnel, rapporteurs, Mr. Nicolas Etique, examinateur, ainsi que Mme Denyse Bagrel, invitée. Merci aussi à ces deux dernières personnes pour m'avoir conseillé lors du comité de suivi de thèse.

Je voudrais tout particulièrement remercier Monsieur Amand Chesnel pour toute son aide, les réponses aux questions lorsque j'avais des lacunes, et les conseils constructifs qu'il m'a donnés au cours ce travail.

Mme Martine Chillet, dont l'aide technique a été précieuse. Je te remercie pour ta sympathie et ta bonne humeur.

Je remercie également tout le personnel du laboratoire pour la bonne ambiance et les moments agréables passés ensemble durant ces années.

Je remercie particulièrement Angelina pour son soutien moral, et son aide avant et après mon arrivée au laboratoire, pour faire mes papiers administratifs, pour les sorties, pour nos discussions.

Je remercie aussi Sarra, pour les bons moments, les discussions et son aide pour ma progression en langue française.

Merci également aux personnes que j'ai eu de la chance de côtoyer durant ces années de Doctorat : Imane et Christelle. Bon courage à Clémence et Audrey.

Je remercie finalement ma famille, mes parents et mes frères et sœurs, pour leur soutien et leurs encouragements. Merci à tous mes amis pour leur support.

## Abréviations

AcR	Acide rétinoïque
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF (1, 2)	Activating function
AFP	Alpha-fœtoprotéine
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMH	Anti-Müllerian Hormone
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP1	Activator protein-1
APs	Alkylphénols
APnECs	alkylphénol ethoxycarboxylates
APnEOs	alkylphénol polyéthoxylates
AR	Androgen receptor
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AZFc	Azoospermia factor c
Bak1	Bcl2-antagonist/killer-1
BAX	Bcl2-associated X protein
Blimp1	B-Lymphocyte induced maturation protein-1
BMP	Bon morphogenic protein
BPA	Bisphénol A
BSA	Bovine serum albumin
CAFs	Cancer-associated Fibroblasts
CDK	Cyclin-dependent kinase
CGP	Cellule germinale primordiale
CG	Cellule germinale

CIS	Carcinome <i>in situ</i>
c-Kit	v-Kit hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
CREB	Cyclic AMP response element binding protein
CTGF	Connective tissue growth factor
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor-4
CYP26	Cytochrome P450 isoforme-26
Dazl	Deleted in azoospermia like
DBD	DNA binding domain
D-box	Distal box
DDT	Dichlorodiphénol-trichloréthane
DES	Diéthylstilbestrol
5 $\alpha$ -DHT	5 $\alpha$ -Dihydrotestostérone
DHT	Dihydrotestostérone
DMC1	Disrupted meiotic cDNA-1
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNMT3	DNA methyl transferase-3
E2	Œstradiol
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERE	Estrogen response element
ERK1/2	Extracellulaire Signal-Regulated Kinase
Err- $\beta$	Estrogen related receptor- $\beta$
ER	Estrogen receptor
EUNICE	European network for indicators on cancer
FGF	Fibroblast growth factor
Flu	Flutamide
FSH	Follicle-stimulating hormone
GBY	Gonadoblastoma oncogenic locus on the Y chromosome

Gcl	Germ cell-less
Gcna1	Germ cell nuclear antigen-1
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GPCR	G protein-coupled receptor
GPOR	G protein-coupled estrogen receptor
GRP94	Glucose-regulated protein-94
GWAS	Genome wide association association studies
HB-EGF	Heparan-bound epidermal growth factor
hCG	Hormone chorionic gonadotropin
HER2	Human epidermal growth factor receptor-2
HDPE	High-density polyethylene
HMG	High mobility group
Hsd17- $\beta$	17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
IGCCCG	International germ cell cancer collaborative group
IGFR	Insulin-like growth factor receptor
INSL3	Insulin-like factor-3
ITCLC	International testicular cancer linkage consortium
jpc	Jour post-coïtum
jpp	Jour post-partum
KITLG	Kit ligand
KO	Knockout
LBD	Ligand binding domain
LDH	lactate déshydrogénase
LH	Luteinizing hormone
LIF	Leukemia inhibitory factor
LOAEL	Lowest-observed-adverse-effect-level

MAF	Mitotic arrest factors
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MGF	Mast-cell growth factor
MIF	Meiosis-inhibiting factors
MIS	Meiosis-inhibiting substance
MISS	Membrane initiated steroid signaling
MPS	Meiosis-preventing substance
Mvh	Mouse vasa homolog
NAD	Nicotinamide adénine di-nucléotide
NAP-1	Nucleosome assembly protein-1
NEK2	Protéine kinase centrosomale
NGF	Nerve growth factor
NOAEL	No-observed-adverse-effect-level
NP	Nonylphénol
Oct3/4	Octamer-binding transcription factor-3/4
OP	Octylphénol
PATZ1	Protéine à doigt de zinc
P-box	Proximal domain
PCB	polychlorobiphényles
PE	Perturbateurs endocriniens
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Guanosine monophosphate (cGMP)-dependent protein kinase
PI3K	Phosphoinositol 3-kinase
PLAP	Placental alkaline phosphatase
PR	Progesterone receptor
PRL	Prolactine

PVC	Polyvinyl chloride
PRDM	PR-domain containing protein
PRMT5	Protein arginine N-methyltransferase-5
RALDH2	Retinaldehyde dehydrogenase-2
RAS	Rat sarcoma
RB	Retinoblastoma protein
RPLPO	Large ribosomal protein
SCF	Stem cell factor
SERM	Selective estrogen receptor modulator
SERD	Selective estrogen receptor down-regulator
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SMAD	Homolog of drosophila 'mothers against decapentaplegic'
Sox9	Sry-box containing gene-9
SP1	Specificity protein-1
Spo11	Sporulation protein-11
Sry	Sex-determining region of Y chromosome
Ssea1	Stage-specific embryonic antigen-1
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
Stra8	Stimulated by retinoic acid gene-8
T	Testostérone
TAM	Tamoxifène
TDG	Thymine DNA glycosylase
Tdrd1	Tudor domain containing protein-1
TDS	Testicular dysgenesis syndrome
TGCT	Testicular germ cell tumor
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$



TNAP	Tissue non-specific alkaline phosphatase
TNM	Tumor-node-metastasis
TSPY	Testis-specific protein Y
UICC	Union for international cancer control
US-EPA	Agence de protection environnementale Américaine
Wnt3	Wingless-type MMTV integration site family, member-3
Wt1	Wilm's Tumor-1

# SOMMAIRE

Avant propos	1
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	
<b>I. <u>Différenciation des cellules germinales</u></b>	3
I.1. Développement des cellules germinales	3
I.1.1. Spécification de la lignée germinale	4
I.1.1.1. Origine de la lignée germinale	4
I.1.1.2. Signalisation impliquée dans la spécification des CGPs	5
I.1.1.3. Suppression du programme somatique et maintien de la pluripotence	8
I.1.2. Migration et prolifération des cellules germinales	10
I.1.2.1. Migration des cellules germinales primordiales	10
I.1.2.2. Prolifération des CGPs	13
I.2. Différenciation des cellules germinales dans la gonade mâle	14
I.2.1. Inhibition de l'entrée en méiose	16
I.2.2. Entrée en quiescence (arrêt mitotique)	19
I.2.3. Modifications épigénétiques	20
I.3. La spermatogénèse	22
<b>II. <u>Les cellules germinales cancéreuses</u></b>	26
II.1. Epidémiologie des cancers testiculaires	26
II.2. Diagnostic	28
II.3. Classification des cancers testiculaires et traitement	29
II.3.1. Classification	29
II.3.2. Traitement	32
II.4. Origine et facteurs de risque des TGCTs	34
II.4.1. Origine fœtale des TGCTs	34

II.4.1.2. Facteurs de risques génétiques	39
II.4.1.3. Facteurs environnementaux et syndrome de dysgénésie testiculaire	43
<b>III. <u>Les hormones stéroïdes et leurs récepteurs</u></b>	<b>46</b>
III.1. Généralités sur la stéroïdogénèse	46
III.2. Les récepteurs nucléaires des œstrogènes	47
III.2.1. Le récepteur ER $\alpha$	47
III.2.1.1. Le gène	47
III.2.1.2. Structure du récepteur ER $\alpha$ (ER $\alpha$ 66)	48
III.2.1.3. Formes tronquées d'ER $\alpha$	49
III.2.2. Le récepteur ER $\beta$	49
III.2.2.1. Le gène codant ER $\beta$ et les différents variants d'ARNm	49
III.2.2.2. Structure de la protéine ER $\beta$	50
III.3. ERs et voies génomiques des œstrogènes	50
III.3.1. Mode d'action des ERs	50
III.3.2. Rôles des ERs	52
III.4. Les récepteurs membranaires des œstrogènes	53
III.4.1. Récepteur des œstrogènes couplé aux protéines G (GPER)	54
III.4.1.1. La protéine GPER	54
III.4.1.2. Signalisation dépendante de GPER	56
III.4.2. Le récepteur ER $\alpha$ 36	57
III.4.2.1. Découverte et structure	57
III.4.2.2. ER $\alpha$ 36 et cancers	59
<b>IV. <u>Perturbateurs endocriniens</u></b>	<b>63</b>
IV.1. Définition	63
IV.2. Diversité	63
IV.3. Les Alkylphénols	65
IV.4. Bisphénol A	67
IV.5. 4-nonylphénol	72
IV.6. 4-tertiary-octylphénol	76
IV.7. Mélanges de perturbateurs endocriniens	79

## **Contexte et objectifs**

1.	Modèles cellulaires	84
1.1.	Cellules TCam-2	84
1.2.	Cellules NT2/D1	86
2.	Problématique de la thèse	86

## **Résultats**

### **Résultats Partie I**

1.	Caractérisation des effets de la testostérone les cellules TCam-2	88
1.1.	Marqueurs de jonctions cellulaires	88
1.2.	Marqueurs de prolifération	89
2.	Mode d'action de la testostérone	90
2.1.	Rôle du récepteur des androgènes	90
2.1.1.	Antagonistes	90
2.1.2.	Interférence ARN	91
2.2.	Les autres voies de signalisation	91
3.	Conclusion	92
	<b>Publication1</b>	91

### **Résultats Partie II**

	<b>Effets des micropolluants sur les cellules de cancer testiculaire</b>	93
1.	Caractérisation des micropolluants	93
1.1.	Mélange M3	94
1.1.1.	Test de prolifération	94
1.1.2.	Analyse biochimique	95
1.1.3.	Expression génique	95
1.2.	Mélange M2	95
1.2.1.	Test de prolifération	95
1.2.2.	Analyse biochimique	96
1.2.3.	Expression génique	96
2.	Conclusion pour les mélanges (M1, M2 et M3)	96

### **Résultats Partie III**

1.	Introduction	97
2.	Principaux résultats	98

3. Conclusion	100
---------------	-----

## **Publication2**

### **Résultats Partie IV**

<b>Résultats complémentaires (Etude des effets du mélange M4)</b>	101
---	-----

1. Mélange M4	101
1.1. Test de prolifération	101
1.2. Analyse biochimique	101
1.3. Expression génique	102

## **Discussion**

<b>1. Les alkyl-phénols (APs) sont-ils impliqués dans l'initiation et/ou la progression des cancers testiculaires ?</b>	104
1.1. Initiation	104
1.2. Progression	109
1.2.1. Cancers testiculaires	108
1.2.2. Autres cancers de l'appareil reproducteur	110
<b>2. Quel est le rôle d'ER<math>\alpha</math>36 dans la sensibilité aux œstrogènes et aux œstrogénomimétiques ?</b>	111

## **Bibliographie**

## Avant propos

Cette thèse s'inscrit dans le cadre des cancers testiculaires dont l'incidence a augmenté régulièrement au cours des 30 dernières années et dont l'une des causes pourrait être l'exposition des cellules germinales à des perturbateurs endocriniens pendant la vie fœtale.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude des micropolluants en mélange plutôt que des substances isolées.

L'objectif de ce travail était d'étudier les effets des androgènes naturels sur les cellules séminomateuses humaines, de façon à compléter nos données sur l'action des œstrogènes puis de déterminer quel est l'effet d'un mélange de micropolluants à caractère œstrogénique *in vitro* et *in vivo*.

Dans la première partie, l'étude des androgènes nous a permis de montrer que la testostérone stimule la prolifération des cellules séminomateuses par le biais de son aromatisation en œstradiol.

Dans la deuxième partie, après avoir étudié plusieurs mélanges, nous nous sommes focalisés sur un mélange 4-tert-octylphénol+4-nonylphénol (proportions 1 :30), dénommé M4.

Nous avons trouvé, *in vitro*, que ce mélange stimule la prolifération des cellules TCam-2, avec un maximum observé à la concentration  $10^{-9}$  M. Cette stimulation de la prolifération est plus importante que celle observée avec l'œstradiol. Cet effet s'accompagne d'une augmentation l'expression de marqueurs de la prolifération. Aucune apoptose n'est observée. *In vivo*, nous avons testé l'effet de ce mélange sur des souris Nude : la croissance de tumeurs dérivées de cellules xénotreffées est aussi accélérée par une administration de M4.

Le mélange M4 ( $10^{-9}$  M) stimule la prolifération des cellules TCam-2 qui n'expriment pas le récepteur ER $\alpha$ 66, mais la forme tronquée ER $\alpha$ 36. Cette stimulation de la prolifération n'est pas observée dans les cellules TCam-2 qui n'expriment plus ce récepteur membranaire, montrant l'importance de ce récepteur. Nous avons trouvé que M4 active la voie de signalisation PKA. Cela est toujours observé en réponse au mélange M4 dans les cellules TCam-2, dont l'expression d'un autre récepteur membranaire des œstrogènes, GPER, est inhibé par interférence ARN. Par contre, cette réponse n'est plus observée en présence d'un inhibiteur de PI3K (Wortmanine). Cela démontre un mode d'action, qui n'est pas tout à fait identique à celui de l'œstradiol.

Ces travaux ont fait l'objet de deux articles :

pour la première partie, dans « Molecular and Cellular Endocrinology » en 2012, dont je suis le 3<sup>ème</sup> auteur.

Pour la deuxième partie, dans la revue « Plos One » en 2013, dont je suis le 1<sup>er</sup> auteur.

## **Introduction**

## **I. Différenciation des cellules germinales**

### **I.1. Développement des cellules germinales**

Chez les mammifères, la détermination génétique du sexe conduit à former soit un ovaire, soit un testicule (Siegfried, 2010). La reproduction sexuée est dépendante de la production de deux types de gamètes par ces gonades, des ovocytes et des spermatozoïdes, qui reposent sur la fonction spécialisée des gonades femelle et mâles.

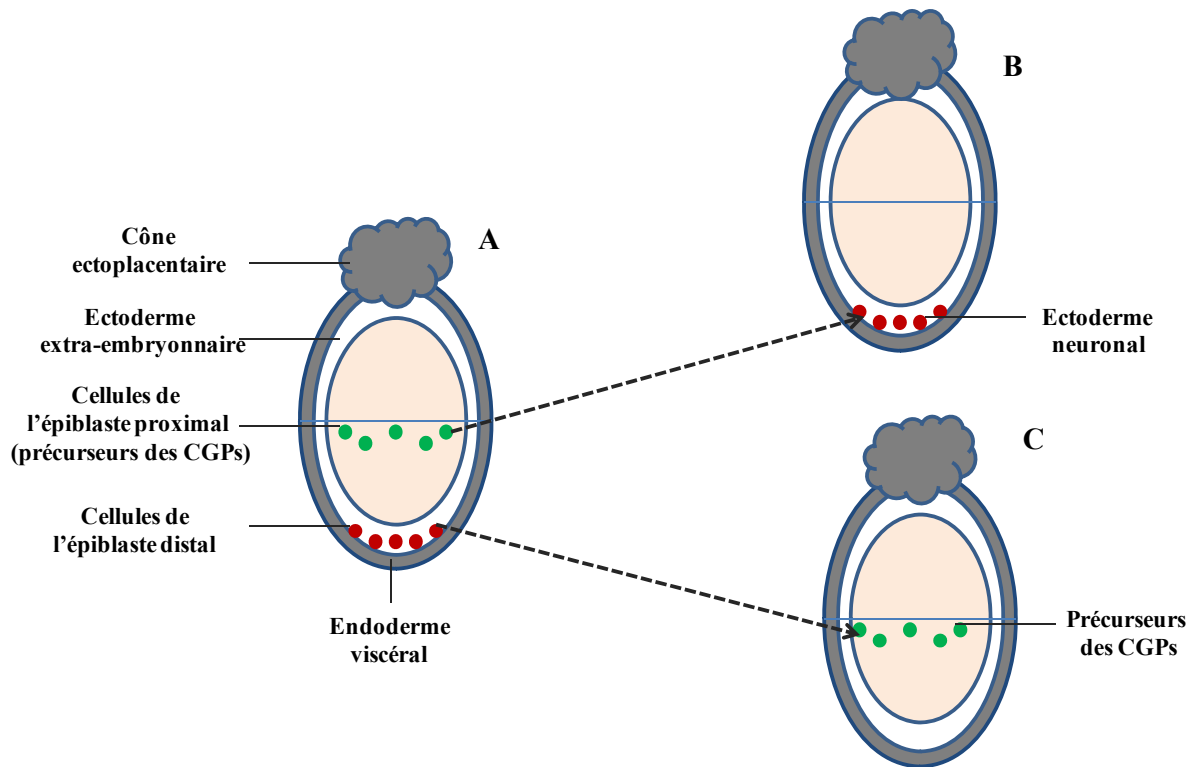
Les gamètes proviennent d'une petite population cellulaire apparaissant très tôt au cours du développement embryonnaire : les cellules germinales primordiales (CGPs).

Le développement des gonades chez les mammifères implique deux phases distinctes : (I) la spécification des CGPs à partir d'une cellule épiblastique précurseur située à l'extérieur de l'embryon, (II) la migration des CGPs depuis la base de l'allantoïde vers l'intérieur de l'embryon et la colonisation de crêtes génitales (Kierszenbaum et Tres, 2001).

Chez les mammifères, la gonade se forme initialement comme un organe bipotentiel capable de se développer en testicule ou en ovaire (Jameson et al., 2012). Les cellules germinales se différencieront en spermatozoïdes ou en ovocytes en répondant aux signaux moléculaires fournis par les cellules somatiques de la gonade. Dans un ovaire, les cellules germinales (CGs) entrent en méiose pendant la vie fœtale, et elles commencent l'ovogénèse. Par contre, dans le testicule les cellules germinales n'entrent en méiose qu'après la naissance, au moment de la puberté (Bowles et Koopman, 2012).

La gonade est donc constituée de cellules d'origine somatique et de CGs. Le développement de la lignée germinale dépend des tissus somatiques et, dans la plupart des cas, le développement des tissus somatiques dépend aussi de la lignée germinale. Les précurseurs des cellules somatiques des gonades et les CGs ont des origines embryologiques différentes. Les tissus somatiques de la gonade sont dérivés du mésoderme latéral (Siegfried, 2010).





**Figure 1 : Transplantations de cellules épiblastiques chez l'embryon de souris à 6,0 jpc de développement.**

(A) En vert, les précurseurs des CGPs sont normalement présents dans la région proximale de l'épiblaste, jusqu'à la limite épiblaste/ectoderme extra-embryonnaire.

(B) La transplantation de ces précurseurs dans la région distale de l'épiblaste aboutit à la formation de l'ectoderme neuronal (en rouge), prouvant ainsi l'absence de déterminisme de ces cellules à ce stade du développement.

(C) Inversement, la transplantation de cellules provenant de la région distale de l'épiblaste dans la région proximale permet l'obtention de CGPs (en vert), prouvant ainsi l'importance de l'environnement dans la différenciation des CGPs. (D'après Machev et al., 2004).

## **I.1.1. Spécification de la lignée germinale**

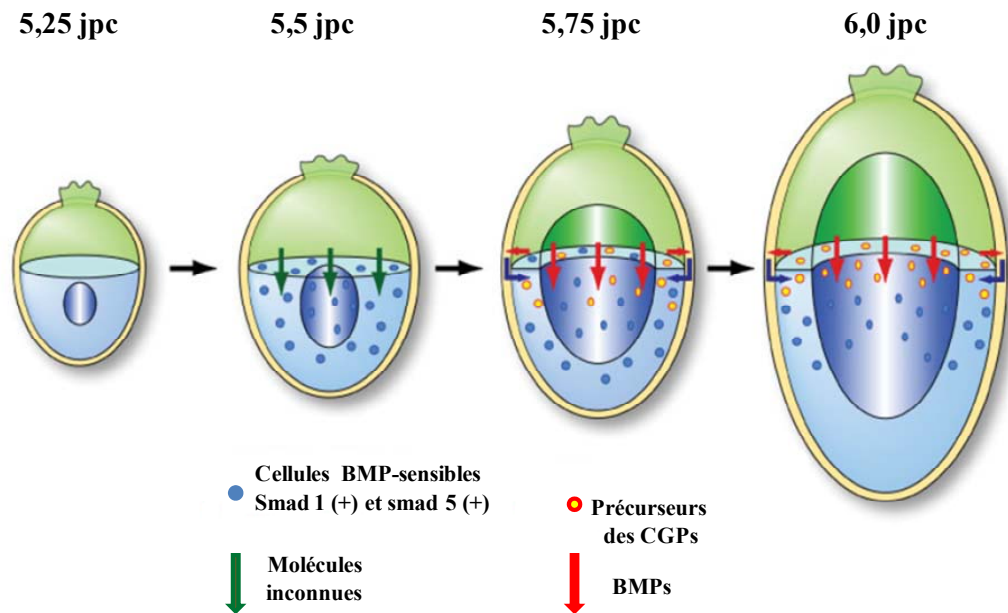
### **I.1.1.1. Origine de la lignée germinale**

La fonction testiculaire se met en place *in utero* pendant la vie fœtale : la différenciation gonadique commence à ce stade sous l'effet de différents facteurs génétiques (Hauschild, et Theintz,, 2008).

Chez les mammifères, les CGPs dérivent des cellules pluripotentes de l'épiblaste proximal sous l'effet de signaux inducteurs provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire (Saitou et al., 2005; Western, 2009). A six jours de développement (jours post-coïtum = jpc), les précurseurs des CGPs sont présents sur tout le pourtour de cet épiblaste proximal (Machev et al., 2004).

Des expériences montrent qu'à 6,5 jpc, des cellules de l'épiblaste proximal transplantées en position distale ne donneront pas de CGPs, alors que des cellules épiblastiques distales greffées en position proximale évoluent en CGPs (Figure1). Ceci montre l'importance des signaux provenant de l'environnement dans la détermination des CGPs, surtout la proximité de l'ectoderme extra-embryonnaire. De même, la mise en culture d'un épiblaste proximal de 6 jpc donne naissance à des CGPs, alors qu'un épiblaste distal ne donne jamais naissance à des CGPs *in vitro*, sauf s'il est placé en présence d'ectoderme extra embryonnaire. Ces résultats établissent clairement le rôle inducteur de l'ectoderme extra-embryonnaire dans l'émergence des CGPs (Machev et al., 2004).

A partir de 6,5 jpc, au cours de la gastrulation, les précurseurs des CGPs vont migrer hors de l'épiblaste par la partie postérieure de la ligne primitive pour se localiser dans une région extra-embryonnaire à la base de l'allantoïde (Machev et al., 2004). C'est à partir de cette étape du développement (vers 7,2 jpc) que le potentiel de ces progéniteurs se restreint à la lignée des CGPs, une fois leur localisation extra-embryonnaire réalisée (Machev et al., 2004; Saitou et al., 2005). Les précurseurs allantoïdiens perdent l'expression de l'E-cadherine (protéine des jonctions intercellulaires) tandis que les précurseurs des CGs l'expriment fortement (Matsui et Okamura, 2005). Ces CGPs sont identifiées à 7,2 jpc par l'expression de



**Figure 2 : Induction des précurseurs des CGPs.**

Après 5,25 jpc, les cellules BMP-sensibles (cercles bleus) peuvent exprimer à la fois SMAD1 et SMAD5 qui sont induites par l'ectoderme extra-embryonnaire (flèches vertes).

Après 5,5 jpc, les signaux BMPs (flèches rouges) de l'ectoderme extra-embryonnaire induisent les précurseurs des CGPs (cercles jaunes) dans l'épiblaste proximal.

L'activation des récepteurs des BMPs dans l'endoderme viscéral stimule la production des facteurs inconnus, qui sont également impliqués dans l'induction des précurseurs des CGPs (flèches bleues).

Les cellules BMP-sensibles sont localisées dans l'épiblaste proximal vers 6,0 jpc. (D'après Matsui et Okamura, 2005).

gènes tels que Tnap (tissue non-specific alkaline phosphatase) codant la phosphatase alcaline, Fragilis (interferon-inducible gene) codant une protéine transmembranaire, Stella (PGC-7) codant une protéine nucléo-cytoplasmique exprimée également dans l'ovocyte et l'embryon au stade de la pré-implantation, Ssea1 (stage-specific embryonic antigen-1), Blimp1 (B-Lymphocyte induced maturation protein-1), Nanos3, et les gènes de pluripotence Oct3/4, Nanog et Sox2 (McLaren, 2003; Saitou et al., 2005). Les CGPs sont à ce stade environ une quarantaine.

### **I.1.1.2. Signalisation impliquée dans la spécification des CGPs**

Parmi les voies de signalisation contrôlant cette étape précoce, celle des membres de la famille du TGF $\beta$ , comme les BMPs et leurs effecteurs intracellulaires (les protéines SMAD), joue un rôle primordial. Les BMPs, sont des facteurs connus pour être sécrétés et impliqués dans de nombreux phénomènes de différenciation au cours de l'embryogenèse. Plusieurs études ont contribué à montrer que la signalisation impliquée dans la spécification des CGPs implique surtout BMP2, BMP4 et BMP8b et deux de leurs effecteurs SMAD1 et SMAD5 (Figure 2) (Machev et al., 2004; Saitou et al., 2005).

En effet, des souris homozygotes déficientes pour BMP4 (souris KO) présentent une absence d'allantoïde et un déficit de CGPs. Les précurseurs de ces deux types de cellules se trouvent dans des positions similaires dans l'épiblaste proximal avant la gastrulation (Lawson et al., 1999). Cela suggère que la signalisation de BMP4 issu de l'ectoderme extra-embryonnaire est importante pour que certaines cellules de l'épiblaste proximal exercent leurs compétences dans la spécification des CGPs tandis que d'autres se développeront en tissus extra-embryonnaires mésodermiques (Saitou et al., 2005).

Alors que des embryons porteurs d'une invalidation homozygote du gène BMP4 sont totalement dépourvus de CGPs, les hétérozygotes montrent une réduction de 50% de leur nombre de CGPs (Lawson et al., 1999). A 5,5 jpc, l'expression de BMP4 est détectée à un faible niveau dans tout l'ectoderme extra-embryonnaire, y compris dans les cellules qui jouxtent l'épiblaste (Lawson et al., 1999).

De 6 jpc à 6,5 jpc de développement, l'expression de BMP4 est limitée à l'ectoderme extra-embryonnaire proximal puis elle s'étend lors de la gastrulation au mésoderme extra-embryonnaire. La protéine BMP4, exprimée par l'ectoderme extra-embryonnaire, induirait la

spécification des CGPs, tandis que la protéine BMP4 du mésoderme extra-embryonnaire assurerait leur localisation et leur survie (Machev et al., 2004).

Dans un système de culture *in vitro*, des embryons complets prélevés à 6 jpc et maintenus sur un support flottant dans un milieu défini forment des CGPs après 36 heures. Si l'épiblaste est cultivé seul, cela ne permet pas la formation de CGPs. Par contre, si BMP4 est ajoutée au milieu de culture, des CGPs exprimant la phosphatase alcaline sont observées (Ohinata et al., 2009). Ces expériences *in vitro* ont aussi permis d'étudier la fenêtre du développement où la sensibilité à BMP4 existe pour induire des CGPs. La réponse à BMP4 existe dès 5,5 jpc mais elle a disparu à 6,5 jpc. Wnt3 pourrait fournir aux cellules épiblastiques la capacité de répondre aux signaux BMPs. En effet chez les mutants Wnt3<sup>-/-</sup>, il ne se forme pas de CGPs alors que BMP4 s'exprime correctement dans l'ectoderme extraembryonnaire (Ohinata et al., 2009).

BMP8b interviendrait, comme BMP4, dans la détermination des CGPs. En effet, l'absence de BMP8b entraîne une diminution du nombre, voire une absence totale des CGPs. BMP8b n'interviendrait pas dans leur prolifération ni dans leur survie puisque chez certains embryons homozygotes dépourvus de BMP8b, lorsque des CGPs sont présentes, elles migrent et prolifèrent de façon comparable à ce qui est observé chez les embryons hétérozygotes (Machev et al., 2004). L'expression de BMP8b est limitée entre 6 et 7,5 jpc à l'ectoderme extra-embryonnaire (Ying et al., 2000). La comparaison entre des embryons de souris hébergeant une ou deux mutations hétérozygotes de BMP4 et BMP8b révèle que les effets ne sont pas additifs (Ewen et Koopman, 2010; Ying et al., 2000).

Contrairement à BMP4, l'addition de BMP8b au milieu de culture d'embryons de souris de 6 jpc dépourvus d'endoderme viscéral n'induit pas de CGPs. Il s'avère en fait que BMP8b peut contrôler le développement de l'endoderme viscéral, modulant ainsi l'activité inhibitrice de l'endoderme viscéral antérieur contre BMP4 (Ohinata et al., 2009). Cela permet de confiner les signaux inhibiteurs dérivés de l'endoderme viscéral antérieur. BMP8b n'est essentiel ni pour l'expression correcte de BMP4 dans l'ectoderme extra-embryonnaire, ni pour conférer à l'épiblaste la capacité de répondre à BMP4 (Ohinata et al., 2009).

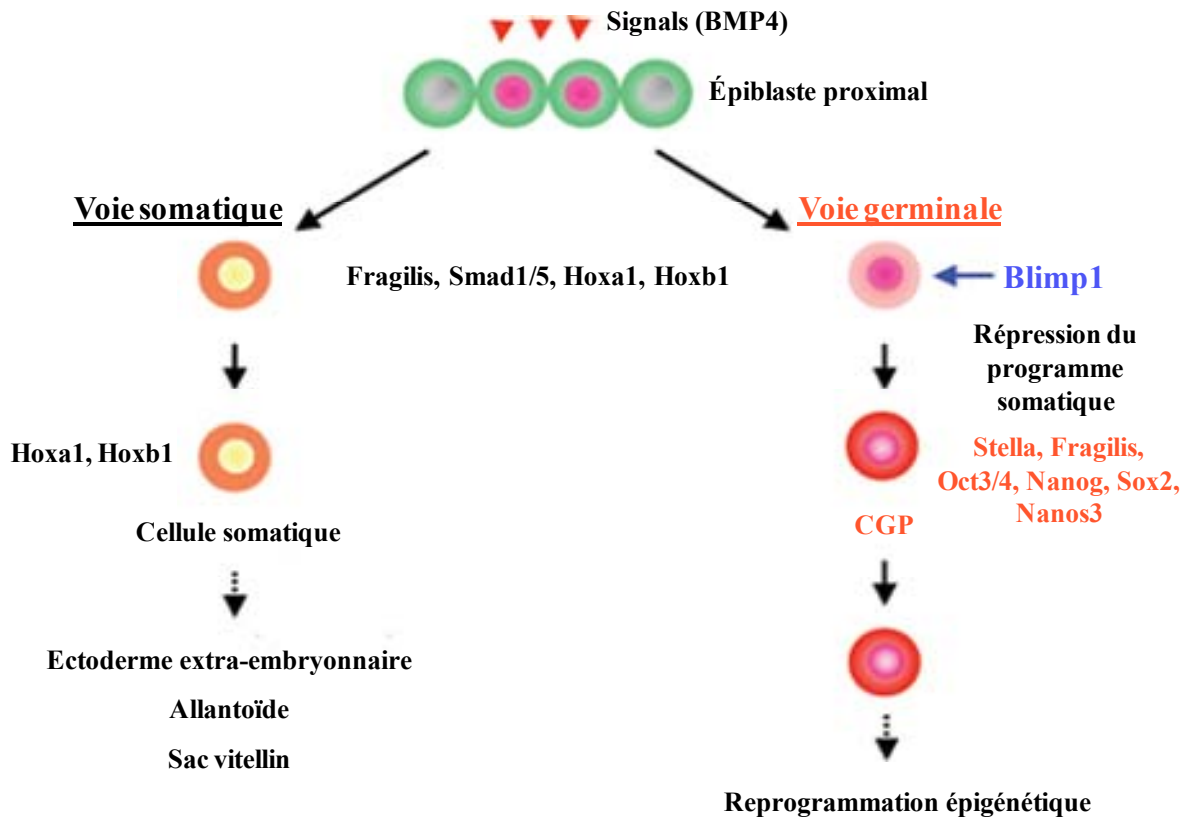
La transcription de BMP2 est détectée dans l'endoderme, en particulier à proximité de la région frontière entre l'épiblaste et l'ectoderme extra-embryonnaire, des embryons de souris aux stades prégastrula et gastrula. L'étude de souris mutantes pour BMP2 a montré une

diminution du nombre de CGPs. Cette diminution est dépendante de la dose puisqu'une réduction est déjà observée chez les embryons hétérozygotes (comme pour BMP4) ; BMP2 et BMP4 semblent avoir un effet additif (Machev et al., 2004; Ying et Zhao, 2001).

Les processus de signalisation, qui conduisent à la ségrégation de la lignée germinale, consistent en une cascade de réactions déclenchée après la fixation des ligands BMPs sur des récepteurs membranaires appartenant à la famille du TGF $\beta$  et qui possèdent une activité sérine/thréonine kinase. Ces BMPs se fixent d'abord sur un récepteur de type II (BMPRII), qui active un récepteur de type I (BMPRI, BMPRII) par phosphorylation. Ce dernier active, à son tour, toujours par phosphorylation, les protéines intracellulaires (SMADs), en particulier SMAD1 et SMAD5. Elles forment alors des hétérodimères avec la co-SMAD SMAD4 qui permet la translocation nucléaire et l'activation de gènes cibles.

SMAD1 est exprimée à 6,5 jpc au niveau de l'endoderme viscéral et plus faiblement au niveau de l'épiblaste, ce qui suggère qu'il serait impliqué dans la prolifération et la survie des CGPs. Par contre, SMAD5, exprimée à 6,5 jpc par l'épiblaste, serait l'effecteur cytoplasmique de BMP4 et éventuellement de BMP8b. Ces protéines SMADs entrent dans le noyau et activent la transcription des gènes responsables du déterminisme de la lignée germinale. En effet, les mutants SMAD5 présentent une diminution du nombre de CGPs et une localisation anormale ; la même chose a été observée chez les mutants BMP8b (Machev et al., 2004; Massagué et al., 2005). Chez les embryons de souris homozygotes SMAD1<sup>-/-</sup> ou SMAD5<sup>-/-</sup>, on observe des défauts de spécification des CGPs et de formation de l'allantoïde. Par ailleurs, l'analyse des embryons doublement hétérozygotes SMAD1<sup>+/-</sup> et SMAD5<sup>+/-</sup> révèle des défauts similaires dans la morphogenèse de l'allantoïde et la spécification des CGPs. Ces résultats confirment l'importance de ces protéines dans la formation des CGPs (Arnold et al., 2006; Ewen et Koopman, 2010).

En résumé, une première exposition à BMP4, synthétisée par l'ectoderme extra-embryonnaire, conférerait à l'épiblaste proximal une compétence à se différencier soit en CGPs, soit en allantoïde. Cela ne s'opérerait que dans la région postérieure en raison de signaux inhibiteurs provenant de l'endoderme viscéral antérieur. La restriction dans la lignée des CGPs serait contrôlée par un deuxième signal provenant conjointement de l'ectoderme extra-embryonnaire (via BMP4 et BMP8b) et de l'endoderme extra-embryonnaire (via BMP2). Par la suite, la survie et la localisation des CGPs seraient sous le contrôle de BMP4 synthétisée par le mésoderme extra-embryonnaire (Machev et al., 2004).



**Figure 3 : Programmation génétique de la spécification de la lignée germinale.** Certaines cellules épiblastiques recevant le signal BMP4 répondent en exprimant Blimp1, ces cellules expriment également Fragilis, Smad1, Smad5 et les gènes Hox. Blimp1 agit en réprimant l'expression des gènes impliqués dans la différenciation somatique tels que Hoxa1 et Hoxb1. Ainsi, la voie germinale est induite. Les CGPs expriment Fragilis, mais aussi Stella, Nanos3 et les gènes de pluripotence (Oct3/4, Sox2, Nanog). Ces cellules suivent, par la suite, une reprogrammation épigénétique. (D'après Saitou et al., 2005).

### **I.1.1.3. Suppression du programme somatique et maintien de la pluripotence**

La spécification des CGPs, implique une répression active des programmes transcriptionnels somatiques et le maintien de l'expression, ou une induction de l'expression, des gènes de pluripotence tels que Oct3/4 (Pou5f1), Nanog et Sox2 (Ewen et Koopman, 2010).

Des études récentes ont identifié, le B-lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp1), connu aussi sous le nom de positive regulatory domain 1-binding factor 1 (Prdm1), et Prdm14, comme des facteurs clés pour la spécification des CGs. Ils codent des protéines de la famille PRDM (PR-domain containing proteins), protéines agissant comme répresseur transcriptionnels. Ces deux gènes ne s'expriment pas chez les embryons de souris BMP4<sup>-/-</sup> ou BMP8b<sup>-/-</sup> (Ohinata et al., 2009).

Blimp1 est exprimée à 6,25 jpc dans certaines cellules (entre 4 et 8) de l'épiblaste proximal postérieur au contact de l'ectoderme extra-embryonnaire. Ces cellules sont les précurseurs des CGPs (Ohinata et al., 2009). Les études de mutation Blimp1 ont montré que ce gène joue un rôle essentiel dans la spécification des CGPs. Chez les embryons porteurs d'une invalidation hétérozygote (Blimp1<sup>+/-</sup>), le nombre de CGPs est réduit, et ces cellules présentent des altérations de la migration, de la prolifération et de la répression du programme somatique. Chez les embryons homozygotes (Blimp1<sup>-/-</sup>), les CGPs normales sont absentes (Ohinata et al., 2009).

En effet, des cellules exprimant la phosphatase alcaline sont présentes mais en petit nombre, mais elles ne migrent et prolifèrent pas normalement, et ne répriment pas des gènes Hox impliqués dans la différenciation de la lignée somatique comme le font habituellement les CGPs (Figure 3) (Ewen et Koopman, 2010; Saitou et al., 2005).

Blimp1 contribue également au maintien de l'activation de gènes de pluripotence dans les CGPs. Blimp1 s'associe à PRMT5 (proteine arginine N-méthyltransférase 5), une arginine méthyltransférase ayant la capacité de catalyser la diméthylation de l'arginine 3 sur les extrémités N-terminale des histones H2A et H4 (H2A/H4R3me2s). Blimp1 et PRMT5 sont co-exprimés dans les CGs naissantes indiquant que le rôle de Blimp1 à assurer l'identité et la survie de CGs peut dépendre de ce complexe (Ewen et Koopman, 2010; Ohinata et al., 2009; Western, 2009). Chez les embryons de souris mutants Blimp1<sup>-/-</sup>, seule la moitié des gènes de



pluripotence ne seraient pas réexprimés, suggérant donc aussi l'intervention de mécanismes BLIMP1-indépendants.

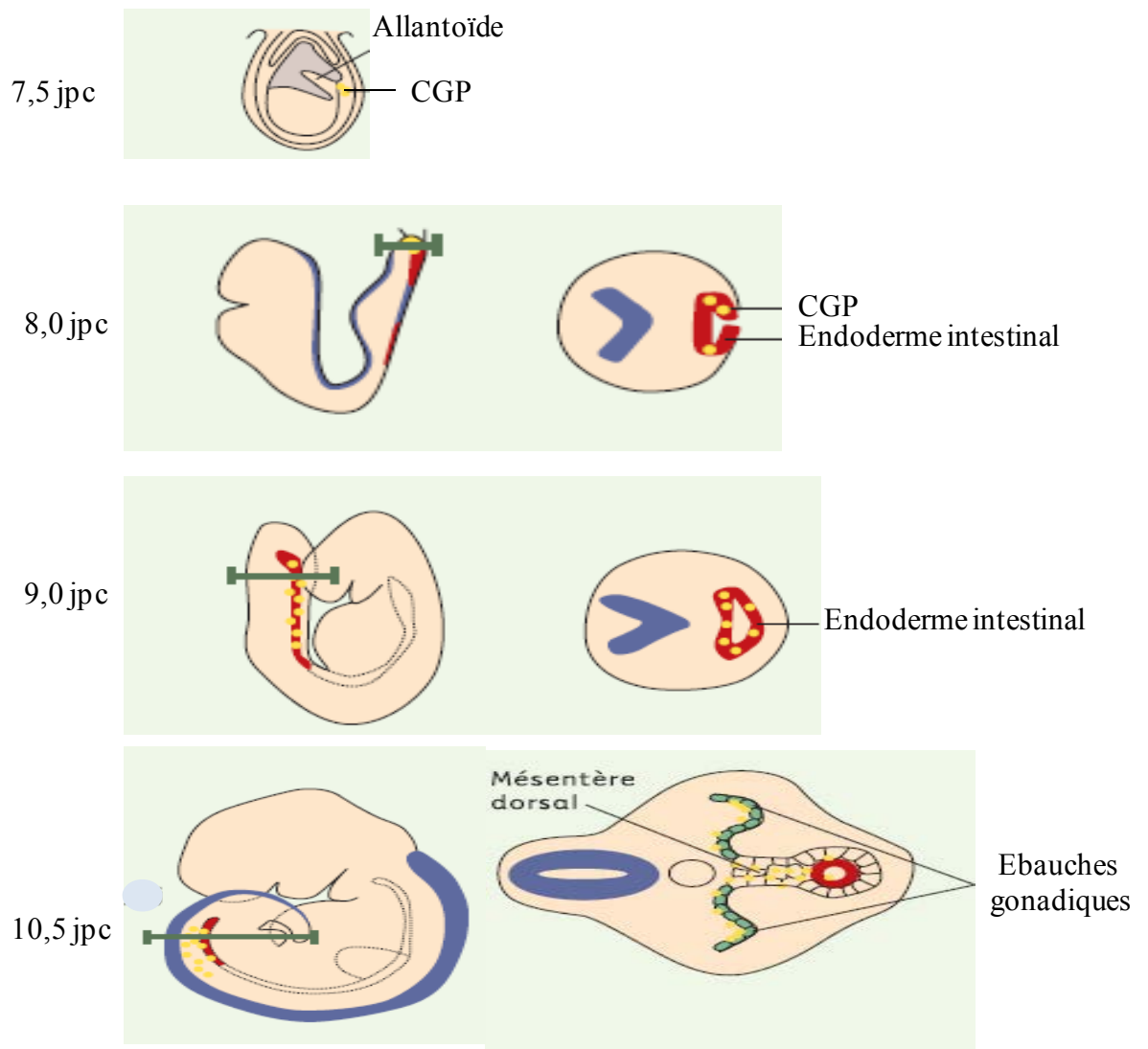
Des études ont été réalisées sur des embryons ayant subi une invalidation homozygote des gènes Smad2 ou FoxH1, qui codent des acteurs de la signalisation Nodal requise pour la formation de l'endoderme viscéral antérieur (Ohinata et al., 2009). Ce tissu est un émetteur de signaux inhibiteurs contre la postériorisation (CER1 contre WNT et NODAL, LEFTY contre NODAL, DKK1 contre WNT).

Chez ces embryons dépourvus d'endoderme viscéral antérieur, on observe un plus grand nombre de cellules qui expriment Blimp1 et elles ne se localisent plus uniquement dans la région postérieure. Ces résultats indiquent que l'expression localisée de Blimp1 dans la région postérieure de l'épiblaste est bien due à une inhibition de son expression dans la région antérieure par l'endoderme viscéral antérieur.

L'expression de Prdm14 commence à 6,25 jpc dans les cellules de l'épiblaste proximal postérieur qui expriment Blimp1. L'expression de Prdm14 se poursuit jusqu'à 13,5-14,5 jpc chez les embryons des deux sexes. L'analyse de souris KO pour Prdm14 a montré que les souris mutantes homozygotes étaient totalement dépourvues de CGs (perte complète à 12,5 jpc), ce qui suggère que Prdm14 est essentiel pour le développement des CGs (Kurimoto et al., 2008).

Chez les embryons Prdm14<sup>-/-</sup>, les CGPs montrent une répression de l'expression de Sox2 et Hoxb1, suggérant que PRDM14 joue un rôle dans la ré-acquisition de l'expression d'une partie des gènes de pluripotence, mais pas dans la suppression du programme somatique (Yamaji et al., 2008). PRDM14 compléterait l'action de BLIMP1 dans la réexpression des gènes de pluripotence.

Les CGPs qui expriment Blimp1, Prdm14 et stella intègrent trois événements majeurs : la répression d'un programme mésodermique somatique, la ré-acquisition d'une pluripotence potentielle et, comme nous le verrons ci-après, la reprogrammation épigénétique au cours de leur migration. Blimp1 est essentielle pour les trois processus, tandis que Prdm14 assure les deux derniers (Ohinata et al., 2009).



**Figure 4 : Migration des CGPs au cours du développement embryonnaire chez la souris.**

A 7,5 jpc, les CGPs sont retrouvées à la base de l'allantoïde. Entre 8,0 et 9,0 jpc, du fait de mouvements morphogénétiques, elles vont être incorporées dans l'endoderme intestinal. De là, elles vont migrer activement pour rejoindre les ébauches gonadiques via le mésentère dorsal. (D'après Machev et al., 2004).

## **I.1.2. Migration et prolifération des cellules germinales**

### **I.1.2.1. Migration des cellules germinales primordiales**

Après leur spécification, les cellules germinales migrent vers les crêtes génitales. Les CGPs sont situées initialement (7,5 jpc) à l'arrière de la ligne primitive, à la base de l'allantoïde (Ewen et Koopman, 2010; Molyneaux et al., 2003). Elles possèdent dès ce stade de développement une morphologie de cellules migratrices (présence de pseudopodes) (McLaren, 2003). Leur migration suit deux modes, l'un passif, l'autre actif. La formation de l'endoderme de la paroi de l'intestin postérieur à partir de l'endoderme viscéral conduit, de façon passive, à l'intégration des CGPs dans ce tissu. Ensuite, elles vont activement migrer pour quitter l'intestin, longer le mésentère dorsal et rejoindre les ébauches gonadiques ou crêtes génitales (Machev et al., 2004).

Les crêtes génitales se forment de chaque côté de la ligne médiane et du mésentère dorsal, à la surface du mésonéphros, du fait de la prolifération de l'épithélium cœlomique et d'une condensation du mésenchyme sous-jacent. Les premières CGs (pionnières) arrivent dès 9,5 jpc sur le lieu des futures gonades. Ces cellules pionnières guideraient les cellules suivantes vers leur destination grâce aux contacts qu'elles conservent entre elles via leurs pseudopodes. Cette migration serait favorisée par un effet chimio-attractant des gonades à 10,5 jpc (Figure 4) (Machev et al., 2004).

Les CGPs sont réceptives à une variété de signaux produits par des cellules somatiques (revue dans Ewen et Koopman, 2010). Leur migration est contrôlée par les produits des gènes comme Steel (sl) et c-kit (locus dominant white spotting). Ils codent respectivement la cytokine KIT-ligand (KITL ou KL), un facteur de croissance également appelé Stem Cell Factor (SCF), ou Mast-cell Growth Factor (MGF), et son récepteur c-KIT, récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de type III, également appelé CD117. KL a un rôle établi dans la stimulation de migration des CGPs de l'intestin postérieur jusqu'aux crêtes génitales.

Il est exprimé dans l'endoderme primitif destiné à devenir le gros intestin, et plus tard dans les cellules somatiques le long de la voie de migration des CGPs. Pour exécuter cette fonction, le ligand se lie au récepteur à activité tyrosine kinase localisé sur les CGPs. Cela induit une cascade de signalisation intracellulaire qui implique la phosphorylation de PI3K et Src, et

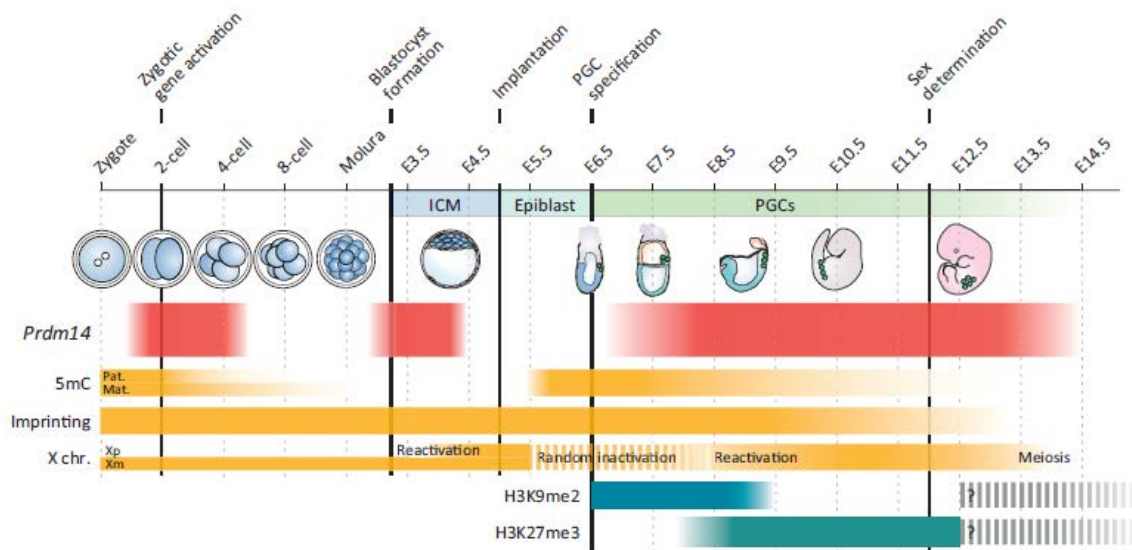
terminée par la phosphorylation d'effecteurs en aval de la sérine-thréonine kinase AKT (appelé aussi PKB, protéine kinase B). Chaque élément de cette cascade de signalisation semble être requis pour activer la migration des CGPs. Ces éléments sont aussi nécessaires pour la migration directionnelle des CGPs vers les gonades au cours du développement (revue dans Ewen et Koopman, 2010).

Chez les souris mutantes qui n'expriment pas le facteur Steel ou son récepteur c-KIT, le nombre de CGPs semble être normal à 8 jpc, mais ce nombre est considérablement réduit à 9 jpc, par rapport aux témoins. En absence de c-KIT ou de son ligand, les CGPs entrent en apoptose, détectée en suivant l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX (Bcl2 associated X protein). L'expression de Steel dans la ligne primitive diminue naturellement entre 9,5 et 10,5 jpc. Cela semble nécessaire pour induire l'apoptose des CGPs qui n'étaient pas très avancées dans leur migration vers les crêtes génitales. Ainsi, KITL contrôle la survie des CGPs et il est nécessaire pour leur prolifération et leur migration (Runyan et al., 2006).

Chez la souris, d'autres facteurs sont aussi impliqués dans la migration et la survie des CGPs. C'est le cas de SDF1 (Stromal cell-Derived Factor 1) encore appelé CXCL12 (CXC motif ligand 12), qui est exprimé dans le mésenchyme tout le long du corps et dans les crêtes génitales. Il s'agit d'une interaction entre une cytokine de type chemokine et son récepteur couplé à une protéine G, CXCR4 (CXC motif receptor 4) (Ewen et Koopman, 2010; Molyneaux et al., 2003).

Les travaux de Dudley et al. montrent par ailleurs que les BMPs jouent aussi un rôle important dans la migration des CGPs. La signalisation des BMPs, qui est active dans les crêtes génitales, régule l'expression de Steel et Sdf1a dans les crêtes génitales ; la perte de cette expression conduit à une mort cellulaire pour les cellules mésenchymateuses et une réduction de l'expression des gènes Kitl et Sdf1a, qui sont des marqueurs de l'épithélium à 9,5 jpc. Ceci suggère que la signalisation des BMPs est nécessaire pour la survie du mésenchyme mésonéphrétique et la migration des CGPs (Dudley et al., 2010).

Pendant leur migration, les CGPs subissent aussi une reprogrammation épigénétique. La répression de l'expression génique peut être effectuée par méthylation de l'ADN sur les cytosines au sein d'îlots CpG (5 méthyl Cytosine ou 5mC) par des DNA méthyl transférases (DNMT). L'enzyme DNMT1 méthyle les cytosines au sein de séquences hémi-méthylées et il s'agit donc d'une méthylase d'entretien agissant pendant la réplication. Elle s'associe pour cela à ND95/UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and Ring finger domain 1) qui permet la



**Figure 5 : Expression de Prdm14 et événements épigénétiques clés au cours du développement chez la souris.**

Les stades de développement où Prdm14 est exprimé sont indiqués par des barres rouges. Au stade blastocyste, les niveaux d'expression sont indiqués uniquement pour les cellules de la masse cellulaire interne (ICM). A partir du stade E6.5, l'expression est montrée uniquement pour les cellules germinales.

Le niveau de méthylation de l'ADN génomique (niveau de 5mC), des gènes soumis à empreinte, et l'état d'activation du chromosome X sont marqués par des barres jaunes. L'état de méthylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 27 (H3K9me2 et H3K27me3) sont également décrits par des barres bleues.

Abréviations: Pat, génome paternel; Mat, génome maternel; Xp, chromosome X paternel; Xm, chromosome X maternel; ICM, masse cellulaire interne; 5mC, 5 méthyl-cytosine; H3K9me2, histone H3 lysine 9 diméthylée; H3K27me3, histone H3 lysine 27 triméthylée; E6.5, jour embryonnaire 6.5. (D'après Nakaki et Saitou., 2014).

liaison aux foci de réplication. Les enzymes DNMT3A et 3B agissent sur des cytosines au sein de séquences non méthylées et interviennent pour la méthylation *de novo*. DNMT3L n'a pas d'activité catalytique mais elle permet en s'associant à DNMT3A et 3B de les adresser à leurs séquences cibles. Les 5mC sont associées à des modifications post-traductionnelles au niveau des queues des histones qui ont une action répressive sur la transcription génique. On peut citer en exemple H3K9me2/3 et H3K27me3.

Les CGPs n'expriment pas Dnmt3A et 3B impliquées dans la méthylation *de novo* (Kagiwada et al., 2013; Nakaki et Saitou, 2014).

De plus, les CGPs n'expriment pas les H3K9 diméthyl transférase G9A/EHMT2 et GLP/EHMT1. De façon intéressante, PRDM14 semble important pour cette reprogrammation épigénétique car chez des souris Prdm<sup>-/-</sup> on n'observe pas la répression de ces gènes (Saitou et Yamaji, 2012). Si l'on analyse l'état de méthylation de l'ADN des CGPs (par méthode de séquençage au bisulfite), on observe qu'à 9,5 jpc il est de 30% alors qu'il est de 70% à 6,5 jpc (Nakaki et Saitou, 2014). En outre, chez ces mutants, l'induction de la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3 (H3K27me3) n'est pas observée dans les CGPs contrairement aux CGPs sauvages.

On observe donc une déméthylation importante qui se poursuivra lorsque les CGPs seront arrivées dans les crêtes génitales et qui aura pour conséquence la disparition de l'empreinte parentale, la réactivation d'un chromosome X et l'effacement de la méthylation au niveau des transposons (Figure 5).

La déméthylation de l'ADN peut se faire de façon active par le biais de cytosine désaminases convertissant les 5mC en thymine, créant ainsi un mésappariement T:G. De telles thymines peuvent être modifiées par la thymine DNA glycosylase (TDG). Cette base modifiée est alors éliminée par les mécanismes de réparation de l'ADN comme l'excision de bases. La 5mC peut aussi être transformée en 5 hydroxy methyl Cytosine (5hmC) par les dioxygénases de la famille TET (ten-eleven translocation) avant d'être clivée.

La déméthylation peut aussi se faire de façon passive lors de la réplication. Les études récentes indiquent que la déméthylation du génome dans les CGPs se ferait principalement par un mécanisme passif lié à la réplication. Le génome des CGs sera reméthylé ultérieurement mais à des moments différents dans les deux sexes (Ewen et Koopman, 2010).

### **I.1.2.2. Prolifération des CGPs**

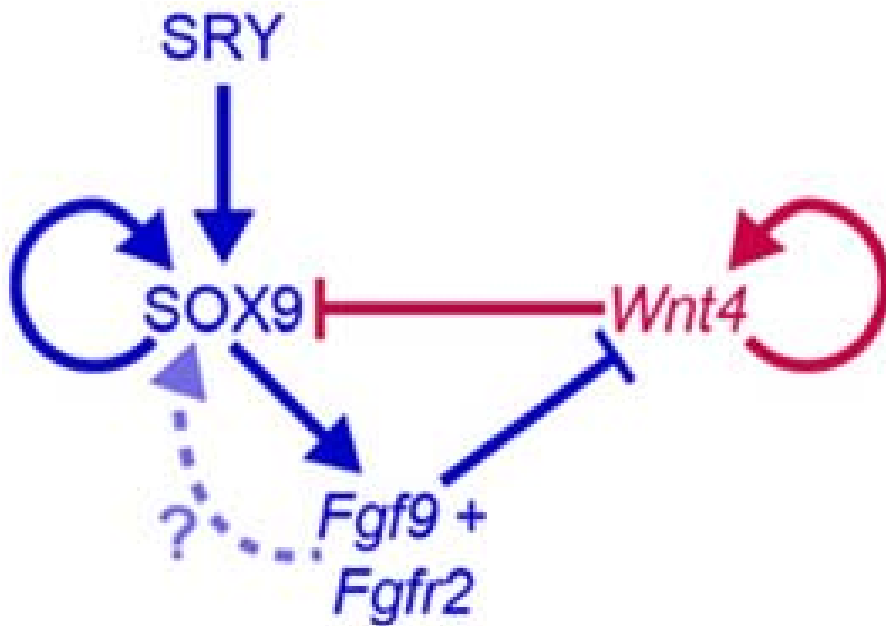
Les CGPs prolifèrent au cours de la migration vers les crêtes génitales et dans les deux jours qui suivent leur arrivée dans les crêtes génitales. Leur nombre augmente rapidement d'environ 100 cellules à 8,5 jpc, jusqu'à 25000 cellules à 13,5 jpc. La population des CGPs est régulée par des facteurs de croissance extracellulaires, agissant à la fois de façon paracrine et autocrine pour la survie des CGPs et stimulant leur prolifération comme KL, FGF (Fibroblast Growth Factor), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), SDF1, BMP4 (revue dans Ewen et Koopman, 2010).

Une fois parvenues dans les crêtes génitales, les CGPs sont nommées cellules germinales (CGs) ou gonocytes. Les cellules somatiques de la future gonade fournissent alors l'environnement nécessaire pour que les CGs poursuivent leur développement et leur différenciation. Ces cellules subissent des changements qui sont indépendants des événements de différenciation sexuelle:

- Un changement morphologique : les CGs deviennent grandes, rondes ce qui facilite leur identification par rapport à leurs voisines somatiques.

- Un changement de l'expression génique ; les gènes *Tnap*, *Ssea1* et *Nanos3*, sont réprimés peu après que les CGs ont rejoint les gonades. D'autres gènes comme *Gcnal* (Germ Cell Nuclear Antigen 1), *Dazl* (Deleted in AZoospermia Like), *Gcl* (GermCell-Less), *Err-β* (Estrogen Related Receptor β), *Mvh* (Mouse Vasa Homolog) et *Wt1* (Wilm's Tumor 1, dans le testicule), sont exprimés permettant ainsi la prolifération des CGs dans les gonades.

- La perte de pluripotence : les gonocytes (CGs) sont moins capables de former des cellules souches pluripotentes en culture. La répression des gènes de pluripotence (*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*) est nécessaire pour la différenciation sexuelle (revue dans Ewen et Koopman, 2010).



**Figure 6 : Modèle de détermination du sexe.**

Sry induit l'expression de Sox9 dans les gonades XY, et Sox9 devient autorégulateur. Sox9 induit l'expression de Fgf9 pour réprimer Wnt4, et peut être aussi pour renforcer sa propre expression. Un échec de répression de Wnt4 (en cas de mutation de Fgf9 ou Fgfr2) se traduit par une répression de Sox9 par la signalisation de Wnt4 et une perte de développement mâle. (D'après Jameson et al., 2012).



## **I.2. Différenciation des cellules germinales dans la gonade mâle**

Les CGs chez les mâles (XY) et les femelles (XX) ne sont initialement pas différentes, ni par leur morphologie, ni par leur comportement avant la colonisation des crêtes génitales. Par contre, elles devront ensuite se différencier conformément au génotype de l'individu afin d'établir les gamètes spécifiques de chaque sexe, et permettre ultérieurement la fécondation. La différenciation des CGs (cellules bipotentielles) est contrôlée par le génotype sexuel et leur environnement somatique.

Chez les mammifères, la voie mâle est activée par le gène Sry (Sex-Determining Region of Y chromosome) qui est porté par le chromosome Y. L'expression de ce gène est détectée à 10,5 jpc chez les embryons mâles dans les précurseurs des cellules de Sertoli. Sry déclenche une cascade d'événements moléculaires entre 11,5 et 13,5 jpc parmi lesquels l'expression du gène Sox9 (Sry-box containing gene 9), puis celle de l'AMH (Anti-Müllerian Hormone) synthétisée par les cellules de Sertoli.

Ces cellules vont contribuer à former la paroi des cordons séminifères au sein desquels sont incluses les CGs. La différenciation testiculaire s'accompagne de la différenciation d'un deuxième type de cellules somatiques : les cellules de Leydig qui synthétisent la testostérone (Parma et Radi, 2012).

D'autres acteurs comme FGF9 (Fibroblast Growth Factor 9) ou son récepteur FGFR2 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2) sont impliqués dans la différenciation testiculaire. En effet, l'inactivation de Fgf9 ( $Fgf9^{-/-}$ ) ou de Fgfr2 ( $Fgfr2^{-/-}$ ) chez les embryons XY conduit à une inversion sexuelle mâle-femelle. De plus, en absence de FGF9 ou de FGFR2, WNT4 (Wingless-related MMTV integration site 4) qui s'exprime lors de la différenciation ovarienne, s'exprime dans les gonades XY à environ 12,5 jpc. FGF9 réprime l'expression de Wnt4, ce qui suggère que FGF9 est un médiateur de la répression des gènes féminins. Donc, FGF9 et SOX9 semblent agir dans une boucle « feed-forward » pour renforcer l'expression de Sox9 et réprimer l'expression de Wnt4 (Figure 6) (Jameson et al., 2012).

Une différence importante entre la différenciation des voies femelle et mâle (ovaire et testicule) est notamment le moment de l'entrée en méiose. Cette différence majeure est observée à 13,5 jpc (Ewen et Koopman, 2010). Dans le testicule, les CGs vont subir un arrêt dans leur cycle cellulaire mitotique (quiescence), elles restent en phase G0/G1 du cycle cellulaire jusqu'à la naissance où elles reprennent la mitose et n'entrent en méiose qu'après la

naissance à la puberté. Dans l'ovaire, les CGs entrent en méiose à un stade précoce avant la naissance (Ewen et Koopman, 2010; Koubova et al., 2006).

L'entrée en méiose va mettre en jeu l'Acide Rétinoïque (AcR). Chez les vertébrés, la biosynthèse de l'AcR implique des étapes d'oxydation du rétinol qui est transformé en rétinaldéhyde puis en AcR. La production d'AcR à partir de rétinaldéhyde est contrôlée par une famille d'enzymes appelées ALDHs (Aldehyde deshydrogenase) comme ALDH1A1 (aussi appelée RALDH1), ALDH1A2 (aussi appelée RALDH2) et ALDH1A3 (aussi appelée RALDH3) (Taimi et al., 2004).

L'AcR tout trans est produit dans le mésonéphros par la RALDH2 qui s'exprime fortement dans les tubules mésonéphrétiques. L'AcR agit comme ligand d'une famille de récepteurs nucléaires pour l'AcR (RARs), comprenant trois isotypes (RAR- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\gamma$ ), qui se fixent sur des éléments de réponse à l'AcR (RAREs) dans les régions régulatrices de gènes cibles (Koubova et al., 2006).

L'inactivation homozygote de *Stra8* conduit à une infertilité des individus XY dont les gonades sont plus petites (Baltus et al., 2006). En effet, chez les mâles déficients en *Stra8*, les CGs restent bloquées au stade pré-leptotène après la naissance. La formation des cassures doubles-brins dans les chromosomes homologues ainsi que la recombinaison méiotique, sont absentes dans ces cellules qui dégénèrent ensuite par apoptose (Anderson et al., 2008). La culture de gonades fœtales XY en présence d'AcR, induit la méiose si elles sont prélevées à 11,5 jpc, mais pas si elles sont prélevées à 13,5 jpc (Trautmann et al., 2008). *Stra8* est exprimé dans les deux cas, ce qui suggère que le produit de ce gène est nécessaire mais pas suffisant pour l'entrée en méiose.

Lors de la méiose, au cours de la première division dite réductionnelle, vont avoir lieu pendant la prophase des mécanismes permettant des modifications chromosomiques. Ces mécanismes font partie des recombinaisons génétiques qui ont été beaucoup étudiés chez la levure. Ils font intervenir plusieurs gènes dits «de méiose» qui sont fortement conservés au cours de l'évolution et sont utilisés comme marqueurs de la division méiotique : *Dmc1*, *Scp3* et *Spo11* (sporulation).

DMC1 est une recombinase spécifique de la méiose qui présente des homologies avec la protéine bactérienne *Rec A*. Cette enzyme intervient dans l'appariement homologue (synapsis) et l'échange d'ADN entre les chromosomes (crossing-over) (Pittman et al., 1998).

Les souris *Dmc1<sup>-/-</sup>*, mâles et femelles, sont stériles avec arrêt de la gamétogénèse au stade de la première prophase méiotique. Chez ces mutants, les gonades des deux sexes sont plus petites car les cellules dégèrent ensuite par apoptose (Pittman et al., 1998).

SCP3 est un complexe protéique qui permet l'appariement des chromosomes homologues lors du stade zygotène de la prophase I. Les souris mâles porteuses d'une invalidation du gène *Scp3* sont stériles suite à une perte de spermatogonies par apoptose (Yuan et al., 2000).

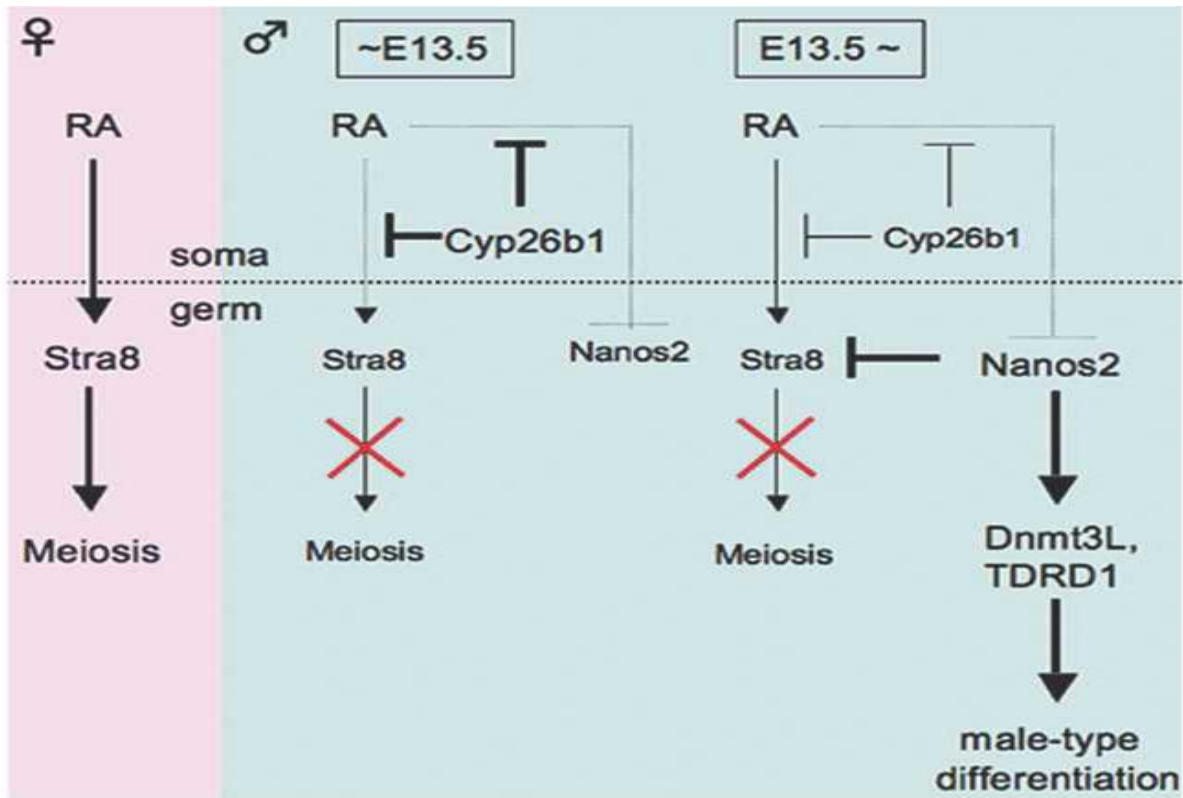
SPO11 est nécessaire lors de la formation des cassures doubles-brins dans les chromosomes homologues appariés. Une délétion de *Spo11* entraîne un défaut de méiose et une infertilité des souris. Des erreurs de recombinaison apparaissent et conduisent à un arrêt du cycle cellulaire et/ou à l'apoptose avant la première division (Baudat et de Massy, 2004).

### **I.2.1. Inhibition de l'entrée en méiose**

L'entrée en méiose est évitée, dans les testicules embryonnaires, par l'action de facteurs qui sont appelés MIS/MIF (Meiosis-Inhibiting Substance/Factor), ou MPS (Meiosis-Preventing Substance).

L'AcR peut être dégradé sous l'effet de cytochromes P450, appartenant à la famille CYP26, qui convertissent spécifiquement l'AcR en métabolites moins actifs et plus polaires, donc plus facilement excrétables. Deux membres distincts de cette famille, CYP26A1 et CYP26B1 ont été caractérisés chez plusieurs espèces. Un autre membre de la famille P450 a été détecté, CYP26C1, qui n'est pas largement exprimé chez l'adulte, mais inductible par l'AcR dans la lignée HPK1a, lignée transformée de kératinocytes humains (Taimi et al., 2004).

Au cours du développement embryonnaire, la diffusion de l'AcR émanant des régions de synthèse mésonéphrétiques est limitée par l'expression de l'enzyme CYP26B1 (Bowles et Koopman, 2012). Les transcrits *Cyp26b1* sont détectés dans les gonades embryonnaires des deux sexes à 11,5 jpc, et deviennent mâle-spécifiques à 12,5 jpc. *Cyp26b1* est exprimé dans les cellules somatiques du testicule et atteint son maximum à 13,5 jpc. Dans les testicules fœtaux, quand le gène *Cyp26b1* est invalidé (*Cyp26b1<sup>-/-</sup>*) une augmentation d'AcR est observée, conduisant les CGs à entrer en méiose précocement, au même stade que dans un ovaire.



**Figure 7 : Modèle de différenciation sexuelle des cellules germinales chez la souris.**

A gauche, chez la femelle, la signalisation de l'AcR déclenche l'initiation de la méiose par l'induction de l'expression Stra8 dans les cellules germinales femelles (rose).

Au milieu, dans les testicules embryonnaires, Cyp26b1 en dégradant l'AcR, supprime l'entrée en méiose des gonocytes mâles et fournit les conditions nécessaires pour l'expression de Nanos2 jusqu'à 13.5 jpc (bleu).

A droite, après que l'expression de Cyp26b1 ait diminuée, Nanos2 inhibe l'initiation de la méiose par suppression l'expression de Stra8 et induit la différenciation de type mâle, qui est indiquée par la présence de la Dnmt3L et TDRD1 (bleu). (D'après Suzuki et Saga., 2008).

Ces observations suggèrent que CYP26b1 est un facteur (MIF) inhibant la méiose dans le testicule au cours du développement (Bowles et Koopman, 2012; MacLean et al., 2007).

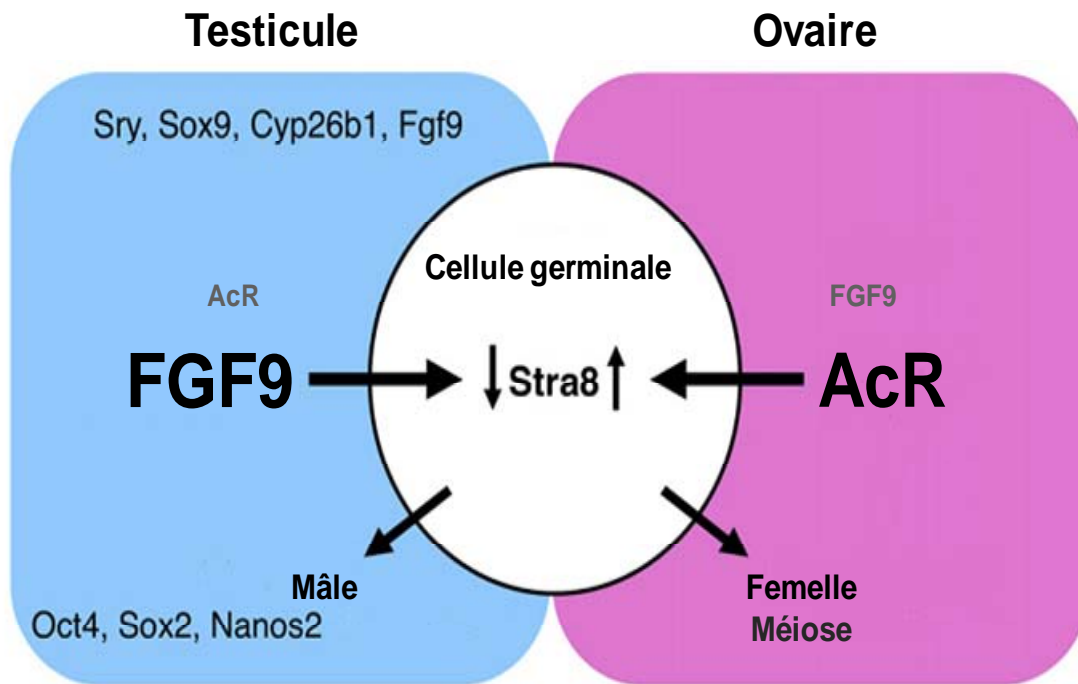
Dans la gonade XY, la dégradation d'AcR par CYP26b1 empêche l'expression de *Stra8* (Stimulated by retinoic acid gene 8), un marqueur préméiotique impliqué dans la réplication de l'ADN avant la méiose, dont l'expression est détectée à 12,5 jpc dans la gonade XX. En culture organotypique, la présence de Kétoconazole (un inhibiteur non-spécifique des cytochromes P450) permet en bloquant l'effet de CYP26B1 d'observer l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose dans la gonade XY (Figure 7).

*Nanos2* code une protéine de liaison à l'ARN (RNA binding-protein). Ce gène n'est exprimé que dans les CGs mâles à partir d'environ 13,5 jpc, c'est-à-dire au moment où les CGs entrent en méiose dans les gonades femelles. Cela a conduit à émettre l'hypothèse que *Nanos2* pourrait être impliqué dans l'inhibition de l'entrée en méiose des CGs mâles. Cette hypothèse a été confirmée par le fait que dans les embryons de souris mâles *Nanos2*<sup>-/-</sup>, les CGs entrent en méiose peu avant de dégénérer par apoptose à 15,5 jpc (Suzuki et Saga, 2008).

Si en plus de *Nanos2*, on invalide *Bax* (gène pro-apoptotique) afin d'empêcher l'apoptose, on observe que les gènes codant des marqueurs de la méiose comme *Scp3* et *Dmc1* sont exprimés dans les gonocytes dans ces conditions. L'invalidation de *Nanos2* induit donc, comme l'invalidation de *Cyp26b1*, une entrée en méiose des CGs mâles.

Cependant l'expression de *Stra8* est détectée à un niveau élevé à 13,5 jpc dans les gonades *Cyp26b1*<sup>-/-</sup> mais seulement à 14,5 jpc dans les gonades *Nanos2*<sup>-/-</sup>. Ceci suggère que l'expression de *Stra8* est empêchée d'abord par la dégradation de l'AcR due à l'action de CYP26B1, puis par NANOS2 (Figure 7) (Saga, 2010). De plus, chez les souris mâles dont *Cyp26b1* est invalidé, *Nanos2* n'est pas exprimé. Cela suggère que l'AcR induit la dégradation de *Nanos2* lorsque *Cyp26b1* n'est pas exprimé (Suzuki et Saga, 2008). Dans les CGs femelles qui expriment *Nanos2* de façon ectopique, *Stra8* n'est pas exprimé et cela peut s'accompagner d'une absence d'entrée en méiose (Saga, 2010).

*Nanos2* a aussi des effets sur l'activation de la voie mâle. En effet, une analyse transcriptomique portant sur les CGs des souris mâles KO pour *Nanos2* indique outre l'augmentation des taux de transcrits de gènes de méiose, une diminution des taux de transcrits de gènes de la voie mâle (Saga, 2010). Il s'agit de gènes comme *Dnmt3L* (DNA méthyltransférase 3), *Tdrd1* (Tudor domain containing protein 1). Il y a aussi des



**Figure 8 : L'acide rétinoïque (AcR) et FGF9 agissent de façon antagoniste en déterminant le destin des cellules germinales.**

La détermination sexuelle des cellules germinales se fait par deux molécules de signalisation produites par des cellules somatiques : AcR et FGF9. Cyp26b1 et Fgf9 sont fortement exprimés dans le testicule (bleu), tandis qu'ils sont réprimés dans l'ovaire (rose). En effet, CYP26B1 dégrade l'AcR dans le testicule, tandis que dans l'ovaire, Cyp26b1 n'est pas exprimé. L'AcR est donc présent en plus grande quantité dans l'ovaire. AcR et FGF9 agissent directement sur les cellules germinales en induisant ou réprimant respectivement l'expression de Stra8. Ce dernier est important pour induire l'entrée en méiose des cellules germinales mais le mécanisme est inconnu. FGF9 maintient également l'expression de gènes marqueurs de pluripotence comme Oct4 et Sox2, et induit l'expression de gènes marqueurs de cellules germinales mâles comme Nanos2. (D'après Bowles et al., 2010).

modifications des histones spécifiques des modifications épigénétiques mises en place dans les CGs mâles (Ewen et Koopman, 2010; Saga, 2010).

L'inhibition de l'expression des gènes codant des acteurs ou des régulateurs de l'entrée en méiose se ferait par l'interaction entre Nanos2 avec les transcrits de ces gènes et leur adressage au complexe de déadénylation qui permet l'élimination de la queue polyA et la déstabilisation de ces messagers puis leur dégradation au niveau des « P-bodies » (Saga, 2010).

Un autre facteur impliqué dans l'inhibition de l'entrée en méiose des CGs mâles est FGF9 qui est exprimé par les précurseurs des cellules de Sertoli fœtales qui sécrètent ce facteur dans les cordons testiculaires vers 11,5 jpc. FGF9 agit directement sur les CGs en réprimant l'expression de Stra8 et en induisant l'expression de Nanos2 à 13,5 jpc. Dans les CGs *Cyp26b1*<sup>-/-</sup>, la mutation de *Fgf9* (suppression d'une copie) résulte en une induction ectopique de l'expression de Stra8. Ceci suggère que l'inhibition de l'entrée en méiose des CGs mâles implique deux signalisations par l'AcR et le FGF9 (Figure 8) (Bowles et Koopman, 2012; Bowles et al., 2010; Guerquin et al., 2010).

Des expériences de culture organotypique de gonades fœtales ont permis de déceler l'intervention d'autres facteurs. En effet, si un ovaire fœtal de souris est prélevé à 11,5 jpc et mis en culture en présence d'un testicule fœtal de 13,5 jpc, on observe une inhibition d'entrée en méiose des CGs XX (Guerquin et al., 2010).

Du milieu conditionné par du testicule fœtal a le même effet et des expériences de fractionnement indiquent que les molécules responsables ont un poids moléculaire supérieur à 10 kDa. CYP26B1 n'est pas responsable de cette inhibition car une co-culture effectuée en présence de l'inhibiteur kétoconazole se traduit toujours par une inhibition d'entrée en méiose. Ces résultats sont en accord avec le fait que la culture de testicule fœtal de 11,5 jpc en présence de bréfeldine A (inhibiteur des phénomènes sécrétoires et du trafic vésiculaire) s'accompagne de l'apparition de CGs XY méiotiques dans les cordons testiculaires (Best et al., 2008). La protéine transmembranaire TMEM184A, qui est associée aux endosomes et a une fonction sécrétoire dans les cellules de Sertoli pourrait être impliquée dans ces phénomènes car son expression ectopique dans les crêtes génitales XX empêche les gonocytes d'entrer en méiose (Svingen et al., 2009).

### **I.2.2 Entrée en quiescence (arrêt mitotique)**

Afin de caractériser l'état de quiescence des CGs XY, des auteurs ont étudié l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Il a été observé une activation des protéines P27<sup>kip1</sup>, P15<sup>INK4b</sup> et P16<sup>INK4a</sup>, qui régulent l'activité des complexes cycline-CDK comme Cycline D/CDK4/6 et Cycline E/CDK2 (Western, 2009).

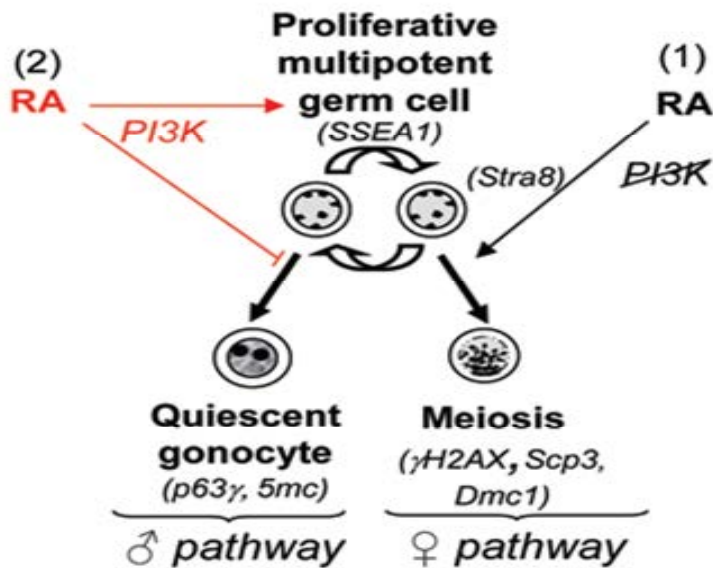
En inhibant ces complexes, ils empêchent la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (RB) La protéine RB s'associe au facteur de transcription E2F qui est impliqué dans la transcription des gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN. Lorsque RB est phosphorylée de manière complète par les complexes Cycline/CDK, cela entraîne une modification de conformation permettant la libération d'E2F qui stimule la prolifération cellulaire. RB est détectée à un niveau plus élevé dans les CGs mâles entre 12,5 et 15,5 jpc (Western, 2009).

RB est hyperphosphorylée à 12,5 jpc mais elle est hypophosphorylée dès 13,5 jpc. Les souris XY invalidées pour ce gène meurent, *in utero*, à environ 14,5 jpc. De ce fait, le rôle de RB dans la régulation de l'arrêt mitotique des CGs dans la gonade XY a été étudié par dans un système de culture *ex-vivo*. Après 48h de culture, les gonades XY de 14,5 jpc invalidées pour Rb présentent un nombre plus élevé de CGs (19%). L'arrêt mitotique en G0/G1 n'est observé qu'à 16,5 jpc, suite à une augmentation de l'expression des gènes Cdkn1b et Cdkn2b inhibiteurs de CDK (Spiller et al., 2010). Ainsi, RB semble nécessaire pour contrôler l'arrêt mitotique des CGs à 14,5 jpc dans la gonade XY.

La présence des facteurs MAF (Mitotic Arrest Factors) induirait l'entrée en quiescence des CGs dans le testicule (Guerquin et al., 2010). Les expériences de co-culture entre un ovaire fœtal de 11,5 jpc et un testicule fœtal de 13,5 jpc révèlent que les CGs XX prolifèrent moins dans ces conditions (marquage avec des anticorps anti-PCNA). Si l'on associe les CGs XX avec des cellules somatiques de type cellules de Sertoli (sélectionnées grâce à l'expression de l'intégrine  $\alpha 6$ ), on n'observe pas cette inhibition de prolifération. Par contre si les CGs XX sont associées à des cellules mésenchymateuses (sélectionnées grâce à l'expression de la neurotrophine p75), cette inhibition a lieu.

Hbp1 (HMG box containing protein1) pourrait être un facteur MAF. Ce facteur de transcription est exprimé spécifiquement dans les CGs mâles vers 12,5 jpc, au début de l'arrêt mitotique. La régulation de *Hbp1* est associée avec la prolifération et la différenciation des





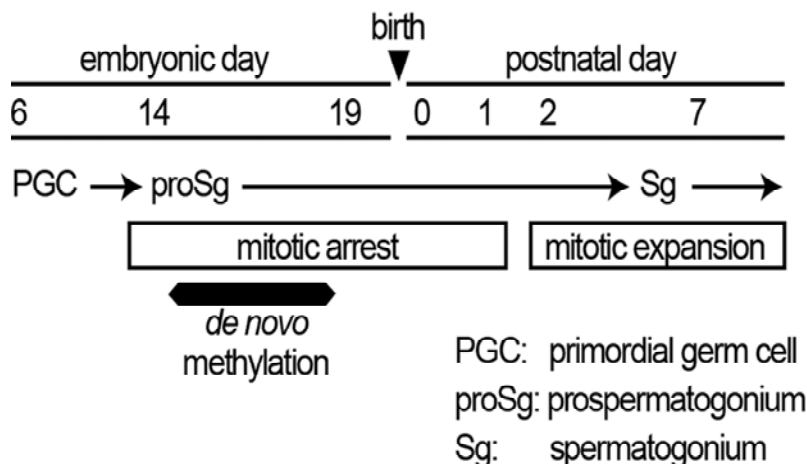
**Figure 9 : Effets de l'AcR sur les cellules germinales fœtales.**

Les deux rôles proposés pour l'AcR dans le développement et la détermination sexuelle des CGs. (1) L'AcR stimule l'initiation de la méiose ; cet effet dépend de Stra8 mais pas de la PI3K. (2) L'AcR empêche les CGs d'entrer en quiescence, cet effet dépend de PI3K.

Les CGs multipotentes expriment des marqueurs de cellules indifférenciées comme SSEA-1, et prolifèrent activement à partir de 11,5 jpc.

Dans le testicule, à partir de 13,5 jpc, la dégradation d'AcR dirige les gonocytes vers la quiescence et vers la voie mâle.

Dans l'ovaire, la concentration élevée d'AcR maintient la prolifération des cellules germinales, augmente l'expression de Stra8 et induit l'entrée en méiose conduisant ces cellules vers la voie femelle. (D'après Trautmann et al., 2008).



**Figure 10 : Chronologie du développement des CGs mâles.**

Dans le testicule fœtal, Les cellules germinales primordiales deviennent des prospermatogonies qui subissent l'arrêt mitotique et une méthylation *de novo* sur des sites CpG. La reprise des mitoses a lieu peu après la naissance où apparaissent les spermatogonies. (D'après Ichiyanagi et al., 2013).

CGs mâles, et la régulation du cycle cellulaire ou l'arrêt mitotique. Plus précisément, la phosphorylation de cette protéine par les p38MAPK entraîne sa stabilisation, ce qui résulte en l'arrêt en G1 (Ewen et Koopman, 2010).

Les travaux de Trautmann et al., montrent que la diminution des taux d'AcR dans le testicule fœtal est nécessaire pour l'entrée en quiescence des CGs mâles (Trautmann et al., 2008). L'AcR ou l'inhibition de CYP26B1 empêchent l'entrée en quiescence. L'AcR agirait par le biais de la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K). *In vivo*, ces auteurs montrent aussi que l'administration d'AcR à 13,5 jpc maintient la prolifération des CGs XY (Figure 9).

Au moment de l'entrée en quiescence, les CGs n'expriment plus les marqueurs de cellules indifférenciées comme SSEA-1, alors que ces cellules expriment de nouveaux marqueurs spécifiques comme P63 $\gamma$ , un membre de la famille P53, et elles possèdent un taux élevé de méthylation de l'ADN (5mC) (voir paragraphe suivant) (Figure 9). Si des testicules fœtaux sont cultivés en présence d'AcR, l'entrée en quiescence est inhibée et les CGs continuent à exprimer SSEA-1 et les modifications épigénétiques ne sont pas mises en place.

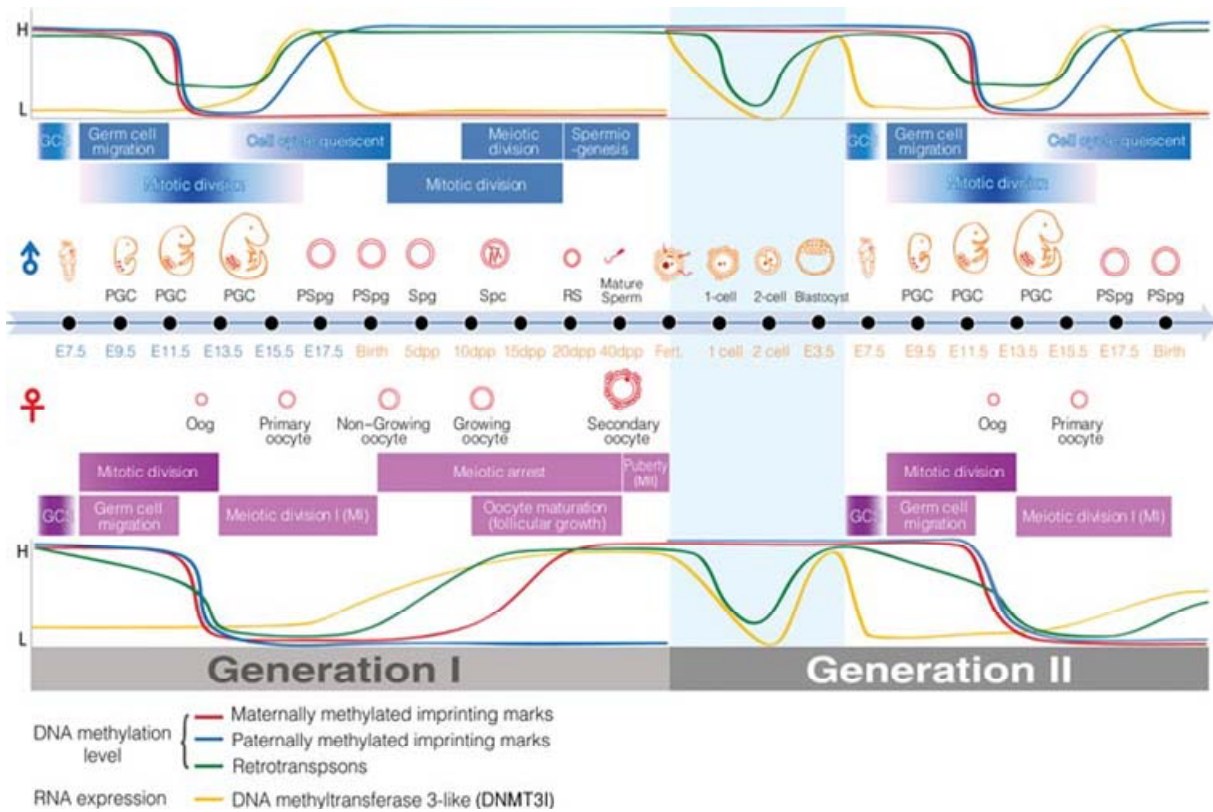
### **1.2.3. Modifications épigénétiques**

Après leur arrivée dans les crêtes génitales, les CGs qui avaient déjà commencé à subir une déméthylation de l'ADN voient ces modifications épigénétiques se poursuivre. Ces changements semblent être associés à des modifications de morphologie nucléaire à 11,5 jpc : le noyau s'agrandit et il y a une perte de chromophores détectables (Ewen et Koopman, 2010).

Cela est associé à la perte de l'histone H1. La morphologie nucléaire est de nouveau normale à 12,5 jpc. Une analyse par séquençage au bisulfite a permis de quantifier les taux de 5mC à 13,5 jpc : il est de 73% dans l'embryon complet mais seulement de 16,5% dans les CGs du testicule (il n'est que de 7,8% dans les CGs XX) (Popp et al., 2010).

Il y a également une perte des modifications des histones comme H3K9me3 et H3K27me3. Cela est associé à une augmentation des chaperones d'histones NAP-1 (nucleosome assembly protein 1) et HIRA dans le noyau des CGs (Weaver et al., 2009). Ces modifications épigénétiques font que les gènes soumis à empreinte deviennent bialléliquement exprimés, et que les transposons sont aussi exprimés.

Dans les étapes ultérieures du développement, toujours lors de la quiescence, les prospermatogonies subissent une méthylation *de novo* (Figure 10). L'empreinte génomique



**Figure 11 : Reprogrammation épigénétique des CGs chez la souris.**

Les lignes rouge/bleu indiquent le niveau de méthylation de l'ADN pour les gènes à empreinte maternelle et paternelle respectivement. La ligne verte indique la méthylation des rétrotransposons. La ligne jaune correspond au taux de messagers Dnmt3L. La région ombrée en bleu correspond à des stades préimplantatoires. La situation mâle est indiquée en haut, la situation femelle en bas, avec deux générations successives.

La déméthylation de l'ADN dans les CGs commence lors de la migration des CGPs et le niveau de méthylation global chute rapidement lorsque les CGPs sont arrivées dans les gonades. Les transcrits de DNMT3L ne peuvent pas être détectés au cours de la spécification ou de la migration des CGs.

Dans les CGs chez les mâles et femelles, la méthylation de l'ADN *de novo* coïncide avec l'augmentation du taux d'ARNm de DNMT3L. Chez les embryons mâles, ces processus commencent à partir de 15,5 jpc et atteignent leur apogée à environ 17,5 jpc. Comparativement, chez les embryons femelles, dans les CGs, ces processus sont détectés à environ 6 jpp, et sont continuellement observés dans tous les ovocytes développés. Pour chaque vague de folliculogénèse, la méthylation *de novo* de l'ADN a lieu dans les ovocytes en croissance.

Le niveau d'expression de DNMT3L est élevé dans l'œuf fécondé mais chute considérablement pendant la segmentation. Le niveau d'expression réaugmente au stade blastocyste.

PCG : cellules germinales primordiales ; PSg : prospermatogonies ; Spg : spermatogonies ; Spc : spermatocytes ; RS : spermatides rondes ; Oog : ovogonies ; E : jour embryonnaire ; dpp : day post-partum ; jpc : jour post-coïtum. (D'après Liao et al., 2012).

paternelle semble être imposée lors de cette période car les noyaux des CGs affichent une forte méthylation à partir de 16,5 jpc (Trautmann et al., 2008). La région de contrôle de l’empreinte (imprinting control region ou ICR) du gène H19 qui est soumis à empreinte paternelle n’est pas méthylée entre 12,5 et 13,5 jpc mais elle le redevient entre 14,5 et 15,5 jpc (Weaver et al., 2009).

Des études ont été menées sur les ADN méthyl-transférases. DNMT3L (qui n’a pas d’activité catalytique mais coopère avec d’autres DNMT) est exclusivement exprimée dans les CGs et présente des profils d’expression sexuellement dimorphiques. Elle interagit sélectivement avec l’histone H3 uniquement lorsque celle-ci est déméthylée sur la lysine 4 (Weaver et al., 2009).

Chez les embryons XY elle s’exprime à compter de 12,5 jpc avec un pic à 15,5 jpc ; elle reste fortement exprimée jusqu’à la naissance. Chez les embryons de souris DNMT3L<sup>-/-</sup>, on observe un défaut de reméthylation de l’ADN qui permet notamment l’expression des rétrotransposons LINE-1 et IAP. Les gènes porteurs d’une empreinte paternelle comme *H19*, *Rasgrfl*, et *Dlk1/Gtl2* ainsi que dans la plupart des classes d’éléments d’ADN répétitives ne sont pas reméthylés dans les CGs mâles déficientes en DNMT3L (Niles et al., 2011). L’analyse des profils d’expression des différents régulateurs épigénétiques tout au long de la reprogrammation, montre que ceux de DNMT3L est en parfaite adéquation avec le calendrier de méthylation *de novo* de l’ADN (Figure 11) (Liao et al., 2012).

On n’observe pas non plus la méthylation des histones.

Des embryons déficients en DNMT3A montrent un phénotype identique au précédent alors que l’inactivation de DNMT3B n’entraîne aucun défaut (Godmann et al., 2009).

Les embryons déficients en DNMT1, qui est une méthylase d’entretien, meurent précocement en raison d’une perte globale de méthylation de l’ADN. Cependant, dans le testicule fœtal, l’expression de cette enzyme est corrélée avec l’état de prolifération des CGs : son expression cesse lors de l’acquisition de la méthylation *de novo* par les cellules en quiescence (Godmann et al., 2009).

Cette méthylation *de novo* peut aussi se faire sur des sites différents des îlots CpG (Ichiyanagi et al., 2013). Ces sites seront progressivement déméthylés lorsque les spermatogonies

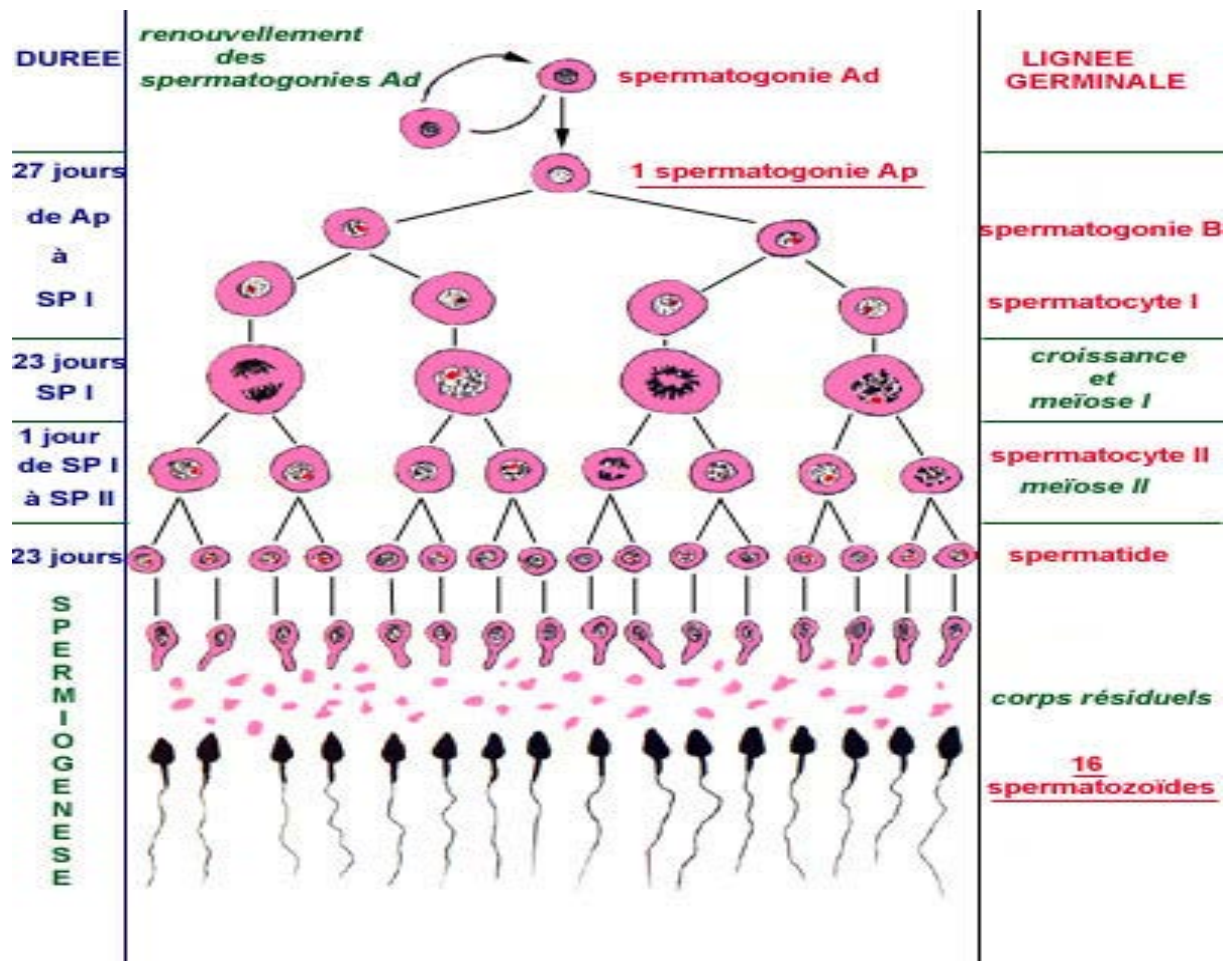


Figure 12 : Schéma des différentes étapes de la spermatogénèse.

proliféreront après la naissance contrairement aux sites CpG dont la méthylation sera maintenue.

A propos du phénomène d’empreinte, les marques épigénétiques sont rétablies dans les CGs mâles avant la naissance lorsqu’elles sont quiescentes mais dans la lignée germinale femelle, cela surviendra après la naissance (Weaver et al., 2009).

Le développement prénatal des CGs est donc une période essentielle pour l’acquisition de la méthylation de l’ADN et les CGs mâles peuvent être extrêmement sensibles à une exposition maternelle à des produits environnementaux toxiques et aux restrictions alimentaires (Niles et al., 2011).

### **I.3. La spermatogénèse**

La spermatogénèse se déroule en trois phases : la prolifération des spermatogonies (cellules germinales souches diploïdes) par mitoses dont la dernière division conduit à la formation des spermatocytes au stade préleptotène, la méiose au cours de laquelle un spermatocyte donne quatre spermatides rondes haploïdes, et la différenciation des spermatides en spermatozoïdes ou spermiogénèse (Carreau et al., 2012; Majumdar et Bhattacharya, 2013; Perrard et al., 2010). Un cycle spermatogénétique dure environ 74 jours chez l’homme, et l’on obtient 16 spermatozoïdes à partir d’une spermatogonie (Figure 12) (Thibault et Levasseur, 2001).

C’est sur la membrane basale des tubes séminifères contournés que se trouve la population des cellules souches de la lignée germinale. Ce sont les spermatogonies de type Ad (à cytoplasme sombre), qui se divisent tout d’abord par mitose : une des cellules filles renouvelle le stock des spermatogonies de type Ad, l’autre devient une spermatogonie de type Ap (cytoplasme pâle). Cette spermatogonie se divise à son tour, donnant naissance à deux spermatogonies B. Chacune se divise pour donner 2 spermatocytes I.

Ensuite, les spermatocytes I qui ont répliqué leur ADN s’engagent dans le processus méiotique qui comporte deux divisions (méiose I et méiose II). Pendant la prophase I, des échanges de chromatides ont lieu entre les chromosomes homologues afin d’assurer un brassage génétique. Cette première division est qualifiée de division réductionnelle car elle permet de réduire de moitié le nombre de chromosomes (on passe de  $2n$  chromosomes à 2

chromatides à  $n$  chromosomes à 2 chromatides). Après la première division de méiose, on obtient deux spermatocytes II.

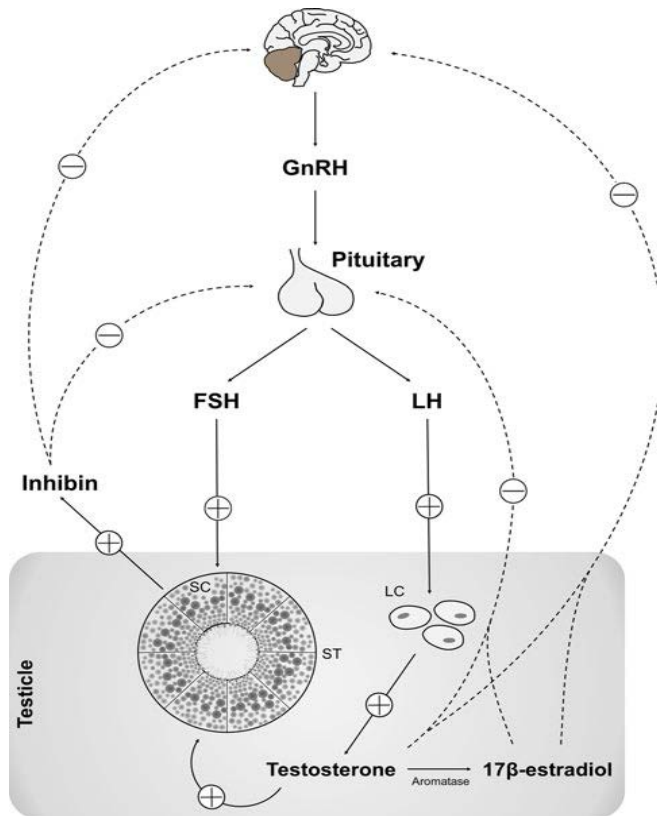
La deuxième division de méiose est une division équationnelle qui ressemble fortement à la mitose. Les spermatocytes II donnent chacun deux spermatides (cellules haploïdes avec  $n$  chromosomes à 1 chromatide) après la seconde division.

Enfin, lors de la spermiogenèse, les spermatides subissent de nombreuses modifications pour se différencier en spermatozoïdes (Figure 12) (Phillips et al., 2010; Thibault et al., 1998). Cette dernière phase est un processus long qui peut également être divisé en plusieurs étapes, 19 chez le rat, 6 chez l'homme. Au cours ces étapes, les spermatides subissent des modifications morphologiques et biochimiques, comme la mise en place du flagelle, la formation de l'acrosome et l'allongement du noyau, pour devenir des spermatozoïdes matures. Une grande partie du cytoplasme a été également éliminée progressivement et la chromatine s'est condensée avec remplacement des histones par les protamines (Carreau et al., 2012; Hunter et al., 2012).

Au cours de la spermatogénèse surviennent aussi des modifications épigénétiques. Par exemple, l'état de méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 varie par vagues associées à des événements de remodelage de la chromatine. Elles apparaissent dans les spermatogonies au stade leptotène puis sont down-régulées au stade pachytène et on observe une brève réapparition au stade spermatide allongée (Godmann et al., 2009).

L'expression de l'histone déméthylase AOF2/KDM1 coïncide avec cela. Les histones constituant le noyau des nucléosomes sont acétylées dans les spermatocytes au stade préleptotène et les spermatides allongées mais elles sont déacétylées pendant la méiose et dans les spermatides rondes. Cette modification serait essentielle pour l'échange histones/protamines. Des souris ayant subi une double invalidation des gènes codant les histones méthyl transférases SUV39H1 et H2 (H3K9 triméthyl transférases) présentent des défauts importants de spermatogénèse (Godmann et al., 2009).

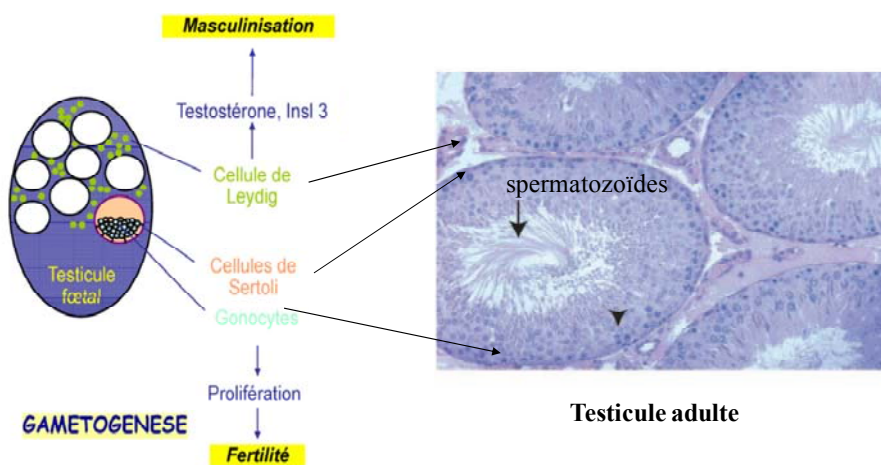
Les profils de méthylation de H3K9 sont perturbés dans les spermatogonies B et dans les premiers stades de méiose. Des souris dont les cellules germinales sont déficientes en la H3K9 mono et diméthyl transférase G9A/EHMT2 ne sont pas fertiles, la spermatogénèse



**Figure 13: Schéma simplifié de l'axe hypothalamus-hypophyse-testiculaire**

Les deux hormones hypophysaires, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), sont responsables de la liaison entre le cerveau et le testicule. La production d'inhibine par les cellules de Sertoli (Sertoli Cells, SC) et de testostérone (T) par les cellules de Leydig (Leydig Cells, LC). Ces deux hormones exercent un rétrocontrôle négatif le cerveau qui se traduit par une réduction de libération de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) par l'hypothalamus, ce qui réduit la production de LH et de FSH par l'hypophyse. Ces hormones contrôlent la spermatogenèse. (D'après Alves et al., 2013).

#### STEROIDOGENESE



**Figure 14 : Ontogenèse des deux fonctions testiculaires pendant la vie fœtale.**  
(D'après Rouiller-Fabre et al., 2008).



étant bloquée à des stades précoces avec des problèmes de formation des complexes synaptonémaux (Godmann et al., 2009).

Chez les souris  $Dnmt3L^{-/-}$ , les CGs ne peuvent progresser dans la première vague de spermatogénèse et on observe leur arrêt au stade zygotène avec un défaut de synapsis des chromosomes. Il en va de même pour l'inactivation de  $Dnmt3A$  mais il n'y aurait qu'un ralentissement de l'entrée en méiose ; celle-ci se déroule cependant normalement lorsqu'elle a débuté (Yaman et Grandjean, 2006).

Ces étapes se déroulent au sein de l'épithélium séminifère où les cellules de Sertoli assurent un rôle de support architectural, de protection et de nutrition des CGs, de régulation de la spermatogénèse. Ces cellules réalisent aussi la phagocytose des CGs surnuméraires ou anormales et des corps résiduels des spermatides (Perrard et al., 2010). Les cellules de Sertoli adhèrent aux CGs et forment un épithélium extrêmement complexe, dans lequel il y a plusieurs jonctions, serrées et adhérentes. Ces jonctions intercellulaires jouent un rôle important dans la spermatogénèse : elles permettent la mise en place d'une barrière hémato-testiculaire, et régulent l'emplacement des CGs et leur mouvement vers la lumière au cours la différenciation (Hunter et al., 2012; Perrard et al., 2010).

La spermatogénèse est régulée par les gonadotropines hypophysaires (la luteinizing hormone (LH) et la follicle-stimulating hormone (FSH), elles-mêmes sécrétées sous l'influence de la gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) hypothalamique (Figure 13). Ces hormones vont influencer les cellules somatiques testiculaires (cellules de Leydig, cellules péricubulaires, cellules de Sertoli) qui sécréteront à leur tour des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines (Figure 14) (Perrard et al., 2010).

Les cellules de Sertoli régulent la survie des CGs en sécrétant des facteurs trophiques paracrines comme IGF (Insulin like Growth Factor), NGF (Nerve Growth Factor), GDNF (Glial cell derived neurotrophic factor) et SCF (Stem Cell Factor). De plus, les cellules de Sertoli sécrètent un facteur qui entraîne la régression des canaux de Müller chez les embryons XY (l'hormone anti-müllérienne ou AMH) (Rouiller-Fabre et al., 2008).

L'apoptose des CGs semble être contrôlée par les niveaux des hormones dont la testostérone, l'œstradiol et la FSH. Les cellules de Leydig qui sont situées entre les tubes séminifères produisent des hormones de masculinisation : la testostérone et l'Insl 3 (Insulin like factor 3) (Thibault et al., 1998).

La testostérone joue un rôle essentiel dans le contrôle de la méiose et la différenciation des spermatides. Elle agit sur les cellules de Sertoli qui expriment le récepteur des androgènes et stimule la synthèse de diverses protéines et de facteurs trophiques dans des périodes spécifiques de la spermatogénèse (Lagos-Cabré et Moreno, 2012).

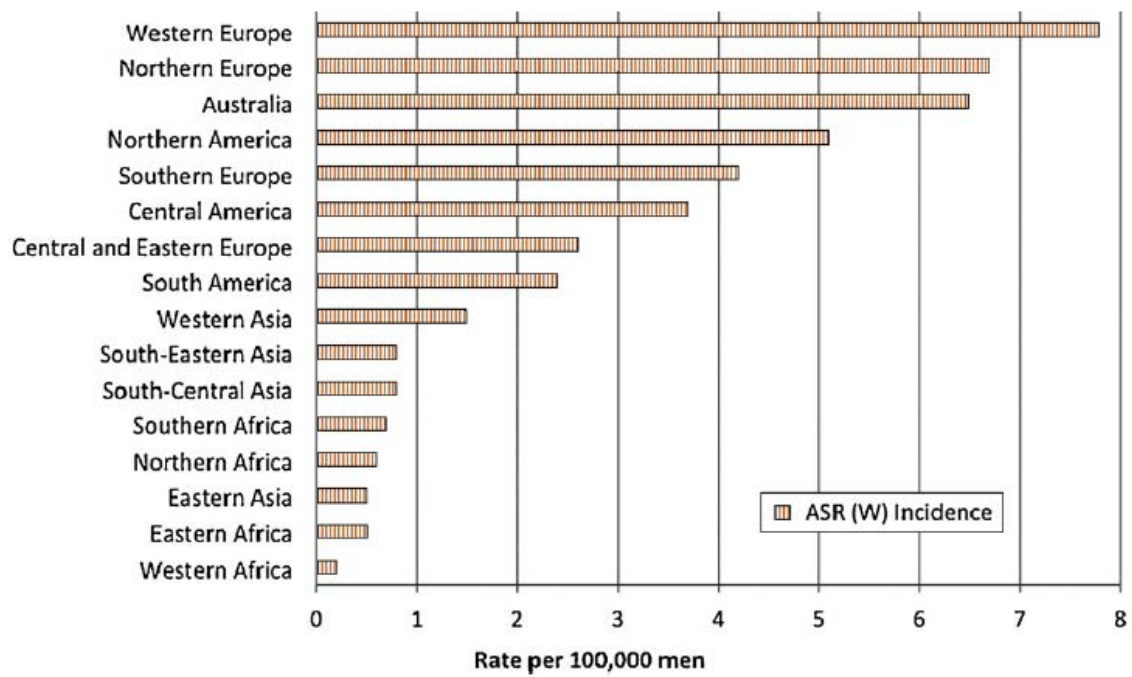


Figure 15 : Incidence du cancer testiculaire dans le monde. (Rosen et al., 2011).

## **II. Les cellules germinales cancéreuses**

A côté des aspects normaux de leur développement et de leur différenciation que nous venons de décrire, les cellules germinales peuvent aussi être à l'origine de pathologies et notamment de cancer testiculaire. Nous aborderons ici successivement des aspects épidémiologiques de ces cancers, leur diagnostic, leur classification, leur traitement et leur origine.

### **II.1. Epidémiologie des cancers testiculaires**

Le cancer testiculaire ne représente que 1% environ de tous les cancers masculins (selon l'American Cancer Society, 2009). La majorité des patients atteints d'un cancer testiculaire ont entre 15 et 44 ans au moment du diagnostic, 18% ont plus de 45 ans et 7% ont plus de 55 ans (Verhoeven et al., 2013). Il s'agit de la tumeur la plus souvent diagnostiquée chez l'homme entre 15 et 44 ans.

En France, le nombre de nouveaux cas estimés en 2012 est 2317 (Rébillard et al., 2013). Le taux d'incidence standardisé est de 7,2 et le pic d'incidence est atteint pour la classe 30-34 ans. L'analyse des données de la base GLOBOCAN en 2008 indique que l'incidence du cancer testiculaire est plus élevée en Europe de l'ouest (7,8%), en Europe du nord (6,7%), en Australie (6,5%) et en Amérique du nord (5,1%) (Rosen et al., 2011). L'Europe du sud et l'Amérique centrale présentent des taux d'incidence légèrement inférieurs (4,2 et 3,7% respectivement). L'incidence est beaucoup plus faible en Asie (0,5–1,5%) et en Afrique (0,2–0,7%) (Figure 15).

En Europe, entre 1993 et 1997, l'incidence la plus élevée de cancer testiculaire était observée en Norvège, au Danemark, en Allemagne et en République tchèque, pays où l'augmentation de l'incidence a été importante au cours des dernières décennies. Ce groupe de pays forme un axe nord-sud dans la partie centrale et nordique de l'Europe avec un gradient nord-sud descendant. Quand on s'éloigne de cet axe à l'est ou à l'ouest, les taux diminuent (Jouannet, 2012).

Des études ont montré que l'incidence du cancer du testicule a augmenté au cours des dernières décennies dans la majorité des pays occidentaux industrialisés. En France, l'incidence de ce cancer est en augmentation depuis 1980 (+ 2,4% par an en moyenne). L'augmentation est plus modérée depuis 2005 (+ 1,6% par an). Les taux standardisés ont plus

	Année						Taux annuel moyen d'évolution (%)	
	1980	1990	2000	2005	2010	2012	De 1980 à 2012	De 2005 à 2012
<b>Incidence</b>	3,3	4,3	5,7	6,5	7,0	7,2	2,4	1,6
<b>Mortalité</b>	0,7	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	-3,5	-2,6
<b>Mortalité observée</b>	0,7	0,4	0,4	0,3	-	-	-	-

**Tableau 1 : Evolution des taux d'incidence et de mortalité concernant le cancer testiculaire en France entre 1980 et 2012.**

Il s'agit de taux standardisés monde pour 100 000 personnes-années. (Binder-Foucard et al., 2013).

que doublé entre 1980 et 2012 passant de 3,3 à 7,2 cas pour 100 000 personnes-année (Tableau 1) (Binder-Foucard et al., 2013; Rébillard et al., 2013).

Une étude comparant deux intervalles (1973-1977 et 1998-2002) indique globalement une augmentation de l'incidence du cancer testiculaire dans tous les pays européens (Chia et al., 2010). Cette augmentation est de 153% en Allemagne, 131% en Finlande, 116% en Norvège, 95% en Australie, 89% en France, 67% aux Etats-unis. L'augmentation est plus modeste en Suisse (37%) et au Danemark (31%). Elle est plus faible au Japon et en Chine avec 22 et 19% respectivement.

On observe de plus un effet cohorte, avec une incidence supérieure pour les hommes nés après 1945.

La mortalité liée au cancer testiculaire est relativement faible. En France, le nombre de décès en 2012 est de 85 et le taux de mortalité standardisé est de 0,2. Contrairement à l'incidence, la mortalité a baissé, passant de 0,7 pour 100 000 personnes-année en 1980 à 0,2 en 2012, soit une baisse de 3,5% par an en moyenne (Tableau 1) (Binder-Foucard et al., 2013). Le risque de décéder de ce cancer entre 0 et 74 ans est passé de 0,06 % pour la cohorte née en 1940 à 0,02 % pour la cohorte née en 1980.

En Europe, le taux de mortalité est passé de 0,75 à 0,32 pour 100 000 personnes entre 1980 et 2006 (Bosetti et al., 2011). Une analyse des bases européenne EUNICE (European Network for Indicators on Cancer) et américaine SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) montre que pour la période 2003–2007, la survie à 5 ans est élevée aussi bien pour les patients européens que pour les patients américains avec 96% pour ceux âgés au plus de 54 ans. Pour les patients âgés entre 55 et 64 ans, la survie à 5-semble un peu plus faible tandis que pour les patients âgés au moins de 65 ans, est clairement plus faible aussi bien en Europe qu'aux Etats-unis, avec des survie estimées à 72% et 83%, respectivement (Verhoeven et al., 2013).

## **II.2. Diagnostic**

Le cancer testiculaire touche généralement les jeunes hommes. Un symptôme précoce de cancer testiculaire est un changement dans la forme, la taille ou la texture du testicule que le patient décèle souvent lui-même à la palpation. La tumeur se présente souvent comme une masse solide, dure au niveau d'un des deux testicules. Les tumeurs bilatérales ne représentent que 1 à 2 % des cas.

D'autres symptômes peuvent inclure une accumulation de liquide dans le scrotum ou une douleur dans le testicule ou dans le scrotum. Une douleur testiculaire sera le premier symptôme dans environ 20% des cas, et 27% des hommes atteints de cancer testiculaire auront une douleur scrotale. Dans environ 10% des cas, un cancer du testicule peut imiter une orchite (orchidoepididymite ou inflammation testiculaire) (Shin et Kim, 2013; Verville, 2009). Une douleur lombaire ou du flanc est présente chez 11% des patients atteints de cancer du testicule.

Des symptômes peuvent être présents dans d'autres sites. Ainsi, une gynécomastie unilatérale ou bilatérale est trouvée dans 7% des cas.

Ces symptômes spécifiques varient selon le type de cancer (Durand et al., 2010; Verville, 2009).

L'échographie scrotale est également utilisée pour le diagnostic. Elle possède une sensibilité d'environ 100% pour le diagnostic positif de tumeur testiculaire et permet de déterminer si la masse tumorale est intra ou extra-testiculaire (Durand et al., 2010). Elle contribue aussi à examiner le testicule contralatéral.

Des marqueurs tumoraux sériques peuvent être recherchés afin d'aider non seulement au diagnostic mais aussi à la détermination du type histologique de la tumeur. Les principaux marqueurs tumoraux utilisés sont l'alpha-fœtoprotéine (AFP), l'hormone gonadotrophique chorionique (hCG) et la lactate déshydrogénase (LDH). La phosphatase alcaline placentaire (PLAP) peut être utilisée comme marqueur d'une tumeur séminomateuse pure (Shin et Kim, 2013). Une augmentation de ces marqueurs est observée dans 51% des patients atteints de cancer testiculaire.

Ce type de cancer peut se disséminer par voie lymphatique et métastaser. Un envahissement des ganglions lymphatiques des testicules qui se situent dans l'abdomen à proximité des reins

## Classification histologique du cancer du testicule

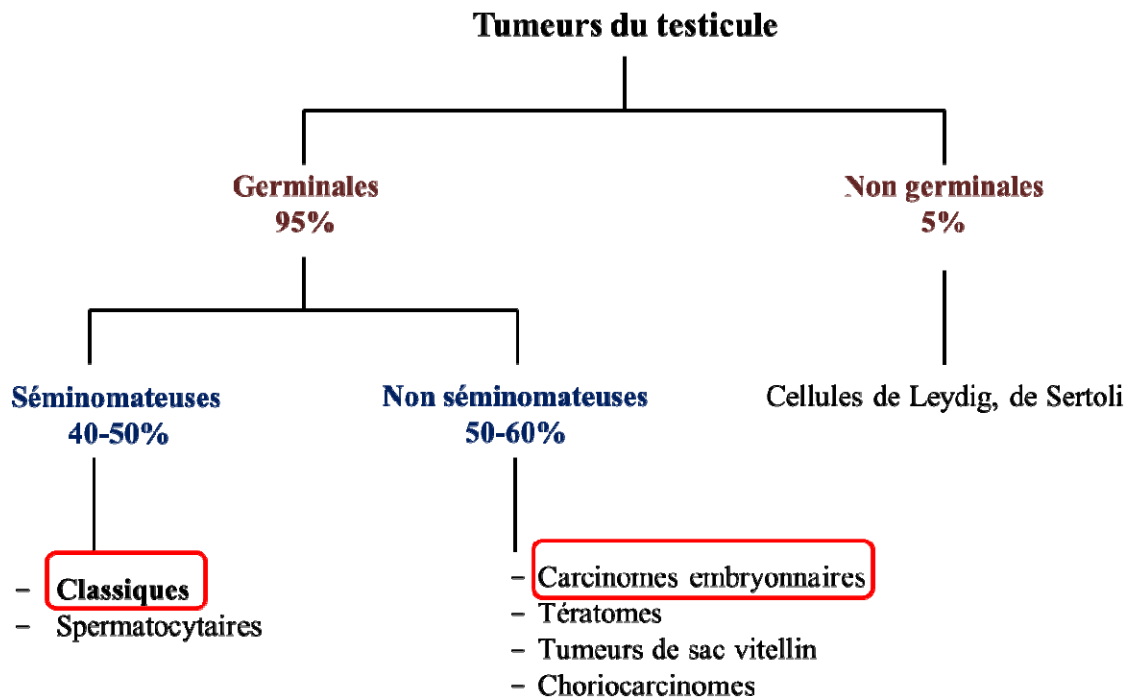


Figure 16 : Représentation schématique de la classification des différents types de tumeurs testiculaires.



(ganglions rétropéritonéaux) peut exister. L'imagerie abdominale par tomodensitométrie permet d'examiner ces ganglions. D'autres ganglions peuvent être envahis et des métastases peuvent survenir au niveau des poumons, du foie, du système nerveux, des reins et des os.

En général, un diagnostic précoce de cancer du testicule augmente les chances de guérison (Hassan et al., 2008; Verville, 2009).

En cas de diagnostic de cancer testiculaire, une ablation du testicule (orchidectomie) est pratiquée.

### **II.3. Classification des cancers testiculaires et traitement**

Une fois le testicule enlevé, l'examen anatomo-pathologique va permettre de déterminer le type exact de la tumeur, et donc le type de traitement complémentaire nécessaire après l'ablation du testicule.

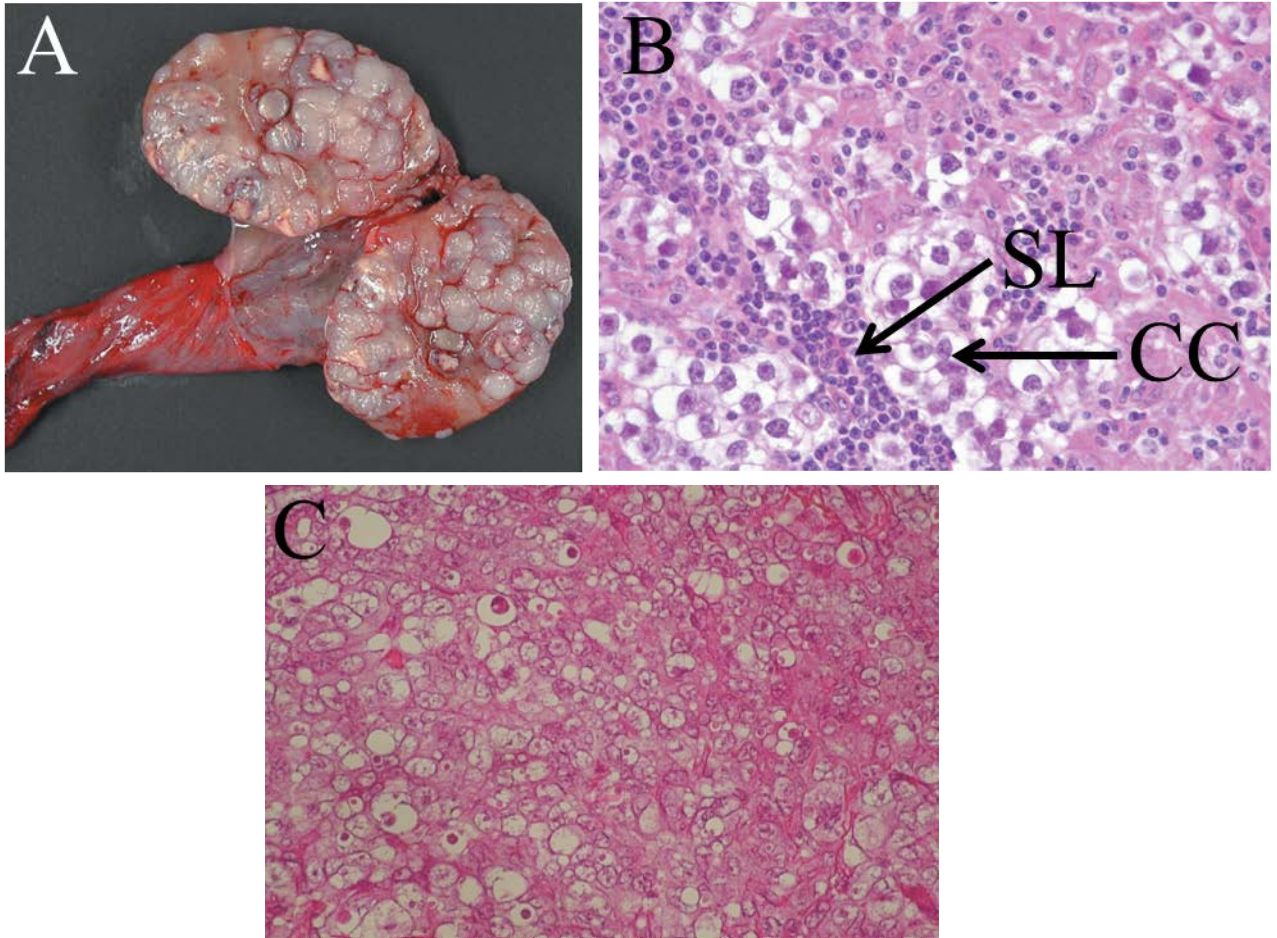
#### **II.3.1. Classification**

Dans 5% des cas, les cancers testiculaires sont d'origine non germinale (Figure 16). Parmi ces tumeurs on distingue les tumeurs de cellules de Leydig, les tumeurs de cellules de Sertoli, les rhabdomyosarcomes, les lymphomes et les carcinomes du *rete testis* (Vega et al., 2012; Verville, 2009). Elles constituent une proportion de tumeurs testiculaires plus grande chez les enfants que chez les adultes. Certaines tumeurs non-germinales sont bénignes, mais d'autres sont malignes.

Dans 95% des cas, les cancers testiculaires sont d'origine germinale (Figure 16). Les tumeurs des cellules germinales testiculaires (TGCTs) ont été classées histologiquement selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 2004. Cette classification divise les TGCTs en deux groupes : les TGCTs purs et les TGCTs mixtes.

Les TGCTs purs regroupent les tumeurs séminomateuses et les tumeurs non-séminomateuses.

Les tumeurs germinales séminomateuses représentent 30 à 40 % des cancers du testicule et surviennent majoritairement entre 35 et 45 ans. On y trouve trois catégories : les



**Figure 17 : Aspects morphologiques et histologiques de tumeurs testiculaires.**

(A) Aspect morphologique d'un séminome après orchidectomie bilatérale. (B) Coupe histologique d'un séminome. De grandes cellules à cytoplasme clair sont présentes au sein d'un stroma lymphocytaire. (C) Coupe histologique d'un carcinome embryonnaire. On observe des nappes de grandes cellules indifférenciées et polymorphes. (D'après Camparo, 2011).

séminomes typiques ou classiques (80 % des cas), les séminomes anaplasiques (10 % des cas), qui sont plus agressifs que les précédents, et les séminomes spermatocytaires, qui concernent surtout les patients de plus de 50 ans.

Les tumeurs séminomateuses, contrairement aux non-séminomateuses, ont un aspect assez uniforme, au moins au niveau histologique. Cette composition homogène fait que ce type est particulièrement adapté pour étudier les liens avec l'altération d'expression des gènes (Chieffi et Chieffi, 2013).

La population tumorale est monomorphe, composée de cellules de grande taille (15-25µm) possédant un cytoplasme clair ou discrètement éosinophile, positif à la coloration PAS (Periodic Acid Schiff). Le noyau est volumineux, à chromatine pâle, renfermant un ou plus rarement deux nucléoles proéminents (Figure 17) (Camparo et Houlgatte, 2008).

Les cellules séminomateuses expriment des marqueurs immunohistochimiques qui s'expriment normalement dans les cellules germinales indifférenciées comme PLAP (phosphatase membranaire), OCT3/4 (facteur de transcription), c-Kit (récepteur à activité tyrosine kinase), NANOG (marqueur des CGPs). Par contre, elles n'expriment pas l'alpha-fœtoprotéine (Chieffi et Chieffi, 2013; Habert et al., 2006; Jouannet, 2012). Les cellules séminomateuses expriment également d'autres marqueurs pluripotents tels que LIN28, FGFR3, DMTR1 et autres, qui sont des marqueurs de cellules souches (Ferguson et Agoulnik, 2013).

Les tumeurs germinales non-séminomateuses, plus agressives, sont de plusieurs types : carcinome embryonnaire, choriocarcinome, tumeur de sac vitellin, tératome. Ces tumeurs non séminomateuses représentent 60 à 70 % des tumeurs testiculaires et surviennent essentiellement entre la puberté et 35 ans.

Le carcinome embryonnaire constitue la forme la plus indifférenciée de tumeur germinale non-séminomateuse. Histologiquement, il s'agit de tumeurs solides, blanchâtres et mal limitées. Leurs cellules sont des cellules épithéliales de grande taille, présentant un noyau volumineux irrégulier et vésiculeux qui possède un nucléole proéminent, et hyperchromatique.

Cette tumeur apparaît très hétérogène, mal limitée, faite de territoires solides et de larges zones de nécrose et de zones hémorragiques. Elle est composée de groupes cohésifs de cellules carcinomateuses dont le cytoplasme a des limites imprécises ; leur affinité tinctoriale

	OCT3/4	SOX2	SOX17	HMGA1	HMGA2	PATZ1	GPR30	RNF4	cKit	Aur. B
Seminoma	+	-	+	+	-	+Ⓞ	+	-	+	+
Embr. carc	+	+	-	+	+	+Ⓞ	+	-	-	+
Teratoma	-	+/-	+/-	-	-	+Ⓞ	+/-	-	-	-
Yolk sac	-	-	+/-	-	+	+Ⓞ	+	-	-	-

+, expressed; +Ⓞ cytoplasmic localization; -, not expressed; +/-, variable expression.

**Tableau 2 : Principaux marqueurs immunohistochimiques utilisés pour le diagnostic des sous-types de TGCTs. (D'après Chieffi et Chieffi, 2013).**

<b>pT</b>	<b>Tumeur primitive</b>		
<b>pTx</b>	Tumeur primitive non évaluable		
<b>pT0</b>	Absence de tumeur primitive		
<b>pTis</b>	Néoplasie germinale intra tubulaire (carcinome <i>in situ</i> )		
<b>pT1</b>	Tumeur limitée au testicule et à l'épididyme sans invasion vasculo-lymphatique. La tumeur peut atteindre l'albuginée mais pas la vaginale		
<b>pT2</b>	Tumeur limitée au testicule et l'épididyme avec invasion vasculo-lymphatique ou atteignant la vaginale		
<b>pT3</b>	Tumeur étendue au cordon spermatique avec ou sans invasion vasculo-lymphatique		
<b>pT4</b>	Tumeur étendue au scrotum avec ou sans invasion vasculo-lymphatique		
<b>N</b>	<b>Extension régionale ganglionnaire clinique et radiologique</b>		
<b>Nx</b>	Ganglions régionaux non évaluables		
<b>N0</b>	Pas d'extension ganglionnaire régionale rétro-péritonéale		
<b>N1</b>	Extension ganglionnaire comportant une adénopathie de moins de 2 cm de plus grande axe ou multiples adénopathies dont aucune ne mesure plus de 2 cm		
<b>N2</b>	Extension ganglionnaire comportant une adénopathie de 2 à 5 cm de plus grand axe ou de multiples adénopathies de plus de 2 cm dont aucune ne mesure plus de 5 cm		
<b>N3</b>	Extension ganglionnaire comportant une adénopathie de plus de 5 cm de grand axe		
<b>pN</b>	<b>Extension régionale ganglionnaire pathologique</b>		
<b>pNx</b>	Ganglions régionaux non évaluables		
<b>pN0</b>	Pas d'extension ganglionnaire régionale rétro-péritonéale		
<b>pN1</b>	Extension ganglionnaire comportant une adénopathie de moins de 2 cm de plus grande axe ou moins de 5 cm adénopathies dont aucune ne mesure plus de 2 cm		
<b>pN2</b>	Extension ganglionnaire comportant une adénopathie de 2 à 5 cm de plus grande axe ou 5 adénopathies dont aucune ne mesure plus de 5 cm ou extension extra-ganglionnaire histologique		
<b>pN3</b>	Extension ganglionnaire comportant une adénopathie de plus de 5 cm de grand axe		
<b>M</b>	<b>Extension métastatique à distance</b>		
<b>Mx</b>	Extension métastatique à distance non évaluable		
<b>M0</b>	Absence de métastase distante		
<b>M1</b>	Métastase à distance		
<b>M1a</b>	Ganglions autres que rétro-péritonéaux ou pulmonaires		
<b>M1b</b>	Autres sites métastatiques		
<b>S</b>	<b>Marqueurs sériques au nadir après orchidectomie</b>		
<b>Sx</b>	Marqueurs non disponibles ou non réalisés		
<b>S0</b>	Valeurs normales des marqueurs sériques		
	<b>LDH (U/l)</b>	<b>hCG (mUI/ml)</b>	<b>α FP(ng/ml)</b>
<b>S1</b>	<1,5N	et <5000	et <1000
<b>S2</b>	1,5 à 10N	ou 5000 à 50000	ou 1000 à 10000
<b>S3</b>	>10N	ou >50000	ou >10000

**Tableau 3 : Classification TNM des cancers testiculaires (UICC, 2009).**

stade	T	N	M	S
Stade 0	pTis	N0	M0	S0, Sx
<b>Stade I</b>	pT1-4	N0	M0	Sx
Stade IA	pT1	N0	M0	S0
Stade IB	pT2-4	N0	M0	S0
Stade IS	pT1-4	N0	M0	S1-3
<b>Stade II</b>	pT1-4	N1-3	M0	Sx
Stade IIA	pT1-4	N1	M0	S0-1
Stade IIB	pT1-4	N2	M0	S0-1
Stade IIC	pT1-4	N3	M0	S0-1
<b>Stade III</b>	pT1-4	N0-3	M1a	Sx
Stade IIIA	pT1-4	N0-3	M1a	S0-1
Stade IIIB	pT1-4	N1-3	M0	S2
	pT1-4	N0-3	M1a	S2
Stade IIIC	pT1-4	N1-3	M0	S3
	pT1-4	N0-3	M1a	S3
	pT1-4	N0-3	M1b	S0-3

**Tableau 4 : Classification AJCC en stades des tumeurs germinales testiculaires.**

Pronostic	Tumeur germinale non-séminomateuse (TGNS)	Tumeur germinale séminomateuse (TGS)
<b>Bon</b>	Tous les critères ci-dessous : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Primitif ; testiculaire ou rétro-péritonéal</li> <li>- Absence de métastases extra-pulmonaires</li> <li>- <math>\alpha</math>FP &lt; 1000 ng/ml</li> <li>- hCG &lt; 5000 UI/l</li> <li>- LDH &lt; 1,5 U/l</li> </ul> Survie globale à 5 ans : 92%	Tous les critères ci-dessous : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Primitif ; quel que soit le site</li> <li>- Absence de métastases extra-pulmonaires</li> <li>- <math>\alpha</math>FP normale</li> <li>- Quel que soit hCG</li> <li>- Quel que soit LDH</li> </ul> Survie globale à 5 ans : 86%
<b>Intermédiaire</b>	Tous les critères ci-dessous : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Primitif ; testiculaire ou rétro-péritonéal</li> <li>- Absence de métastases extra-pulmonaires</li> <li>- <math>\alpha</math>FP &gt; 1000 ng/ml et &lt;10000 ng/ml ou</li> <li>- hCG &gt; 5000 UI/l et &lt;50000 UI/l ou</li> <li>- LDH &gt; 1,5 U/l et &lt; 10 UI/l</li> </ul> Survie globale à 5 ans : 80%	Un critère parmi : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quel que soit le site primitif</li> <li>- présence de métastases extra-pulmonaires</li> <li>- <math>\alpha</math>FP normale</li> <li>- Quel que soit hCG</li> <li>- Quel que soit LDH</li> </ul> Survie globale à 5 ans : 75%
<b>mauvais</b>	Tous les critères ci-dessous : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Primitif médiastinal</li> <li>- présence de métastases extra-pulmonaires</li> <li>- <math>\alpha</math>FP &gt; 10000 ng/ml ou</li> <li>- hCG &gt; 50000 UI/l ou</li> <li>- LDH &gt; 10 U/l</li> </ul> Survie globale à 5 ans : 48%	Pas de patient avec TGS classé en mauvais pronostic

**Tableau 5 : Classification pronostique IGCCCG (International Germ Cell Cancer Collaborative Group) des stades métastatiques des tumeurs testiculaires.**

est variable. Le noyau est volumineux, irrégulier et vésiculeux, avec un nucléole proéminent (Figure 17) (Camparo et Houlgatte, 2008). Les études montrent que 86 à 100% de ces cellules expriment la PLAP (Cheville, 1999; Verville, 2009).

Les TGCTs mixtes sont les plus fréquentes des tumeurs non séminomateuses composées d'au moins deux des types histologiques décrits ci-dessus (Camparo et Houlgatte, 2008; Cheville, 1999; Mohamed et al., 2012).

Des recherches sont menées afin d'identifier d'autres marqueurs permettant de mieux caractériser les différents types de tumeurs testiculaires (Chieffi et Chieffi, 2013).

Les marqueurs HMGA (protéine chromatinienne), PATZ1 (protéine à doigt de zinc), AURORA-B (kinase), SOX17 (facteur de transcription) et la protéine NEK2 (kinase centrosomale), GPR30 (G-Protein coupled estrogen Receptor, récepteur membranaire des œstrogènes) pourraient être intéressants (Tableau 2) (Chieffi et Chieffi, 2013).

Il y a donc trois pics d'incidence des TGCTs : (i) chez les enfants surviennent principalement des tératomes ou des tumeurs du sac vitellin, (ii) à l'âge de 20-35 ans apparaissent des tumeurs séminomateuses ou non-séminomateuses, (iii) chez les hommes âgés se manifestent principalement des séminomes spermatocytaires (Kratz et al., 2010).

Un autre système de classification des TGCTs reconnu par l'OMS a été développé. Cette classification est basée sur des paramètres différents, tels que l'origine cellulaire, l'histologie, l'âge, l'état de l'empreinte génomique, et la situation chromosomique. Elle permet une meilleure étude des TGCTs qu'elle divise en trois types : le type I contient les tératomes et les tumeurs du sac vitellin de nouveaux-nés, le type II correspond aux tumeurs séminomateuses et non-séminomateuses, le type III inclue le séminome spermatocytaire (van de Geijn et al., 2009).

Les tumeurs testiculaires peuvent être de différents grades. Différentes classifications ont été proposées en fonction du bilan d'extension : la classification tumor-node-metastasis (TNM) de l'International Union Against Cancer (UICC) (Tableau 3), la classification en stades de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Tableau 4) et la classification pronostique en fonction des stades métastatiques de l'International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) (Tableau 5) (Durand et al., 2010; Shin et Kim, 2013).

La classification TNM tient compte de l'extension locale de la tumeur à l'albuginée, à la tunique vaginale, à l'épididyme, au cordon spermatique ou au scrotum (T), de l'invasion des ganglions lymphatiques et de leur taille (N pour lymph node) et de l'existence de métastases (M).

La classification en stades tient compte du TNM et des marqueurs sériques. Le stade I correspond à des tumeurs sans invasion ganglionnaire. Les tumeurs de stade II présentent une extension aux ganglions lymphatiques rétropéritonéaux. L'envahissement de ganglions plus éloignés et/ou des métastases dans d'autres organes caractérisent les tumeurs de stade III. . 75% à 80% des patients ayant un séminome et environ 55% des patients ayant une tumeur non séminomateuse sont au stade I au moment du diagnostic.

### **II.3.2. Traitement**

En cas de diagnostic de cancer testiculaire, l'orchidectomie est recommandée en première intention. Une chimiothérapie peut précéder l'orchidectomie en cas de menace vitale des métastases. Une cryo-préservation de sperme est proposée au patient. Elle doit se faire avant toute chimiothérapie.

L'orchidectomie doit être réalisée dans la semaine, après dosage des marqueurs tumoraux, parce que ces marqueurs vont subir une décroissance selon leur demi-vie. La persistance de taux élevés de ces marqueurs tumoraux sériques après orchidectomie peut indiquer l'existence de métastases. La concentration de ces marqueurs est également suivie pour surveiller la réussite des traitements (Lemarié et al., 2005; Verville, 2009).

Un examen histologique extemporané peut être nécessaire avant l'orchidectomie en cas de doute clinique, et la chirurgie partielle n'est pas recommandée en cas de testicule contralatéral sain (Durand et al., 2010; Verville, 2009).

Le traitement de TGCTs est ensuite fonction du type de tumeur et de son stade d'extension (Durand et al., 2010). De manière générale, on peut dire que les tumeurs séminomateuses répondent bien à la radiothérapie et à la chimiothérapie tandis que les tumeurs non séminomateuses répondent seulement à la chimiothérapie et nécessitent des traitements plus agressifs.

Concernant les tumeurs germinales séminomateuses de stade I, se discute soit une surveillance, soit un traitement adjuvant par radiothérapie para-aortique (dose de 20 Gy) ou chimiothérapie (1 carboplatine (hors AMM)). Le choix se fait en fonction du patient et



éventuellement des facteurs pronostiques (taille > 4 cm et invasion du *rete testis*). En cas de simple surveillance, le taux de récurrence à 5 ans avoisine 15 à 20 %, dont la grande majorité survient en siège sous-diaphragmatique. Ces récurrences, compte-tenu de leur faible volume, peuvent relever d'une radiothérapie dans 70 % des cas. 20 % de ces patients récidivent et requièrent une chimiothérapie de rattrapage. Le taux de survie spécifique des séminomes stade I surveillés varie entre 97 à 100 %.

Pour les tumeurs germinales non-séminomateuses de stade I, se discute soit une surveillance, soit un traitement adjuvant par chimiothérapie (2 cures de BEP (bléomyine, etoposide, cisplatine) ou lymphadénectomie rétropéritonéale). Le choix se fait en fonction du patient et éventuellement du facteur pronostique (embolies vasculaires et lymphatiques). En cas de surveillance sans traitement, on observe un taux de récurrence avoisinant 30 %, dont 80 % se produisent dans les 12 premiers mois du suivi, et 60 % se manifestent dans le rétropéritoine.

Concernant les tumeurs germinales séminomateuses de stade IIA/IIB, la radiothérapie para-aortique incluant l'axe iliaque ipsilatéral est le traitement de référence (30 et 36 Gy respectivement). Les survies sans récurrence à 6 ans pour les stades IIA et IIB sont respectivement de 95 et 89 %. La survie globale approche 100 %. La chimiothérapie (3 BEP ou 4EP) est une alternative pour les stades IIB.

Le traitement de référence des tumeurs germinales non séminomateuses de stade IIA/IIB est la chimiothérapie à base de platine (3 ou 4 cures de BEP selon que le groupe pronostic est bon ou intermédiaire). Les rares cas de tumeurs de stade II sans élévation des marqueurs sériques peuvent être traités par lymphadénectomie rétropéritonéale (LDNRP) ou surveillance. Même si le taux de guérison est élevé après la LDNRP, il y a un risque de rechutes (Durand et al., 2010; Shin et Kim, 2013). Après la LDNRP, une chimiothérapie adjuvante par EP sur quatre cycles ou BEP sur trois cycles sera proposée aux patients qui ont un taux élevé de marqueurs tumoraux, métastases rétro-péritonéales ou des rechutes (Shin et Kim, 2013).

Pour les tumeurs de stade IIC et III séminomateuses ou non séminomateuses, la chimiothérapie est utilisée (trois ou quatre cures de BEP ou 4 cures de EP (Etoposide-Cisplatine) en fonction du niveau de pronostic). Le taux de rechutes est variable selon les

études (Houlgatte et Bauduceau, 2005; Shin et Kim, 2013). Une évaluation des masses résiduelles doit être réalisée.

Dans le cas des tumeurs germinales non séminomateuses, en cas de normalisation des marqueurs sériques, toute masse résiduelle supérieure à 1 centimètre doit faire l'objet d'une résection chirurgicale 4 à 6 semaines après l'achèvement de la chimiothérapie. La présence de tumeur métaboliquement active (détectée par tomographie par émission de positons (TEP) au <sup>18</sup>FDG) au sein des masses indique l'administration d'une chimiothérapie à base de cisplatine, seulement en cas de résection incomplète. Dans le cas des tumeurs germinales séminomateuses, un suivi des masses résiduelles doit être effectué entre 3 et 6 mois car leur régression est habituellement retardée. En cas de diamètre supérieur à 3 centimètres, il faudra rechercher la présence d'une activité métabolique par TEP et procéder à une LDNRP.

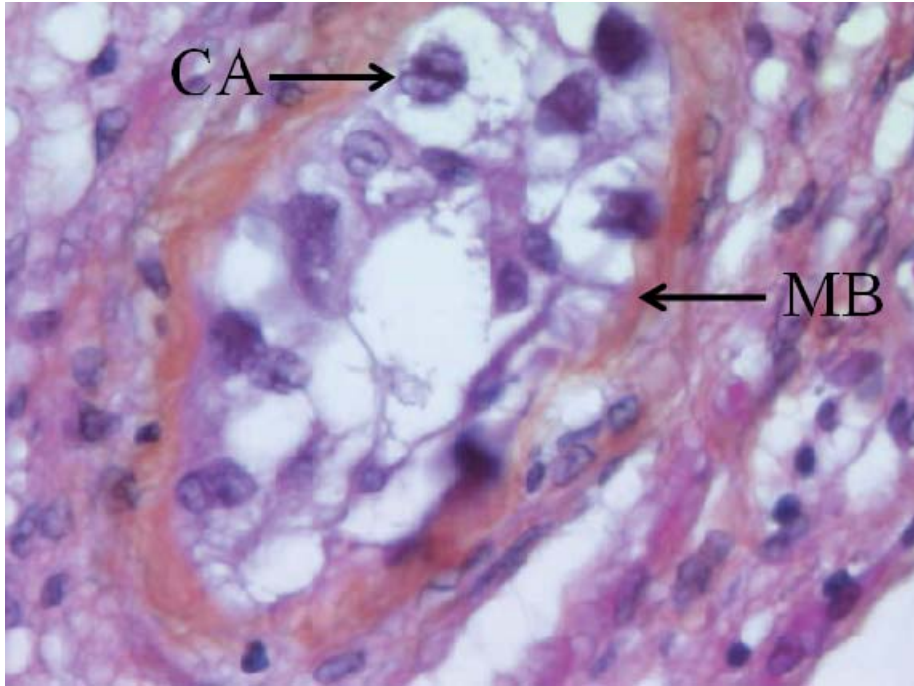
Pour les tumeurs réfractaires à la chimiothérapie ou pour les récurrences après chimiothérapie, des combinaisons de drogues à base de cisplatine sont indiquées : 4 cures PEI/VIP (cisplatine, etoposide, isofosfamide), 4 cures de TIP (cisplatine, isofosfamide, paclitaxel) ou 4 cures de VIP (vinblastine, isofosfamide, cisplatine). Dans le cas des tumeurs germinales séminomateuses, elles conduisent à un taux de rémission à long terme de 50 % après récurrence d'une première ligne de chimiothérapie. Pour les tumeurs germinales non séminomateuses, le taux de rémission à long terme, varie entre 15 et 40 %.

D'autres traitements sont en expérimentation pour les tumeurs réfractaires aux chimiothérapies classiques (Nakamura et Miki, 2010).

## **II.4. Origine et facteurs de risque des TGCTs**

### **II.4.1. Origine fœtale des TGCTs**

Une avancée importante dans la compréhension de l'origine des TGCTs fut la description en 1972 par l'endocrinologue pédiatre Skakkebaek de carcinomes *in situ* (CIS) dans le testicule de patients qui développèrent ensuite des TGCTs (Skakkebaek, 1972). Ces CIS sont encore appelés néoplasies cellules germinales intratubulaires puisque la localisation des cellules tumorales est limitée à l'intérieur des tubes séminifères (Rajpert-De Meyts, 2006).



**Figure 18 : Coupe histologique de testicule montrant un carcinome *in situ*.**

Au sein du tube séminifère à membrane basale épaissie sont présentes des cellules atypiques (CA) ressemblant à des gonocytes primordiaux. Aucune maturation spermatocytaire n'est visible. (D'après Camparo, 2011).

Des études rassemblant des données morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires ont mis en évidence de nombreuses similitudes entre cellules CIS, cellules germinales primordiales, gonocytes fœtaux et cellules souches embryonnaires (Vega et al., 2012). De plus, des cellules CIS ont été découvertes chez des enfants âgés de quelques mois, ce qui renforce l'hypothèse d'une origine fœtale des cellules cancéreuses de cancer testiculaire (Habert et al., 2006; Kristensen et al., 2008; Rajpert-de Meyts et Høie-Hansen, 2007).

Morphologiquement, les cellules CIS ont un cytoplasme abondant, clair, chargé de glycogène. Le noyau volumineux et irrégulier possède un ou plusieurs nucléoles. Leur prolifération intratubulaire, s'organise en une couche disposée en périphérie du tube séminifère, sur une membrane basale épaisse et hyalinisée. La maturation spermatocytaire est absente (Figure 18) (Camparo et Houlgatte, 2008; Chieffi et Chieffi, 2013).

Les cellules CIS expriment un certain nombre de gènes communs aux cellules germinales du testicule. Un exemple est Vasa, qui code une ARN hélicase à boîte DEAD qui est exprimé dans les cellules germinales tout au long de leur développement et de leur maturation (Rajpert-De Meyts, 2006). Mais les cellules CIS expriment aussi des marqueurs qui ne sont exprimés que dans les gonocytes (Rajpert-De Meyts, 2006).

Les premières études ont recherché des marqueurs qui étaient facilement utilisables pour le diagnostic des CIS sur des biopsies testiculaires. Un exemple classique est la PLAP qui est aussi le premier marqueur des CGPs.

Deux autres marqueurs TRA-1-60 et M2A sont présents en abondance dans les cellules CIS. Ces marqueurs ne sont pas détectables dans le testicule adulte sain mais sont présents dans les CGs fœtales et infantiles, ce qui constitua une première évidence en faveur de l'origine pré-natale des CIS (Rajpert-De Meyts, 2006).

D'autres arguments en faveur de l'origine pré-natale des CIS furent fournis par l'étude de c-KIT. Nous avons vu l'importance de cette protéine et de son ligand dans la gonadogénèse au paragraphe I. c-KIT est présent à un haut niveau dans la majorité des gonocytes pendant le premier trimestre de la grossesse puis son expression diminue graduellement : il est encore exprimé par les gonocytes infantiles mais il n'est plus exprimé par les spermatogonies du testicule adulte. c-KIT est fortement exprimé par les cellules CIS (Rajpert-De Meyts et Skakkebaek, 1994).

Puisqu'il est important pour la survie des CGs, il pourrait conférer un avantage pour la survie des gonocytes indifférenciés et ceci a permis d'avancer l'hypothèse qu'un retard de différenciation pourrait expliquer la transformation néoplasique des CGs. Ceci peut être rapproché de mutations « gain de fonction » du gène c-kit dans toutes tumeurs testiculaires bilatérales (Rajpert-De Meyts, 2006). Cela suggère probablement que dans ces cas les mutations sont survenues dans les CGPs avant leur migration.

Les cellules CIS expriment aussi des marqueurs de cellules souches. C'est notamment le cas de TRA-1-160 qui est un marqueur de cellules souches embryonnaires. Plus récemment, des études ont montré que plusieurs marqueurs pluripotents comme Oct3/4 (ou POU5F1) et NANOG qui ne s'expriment normalement que dans les CGs fœtales indifférenciées et les cellules souches embryonnaires, s'expriment aussi dans les cellules CIS. Ces gènes sont en lien avec la pluripotence ; ils empêchent la différenciation et assurent le maintien d'un stock de cellules pour le renouvellement tissulaire.

Les données précédentes, surtout issues d'analyses immunohistochimiques, ont été confortées par des données transcriptomiques. Une première étude de CIS par differential display identifia plusieurs gènes qui fonctionnent pendant la vie fœtale et cela renforça l'hypothèse d'une origine fœtale des CIS (Hoei-Hansen et al., 2004). Une étude par microarray confirma l'expression de gènes pas encore décrits comme exprimés par les cellules CIS (Almstrup et al., 2004). Beaucoup de similitudes avec les cellules souches embryonnaires furent trouvées : Nanog, Oct3/4, Kit, Sfrp1, Tfap2c. Ce dernier gène code le facteur de transcription AP-2 $\gamma$  (activator protein 2) qui est présent en abondance dans le noyau des cellules CIS.

Sonne et al., ont réalisé une analyse par puces à ADN a près microdissection laser de CIS (Sonne et al., 2009). Les profils d'expression ont été comparés à ceux de gonocytes microdisséqués, d'ovogonies et de cellules souches embryonnaires en culture. Leurs résultats confirment que les cellules CIS sont des gonocytes arrêtés au cours du processus de différenciation, mais pas des cellules cancéreuses malignes ou en prolifération active. En effet, aucun gène suppresseur de tumeurs ni oncogène n'est fortement exprimé dans ces cellules. De plus, ils ont trouvé que le profil d'expression des cellules CIS est très similaire à celui des gonocytes (plus qu'à celui des cellules souches). Seuls cinq gènes diffèrent entre les

CIS et les gonocytes, parmi lesquels deux gènes associés au cancer et présentant de faibles niveaux d'expression dans les cellules CIS.

Parmi ces cinq gènes, deux sont surexprimés et trois gènes sont réprimés dans les cellules CIS par rapport aux gonocytes. Le premier gène surexprimé est le gène *Defb119* qui code un peptide antimicrobien exprimé spécifiquement dans le testicule et dont l'expression est régulée par les androgènes. Le second est *Nmnat2* (nicotinamide mono-nucléotide adenylyl-transférase 2) qui code une enzyme centrale de la voie de biosynthèse du NAD (Nicotinamide Adénine Di-nucléotide).

Les trois gènes qui sont réprimés dans les cellules CIS par rapport aux gonocytes sont *Ptprz1* qui code un récepteur de tyrosine phosphatase impliqué dans plusieurs types de cancers, *Asxl3* qui est l'homologue humain du gène « additional sex combs » de drosophile, et *AF318333* qui n'a pas de fonction connue. Cette diminution de l'expression de ces trois gènes pourrait être impliquée dans la transformation néoplasique des cellules CIS (Sonne et al., 2009).

Dans cette étude, ils n'ont pas trouvé de gènes spécifiques de la méiose parmi les gènes exprimés par les cellules CIS, ce qui suggère fortement que les CIS ne dérivent pas des cellules méiotiques mais plus probablement des gonocytes (Sonne et al., 2009). Ces auteurs suggèrent que les cellules CIS sont donc des gonocytes mal différenciés en pré-spermatogonies en raison de cellules somatiques sous-masculinisées qui constitueraient un microenvironnement qui permet à des gonocytes fœtaux de survivre dans le testicule postnatal (Sonne et al., 2009).

Des études portant sur le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN plaident aussi en faveur d'une origine préméiotique des CIS (Rajpert-De Meyts, 2006). Les protéines p53 et CHK2, qui sont importantes pour la régulation du cycle cellulaire en relation avec la réparation de l'ADN, sont fortement exprimées par les cellules CIS. Ces deux protéines sont abondantes dans les gonocytes fœtaux puis p53 est down-régulée dès le stade spermatogonie tandis que CHK2 disparaît au début de la méiose. Les cellules CIS n'expriment pas pRB qui est importante pour le contrôle de la transition G1/S. pRB est down-régulée dans les gonocytes fœtaux mais active dans les spermatogonies matures.

Des données épigénétiques viennent aussi conforter l'hypothèse d'une origine fœtale des CIS.

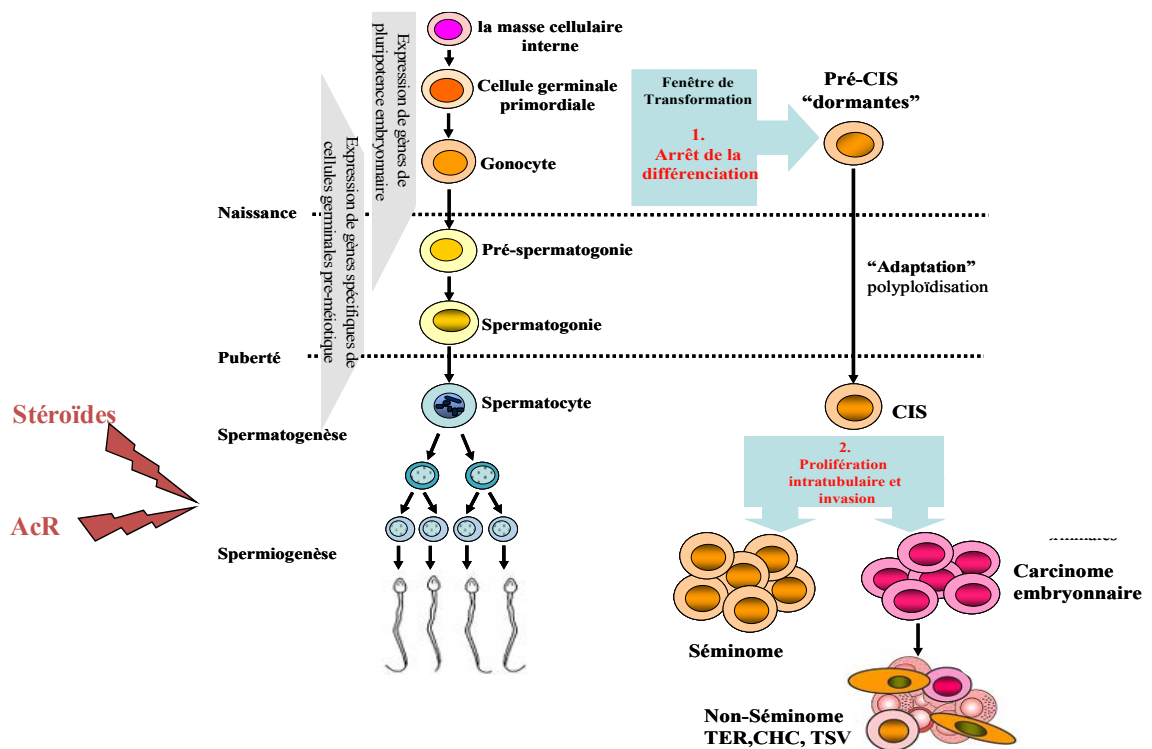
Les cellules CIS possèdent l'arginine 3 des histones H2A et H4 diméthylées, une modification épigénétique supposée intervenir dans la répression des gènes Hox impliqués dans le programme de différenciation somatique (Ohinata et al., 2005).

Récemment, Almstrup et al., ont analysé par immunohistochimie les modifications épigénétiques des cellules CIS (Almstrup et al., 2010). Ils ont observé que les modifications des histones liées à une chromatine transcriptionnellement active (H3K4me, H3K9ac, et H2A.Z) sont plus présentes que celles qui sont liées à son inactivation (H3K9me2 et H3K27me3). De plus, les cellules de CIS étaient positives pour H3K9 acétylée et pour H2A.Z. Les cellules de Sertoli des tubules renfermant un CIS présentent des profils inverses. Ils ont aussi observé une faible méthylation de l'ADN (5mC), confirmant des études préalables (Netto et al., 2008). Ceci est en accord avec une faible expression des enzymes DNMT3A et 3L (Almstrup et al., 2005).

Ils ont également montré que l'ARN polymérase II ainsi que son variant phosphorylé sur la sérine é étaient très fortement exprimés dans les cellules CIS, ce qui suggère une activité transcriptionnelle élevée dans ces cellules. Les mesures d'index mitotique et l'analyse du marqueur de cycle Ki67 révèlent que les cellules CIS prolifèrent activement.

Ces caractéristiques épigénétiques sont similaires à celles des gonocytes avec une seule exception concernant le taux de mono-, di- et triméthylation de la lysine 4 sur l'histone H3 (H3K4me1, H3K4me2/3) qui sont plus présentes dans les cellules CIS que dans les gonocytes (Almstrup et al., 2010).

Dans les TGCTs, le génome des tumeurs séminomateuses est fortement hypométhylé, pratiquement dépourvu d'îlots CpG hyperméthylés, tandis que les tumeurs non séminomateuses possèdent des taux variables d'îlots CpG hyperméthylés (Smiraglia et al., 2002). Parmi les tumeurs non séminomateuses, ce sont les tératomes (très différenciés) qui montrent la fréquence la plus élevée de promoteurs hyperméthylés (Lind et al., 2006). Cela pourrait être mis en relation avec le fait que DNMT1 n'est pas exprimée dans les tumeurs séminomateuses, mais est surexprimée dans les carcinomes embryonnaires et les tératomes (Omisanjo et al., 2007; Vega et al., 2012). DNMT3A est surexprimée dans les TGCTs par



**Figure 19 : Origine du carcinome in situ (CIS) testiculaire.**

À gauche, le développement normal des cellules germinales mâles. Au cours du développement embryonnaire normal, l'absence d'acide rétinoïque est nécessaire pour leur entrée en quiescence. C'est à la puberté sous l'effet combiné des hormones stéroïdes et de l'acide rétinoïque que la spermatogenèse est initiée et se perpétue pendant le reste de la vie adulte.

À droite, le développement néoplasique de cellules germinales mâles. Les événements clés de l'origine et de la progression des TGCTs sont présentés en rouge. (1) arrêt de différenciation des cellules germinales primordiales (CGPs) ou des gonocytes. (2) prolifération et invasion tumorale des cellules du CIS soit en séminome avec expression des marqueurs de pluripotence ainsi que des gènes spécifiques de la lignée germinale, soit en carcinome embryonnaire avec perte de la spécificité germinale et possibilité de se différencier secondairement en d'autres types de tumeurs testiculaires. (Adapté d'après Kristensen et al., 2008).



apport aux tissus testiculaires non-tumoraux. DNMT3B a aussi été très étudiée ; elle peut être utilisée comme marqueur prédictif de rechute des séminomes de stade I (Arai et al., 2012). De plus, DNMT3L est surexprimée dans les tumeurs non-séminomateuses (Vega et al., 2012).

Il existe donc un grand nombre d'arguments indiquant que les cellules tumorales des TGCTs proviennent de gonocytes qui se seraient mal différenciés en spermatogonies et se transforment en cellules cancéreuses qui sont identifiables dans les tubes séminifères (pré-CIS).

Les cellules pré-CIS restent en dormance pendant l'enfance. A la puberté, sous l'effet des hormones stéroïdes, les cellules CIS prolifèrent dans les tubules séminifères en remplaçant la majorité des cellules spermatogoniales normales pour se développer soit en séminomes exprimant des gènes de pluripotence tels que *Oct3/4* et *NANOG*, soit en carcinome embryonnaire qui pourra ensuite se différencier en d'autres types de tumeurs non-séminomateuses tels que tératomes (tissu embryonnaire), tumeurs du sac vitellin et choriocarcinomes (tissu extra-embryonnaire) (Figure 19) (Ferguson et Agoulnik, 2013; Habert et al., 2006; Kristensen et al., 2008; Rajpert-De Meyts, 2006).

#### **II.4.1.2. Facteurs de risques génétiques**

Des études épidémiologiques ont montré que les cancers testiculaires résultent en partie de facteurs héréditaires. Des enfants dont le père a été atteint d'un cancer testiculaire, ont 4 à 6 fois plus de risques d'avoir ce type de cancer. Les frères des patients atteints présentent quant à eux un risque 8 à 12 fois plus élevé (Nathanson et al., 2005; Thorup et al., 2010). En outre, le risque de cancer testiculaire est accru de 37 fois chez les jumeaux dizygotes et de 76,5 fois chez les jumeaux monozygotes (Swerdlow et al., 1997).

De plus, chez les hommes Finlandais (où l'incidence est minimale) qui migrent vers la Suède (où l'incidence est moyenne), le risque de cancer testiculaire est resté faible par rapport à celui des Danois (chez qui l'incidence est maximale) qui ont migré en Suède (Czene et al., 2002; Thorup et al., 2010). Les différences ethniques marquées du risque de TGCT chez les hommes vivant dans les mêmes zones indiquent aussi une composante génétique dans l'étiologie de la maladie (Dalgaard et al., 2012). Par exemple, aux États-Unis, les hommes

d'origine africaine ont cinq fois moins de risque de développer un TGCT que les hommes d'origine européenne.

De nombreux rapports ont décrit des anomalies cytogénétiques et moléculaires associés aux TGCTs. Ces anomalies comprennent, aneuploïdie (triploïdie le plus souvent), le gain et/ou la perte de certaines régions chromosomiques spécifiques comme la présence d'un isochromosome 12p, ce qui conduit à une altération de l'expression des gènes situés sur le chromosome 12p. C'est là que se situent des gènes de pluripotence comme Nanog (Chieffi et Chieffi, 2013).

En cas de dysgénésie testiculaire liée à un état intersexué, l'augmentation du risque de TGCTs n'est observée que chez les personnes ayant un chromosome Y. Il était donc logique de rechercher un lien éventuel avec le chromosome Y. Seule la délétion *gr/gr* située dans la région AZFc (azoospermia factor c), connue pour être responsable d'infertilité masculine, a été identifiée comme responsable potentiel. Elle est présente chez 3 % des hommes ayant un cancer testiculaire avec des antécédents familiaux contre 2 % chez les hommes cancéreux sans antécédents familiaux et 1,3 % chez les hommes non cancéreux. La délétion *gr/gr* est plus fortement associée avec les tumeurs séminomateuses que non séminomateuses (Nathanson et al., 2005).

Le gène *TSPY* (testis-specific protein Y), qui est localisé au locus GBY (gonadoblastoma on the Y chromosome) pourrait aussi être impliqué dans les TGCTs (Lau et al., 2009). Ce gène est normalement exprimé dans les gonocytes/pré-spermatogonies fœtales, les pré-spermatogonies néonatales et les spermatogonies du testicule adulte. Il est aussi exprimé fortement aussi dans les gonadoblastoma, les tumeurs testiculaires germinales TGCTs et leurs précurseurs CIS (Lau et al., 2009).

Un rapport de l'International Testicular Cancer Linkage Consortium (ITCLC) portant sur l'analyse de 985 cas familiaux de TGCTs issus de 461 familles montre que dans 88% des familles possédaient deux membres affectés (Shin et Kim, 2013). Le nombre maximum de membres atteints de TGCTs au sein d'une famille était 5. Plusieurs modes de transmission existent selon les familles : autosomal récessif, autosomal dominant (père/fils, grand-père/père/fils: 19%), lié à l'X, ainsi que des transmissions plus complexes impliquant oncles, tantes et cousins. Dans un sous-groupe de familles, l'âge au moment du diagnostic était significativement plus jeune que pour les cas de la population générale. L'âge moyen au diagnostic était 2,5 ans plus jeune que pour les formes sporadiques de TGCTs du même pays.

Enfin, environ 6,5% des cas familiaux de cette étude de l'ITCLC présentaient une atteinte bilatérale, une prévalence plus élevée que dans les formes sporadiques de TGCTs.

Récemment 4 études "genome wide association studies" (GWAS) réalisées au Royaume uni et aux Etats-unis ont rapporté l'association des TGCTs avec six loci : KITLG, SPRY4, BAK1, DMRT1, TERT, and ATF7IP (Kanetsky et al., 2009, 2011; Rapley et al., 2009; Turnbull et al., 2010).

La plus forte association concernait des SNPs dans le gène codant KITLG avec un risque de TGCT augmenté de 2.5 fois (Kanetsky et al., 2009; Rapley et al., 2009). Les études de liaison montrent que deux SNPs (rs 995030 et rs 1508595) situés en 12q21 sur le chromosome 12 sont les signaux d'association les plus forts. La plus faible fréquence de ce polymorphisme chez les hommes d'origine africaine pourrait expliquer les différences ethniques de l'incidence du CT observées aux États-Unis (Jouannet, 2012).

Les relations entre KITLG, TGCT et les défauts de spermatogénèse ont fait l'objet d'une étude en Italie grâce aux marqueurs rs995030 et rs4471514 identifiés dans les études anglaise et américaine précédemment (Ferlin et al., 2012). Cette étude qui a porté sur 426 cas de TGCTs et 614 témoins a confirmé que le risque de TGCT était augmenté plus de deux fois par copie des allèles majeurs G et A dans KITLG rs995030 et rs4471514 respectivement.

Lorsque l'allèle est présent à l'état homozygote, le risque est 7 fois plus élevé. Ces marqueurs de KITLG étaient fortement associés avec les séminomes et plus faiblement avec les tumeurs non-séminomateuses (Ferlin et al., 2012).

Les souris de la lignée 129 chez lesquelles il existe une délétion homozygote spontanée de ce gène ont un risque accru de développer une tumeur testiculaire (Heaney et al., 2008).

Le rôle potentiel du système KITLG/KIT dans la formation des tumeurs testiculaires est aussi renforcé par le fait que certains des autres polymorphismes identifiés comme facteurs de prédisposition, par exemple ceux touchant les gènes Spry4 et Bak1, ont un lien avec la voie de signalisation KITLG/KIT.

Le gène Spry4 est localisé sur le chromosome 5. Ce gène code un inhibiteur de la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) qui semble agir en aval de la voie KIT/KITLG (Kratz et al., 2010; Rapley et Nathanson, 2010). L'analyse de l'expression de ce facteur montre que son expression est significativement réprimée lorsque la signalisation de la voie KIT est inhibée par le mésylate d'imatinib dans les tumeurs stromales gastro-intestinales, en soutenant la relation fonctionnelle entre les deux protéines.

Chez les rongeurs, *SPRY4* inhibe l'activité sérine/thréonine kinase de la protéine testiculaire TESK1, qui stimule la diffusion cellulaire des spermatocytes et des spermatides dans le testicule adulte.

Le gène Bak1 (BCL2-antagonist/killer1) est localisé sur le chromosome 6. BAK1 (pro-apoptotique) joue un rôle dans l'apoptose des CGPs (Rapley et Nathanson, 2010). Son expression est réprimée par la voie KIT/KITLG dans les cellules germinales testiculaires.

Enfin, une expression élevée, des mutations somatiques activatrices et des amplifications génomiques de c-kit sont fréquemment observées dans les TGCTs (spécialement les tumeurs séminomateuses) (Kratz et al., 2010).

Par ailleurs, les analyses de liaison faites dans des familles dans lesquelles plusieurs cas de cancer testiculaire avaient été détectés ont conduit à suspecter l'existence d'un gène de susceptibilité sur le chromosome X. Ce gène appelé TGCT1 et positionné en Xq27 pourrait être aussi un facteur de prédisposition de la cryptorchidie. Cependant, ce gène n'a pas été encore identifié (Jouannet, 2012).

D'autres études montrent que certains polymorphismes de gènes impliqués dans la signalisation et le métabolisme des hormones stéroïdes, pourraient être associés à un risque plus élevé de cancer testiculaire.

En ce qui concerne les récepteurs des œstrogènes, il a été démontré que les polymorphismes dans ER $\alpha$  sont associés à une azoospermie et sont plus susceptibles d'être associés au risque de séminome et de métastases. Tandis que, les polymorphismes dans le récepteur ER $\beta$  sont plus susceptibles d'être liés à une altération de la spermatogenèse et à un risque de TGCT (revue dans Vega et al., 2012).

De même, les mutations du gène codant le récepteur des androgènes (AR) semblent être impliquées dans les TGCTs (Vega et al., 2012). Il existe deux régions polymorphes dans le premier exon : les séquences trinuléotidiques CAG codant une glutamine et CGN codant une glycine peuvent être répétées de façon variable. Des changements dans la longueur de ces répétitions CAG et/ou GGN altèrent la transactivation d'AR. Un risque accru de séminome est associé aux courtes répétitions de la séquence CAG. Cela suggère qu'une transactivation accrue de AR pourrait être impliqué dans le développement des séminomes et/ou la progression des CIS en séminomes (Davis-Dao et al., 2011). Une altération de la combinaison

des répétitions CAG et GGC pourrait aussi être impliquée. En effet, une étude indique que la combinaison CAG (20 répétitions) et GGC (17 répétitions) était plus fréquente chez les patients ayant une TGCT (8% vs 1.7% chez les témoins) (Garolla et al., 2005). (Le sujet des récepteurs des hormones stéroïdes sera traité au paragraphe III).

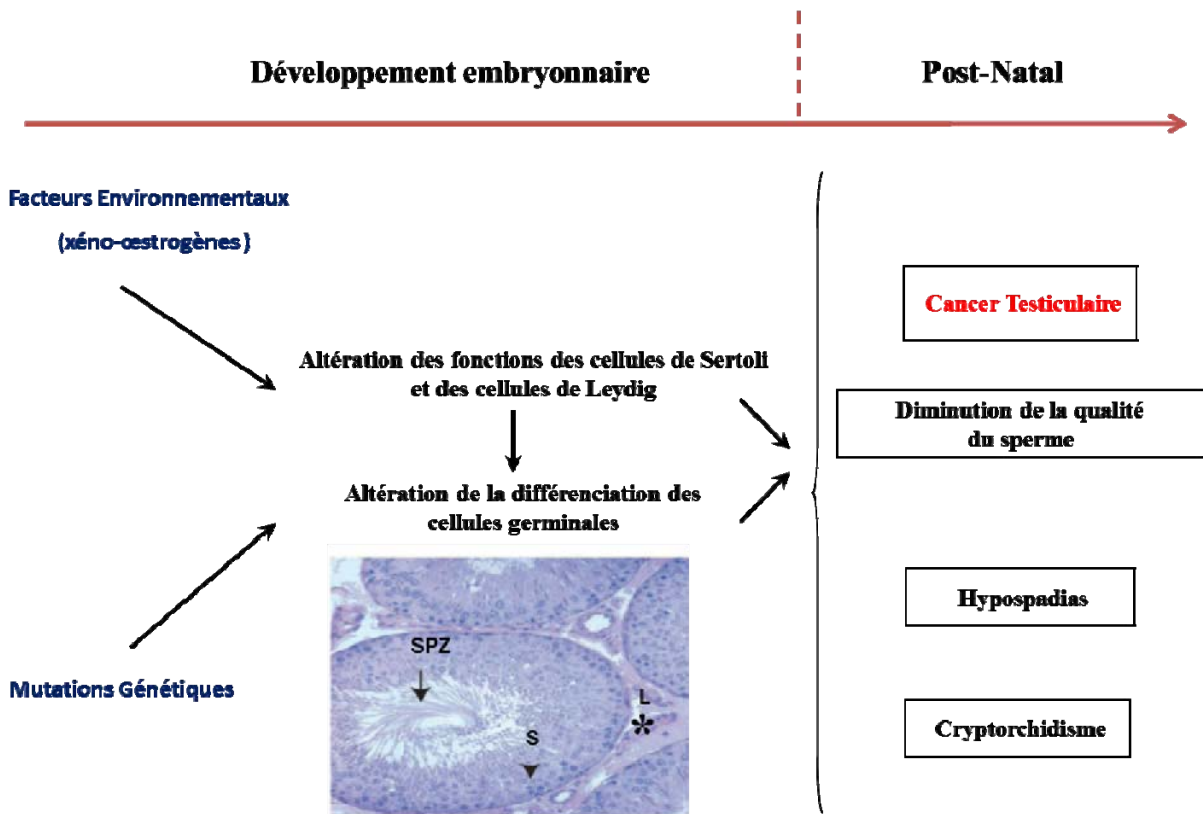
Une autre étude montre qu'il y a une association entre des polymorphismes du gène Hsd17B4, qui code l'enzyme 17- $\beta$  hydroxy stéroïde déshydrogénase-4 qui transforme l'œstradiol en œstrone et la testostérone en androstènedione, moins actifs, et l'existence d'une tumeur testiculaire (Jouannet, 2012).

Des polymorphismes dans le gène Cyp1A1 (majeur cytochrome P450 extra-hépatique), qui code une protéine du métabolisme des hormones stéroïdes, ont été identifiés. Une étude cas-témoins menée en Norvège rapporte que les hommes hétérozygotes ou homozygotes pour les allèles CYP1A1\*2A (substitution T > C dans la région 3' non traduite créant un site de clivage pour MspI) et CYP1A1\*2C (I462V dans le domaine de liaison à l'hème) ont un risque significativement diminué d'avoir un cancer testiculaire (Kristiansen et al., 2011).

#### **II.4.1.3. Facteurs environnementaux et syndrome de dysgénésie testiculaire**

Parallèlement à l'augmentation de l'incidence du cancer testiculaire, une baisse qualitative et quantitative de la production spermatique a été observée au cours des dernières décennies (Auger et al., 1995; Carlsen et al., 1995). En outre, la fertilité est plus faible chez les hommes qui développeront ensuite un cancer testiculaire (Skakkebaek et al., 2001). Dans une étude portant sur 514 patients atteints de cancer testiculaire et 720 témoins, il a été observé que le cancer apparaissait plus souvent chez les hommes qui n'avaient pas ou peu eu d'enfants (Møller et Skakkebaek, 1999).

De plus, il apparaît que l'incidence de plusieurs affections du tractus génital mâle soit aussi en augmentation ou l'ait au moins été jusqu'à la fin des années 1900 (Thorup et al., 2010; Toppari et al., 2001). C'est le cas du cryptorchidisme (testicule non descendu dans le scrotum, le testicule cryptorchide pouvant se trouver en position intra-abdominale, à l'intérieur du canal inguinal (dans 60 % des cas), à son orifice interne ou à la racine de la bourse). La prévalence en France est de 1 à 7 % des nouveau-nés à terme mais elle atteint 20 à 30 % pour les cas de naissances prématurées (Paty et al., 2011). Statistiquement, 10% des cancers



**Figure 20 : Syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS).** Ce syndrome est dû à des facteurs génétiques ou à des facteurs environnementaux ou à une combinaison des deux. Ces facteurs pourraient induire pendant la vie fœtale des altérations des fonctions des cellules de Sertoli, de Leydig et/ou des cellules germinales. Ces altérations induisent par la suite les anomalies représentant le TDS que sont le cryptorchidisme, l'hypospadias, l'oligospermie et le cancer testiculaire.

testiculaires seraient détectés chez des patients ayant eu un cryptorchidisme (Mannuel et al., 2012). Le cryptorchidisme est aussi un facteur de risque des autres altérations et que l'hypospadias et l'oligospermie sont des facteurs de risque du cancer testiculaire (Sharpe et Irvine, 2004).

C'est aussi le cas de l'hypospadias (localisation anormale de l'ouverture de l'urètre (le méat urinaire) sur la surface ventrale du pénis, au niveau du scrotum ou au niveau du périnée) dont la plupart des études estiment la fréquence autour de 3 pour 1000 naissances tant aux États-Unis qu'en Europe (Paty et al., 2011).

Une étude comparative dans plusieurs pays européens montre, comme pour le cancer testiculaire, que l'incidence des autres altérations (qualité du sperme, cryptorchidisme et hypospadias) est maximale au Danemark et minimale en Finlande (Boisen et al., 2004; Toppari et al., 1996). Aucune variation du nombre de spermatozoïdes dans le sperme n'a été observée en Finlande. Pour le cryptorchidisme, l'incidence au Danemark est de 9.0% mais seulement de 2.4% en Finlande (Boisen et al., 2004). Pour l'hypospadias, les données de 4 études portant sur la population Danoise publiées à différents moments indiquent 0.33% en 1953, 0.4% en 1999, 0.75% en 2005, et 0.64% à 0.83% en 2008 (Thorup et al., 2010).

Ces différents arguments laissent penser que toutes ces anomalies sont liées entre elles et que ces quatre altérations correspondraient vraisemblablement à différents symptômes d'un même syndrome : le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) (Figure 20) (Skakkebaek et al., 2001).

Une hypothèse plausible est que ce TDS puisse résulter d'une altération du développement du testicule fœtal (Sharpe et Irvine, 2004; Skakkebaek et al., 2001). En effet, l'hypospadias résulte d'un défaut de production ou d'action des androgènes pendant la vie fœtale. Le cryptorchidisme résulte d'anomalies de la production ou de l'action de l'Insl 3 ou des androgènes qui régulent respectivement la descente transabdominale et transinguinale des testicules (Ferguson et Agoulnik, 2013). Les TGCTs proviendraient des gonocytes qui ne se seraient pas différenciés normalement en spermatogonies (Skakkebaek et al., 2001). Enfin, la diminution de la production spermatique chez l'adulte pourrait résulter de problèmes lors de la mise en place du stock de gonocytes qui engendrent les spermatogonies souches de l'adulte.

De nombreuses observations et expériences suggèrent que l'altération du développement testiculaire pourrait résulter d'une exposition pendant la vie fœtale, à des polluants chimiques dont la diversité et la concentration augmentent régulièrement dans

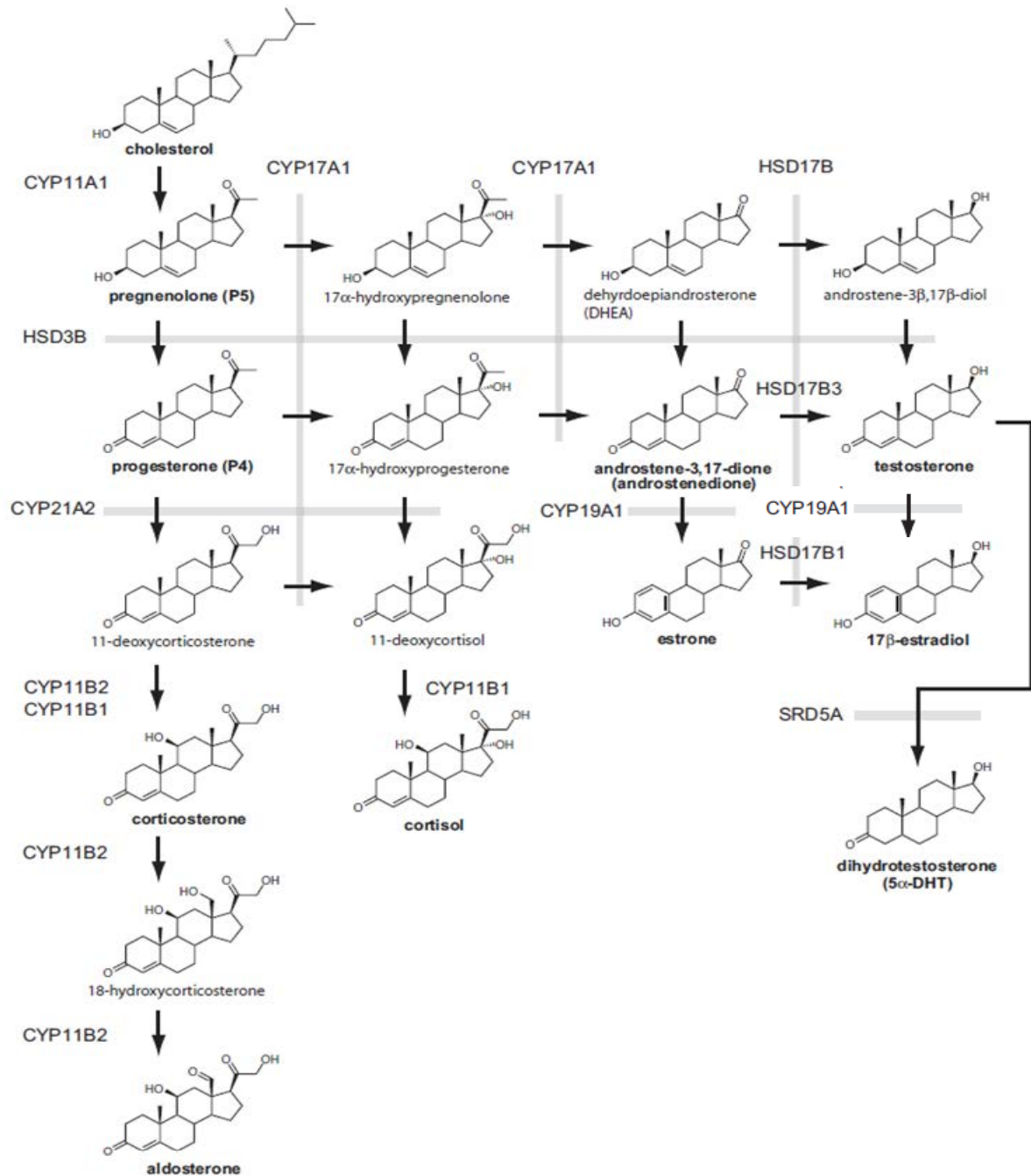
l'environnement (Habert et al., 2006). Les principales substances incriminées sont les perturbateurs endocriniens à effet œstrogénique (xéno-œstrogènes) ou antiandrogénique. Il peut s'agir de pesticides, d'agents plastifiants, de surfactants, et de phytoestrogènes présents essentiellement dans l'alimentation.

Un argument essentiel en faveur de cette hypothèse concerne les anomalies observées chez les fils dont la mère a été traitée pendant la grossesse par le diéthylstilbestrol (DES), un agoniste fort des oestrogènes utilisé dans les années 1950 à 1970. Certaines études indiquent chez eux une augmentation de l'incidence de malformations génitales, de cryptorchidie et de cancers testiculaires ainsi qu'une altération de la qualité du sperme (Glaze, 1984; Strohsnitter et al., 2001). D'autres études ne rapportent pas d'altération de la fertilité mais cela pourrait être dû à une exposition plus tardive lors de la grossesse car l'effet négatif sur le nombre de spermatozoïdes ne s'observe que si le traitement a été administré pendant le premier trimestre de grossesse (Storgaard et al., 2006).

Le rôle potentiel du DDT et du p,p'DDE a aussi été étudié. Aucune étude n'a mis en évidence de lien entre DDT et cancer testiculaire mais deux études sur quatre ont observé une association entre quantité de p,p' DDE (qui a des propriétés antiandrogéniques) dosée chez l'homme et la survenue d'un cancer (Jouannet, 2012). Ce composé a aussi été trouvé en quantité significativement plus élevée chez les mères.

Le chlordane et ses dérivés ont aussi été analysés et une association avec la survenue d'un cancer testiculaire a été trouvée dans trois études sur quatre (Jouannet, 2012).





**Figure 21 : Principales étapes de la stéroïdogénèse.**

Les voies pour la production des androgènes (Testostérone et 5 $\alpha$ -DHT) et œstrogènes (œstrone et 17 $\beta$ -œstradiol) dans les gonades, et celles pour la production des glucocorticoïdes (cortisol) et minéralocorticoïdes (aldostérone) dans le cortex surrénalien sont illustrées.

Le cytochrome P450aromatase (CYP19A1) intervient dans la conversion de l'androstènedione en œstrone et la conversion de la testostérone en œstradiol. La 5 $\alpha$ -réductase (types 1 et 2) est responsable de la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone (5 $\alpha$ -DHT). (D'après Morohashi et al., 2013).

### **III. Les hormones stéroïdes et leurs récepteurs**

#### **III.1. Généralités sur la stéroïdogénèse**

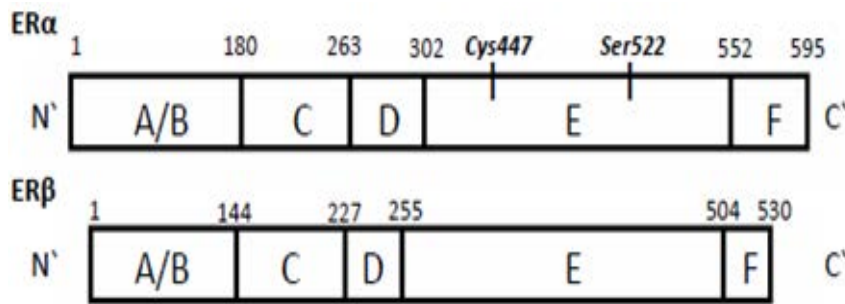
Les facteurs qui induisent des caractéristiques mâles et femelles sont appelés androgènes et œstrogènes, respectivement. Ces hormones, avec les corticostéroïdes, sont classées comme des hormones stéroïdes en raison de leur structure moléculaire (Morohashi et al., 2013).

Le testicule assure deux grandes fonctions : la production des cellules sexuelles mâles (la gamétogenèse) et la production des stéroïdes sexuels (la stéroïdogénèse). Cette dernière correspond à la synthèse et à la sécrétion des hormones stéroïdes, principalement la testostérone qui est responsable de la masculinisation chez le fœtus et de l'établissement et du maintien des caractères sexuels secondaires mâles et de la spermatogenèse chez l'adulte (Rouiller-Fabre et al., 2008).

D'autre part, même si l'importance fondamentale des œstrogènes dans la reproduction féminine est bien connue, un nombre croissant d'arguments suggère que ces hormones exercent également un rôle important dans la fonction de reproduction masculine (Habert et al., 2006).

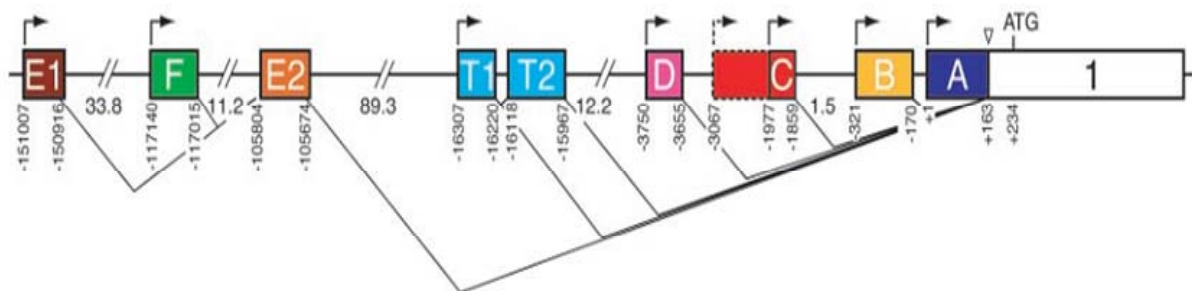
Les œstrogènes sont des régulateurs clés de la croissance et de la différenciation dans de nombreux tissus cibles, y compris l'appareil génital, les glandes mammaires, le système nerveux central et le squelette. Les œstrogènes sont également connus pour être impliqués dans de nombreux processus pathologiques tels que le cancer du sein et de l'endomètre, et l'ostéoporose (Zhao et al., 2008).

Les principales hormones stéroïdes sont synthétisées via une voie de biosynthèse enzymatique classique à partir du cholestérol. La transformation du cholestérol en prégénolone, première étape dans la voie de synthèse, est médiée par l'enzyme cytochrome P450<sub>sc</sub> (side-chain cleavage) ou CYP11A1 localisé dans la membrane mitochondriale interne (Figure 21). Aussi, avant la première réaction, le cholestérol doit être transporté dans les mitochondries, ce processus étant facilité par une protéine porteuse du cholestérol, la protéine StAR (steroidogenic acute regulatory protein). La seconde réaction est catalysée par la 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase P450 (CYP17A1), localisée sur la membrane du réticulum



**Figure 22 : Structure des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$ .**

Le nombre d'acides aminés dans chacun des domaines A/B, C, D, E et F est indiqué. A/B : contient le domaine AF1 impliqué dans l'activation hormono-indépendante de la transcription. C : DBD (DNA binding domain) aussi impliqué dans la dimérisation. D : domaine charnière, impliqué dans la localisation nucléaire et la dimérisation. E : LBD-ligand binding domain ; AF2-activation hormono-dépendante de la transcription. F : rôle inconnu, peut-être un rôle d'inhibition de la dimérisation. (D'après Soltysik et al., 2013).



**Figure 23 : Organisation génomique de la région promotrice du gène ER $\alpha$  humain.**

Les rectangles colorés représentent les différents exons selon la nomenclature actuelle. Les nombres situés en dessous des exons indiquent leur distance par rapport au premier site de début de la transcription (+1). Les nombres situés entre les exons indiquent la taille des introns en kilo-paire de bases. Le site commun accepteur d'épissage est indiqué par un triangle. (D'après Kos et al., 2001).

endoplasmique (Figure 21) (Morohashi et al., 2013). Le cytochrome P450aromatase (codé par le gène CYP19A1) intervient dans la conversion des androgènes en œstrogènes (Morohashi et al., 2013). La 5 $\alpha$ -réductase (types 1 et 2, SRD5A1 et SRD5A2) intervient dans la conversion la testostérone en un androgène non aromatisable, 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (5 $\alpha$ -DHT) (Figure 21).

### **III.2. Les récepteurs nucléaires des œstrogènes**

Les œstrogènes lient et activent des récepteurs intracellulaires des œstrogènes (ERs), qui sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires dont un sous ensemble regroupe des récepteurs pour les petites molécules, telles que les hormones stéroïdes (Nelson et Habibi, 2013).

L'action des récepteurs des œstrogènes consiste en la liaison d'une molécule lipophile dans le cytoplasme, la translocation du complexe vers le noyau, la dimérisation et l'interaction avec des éléments de réponse appropriés dans les promoteurs de gènes, ce qui initie leur transcription après la liaison de co-activateurs.

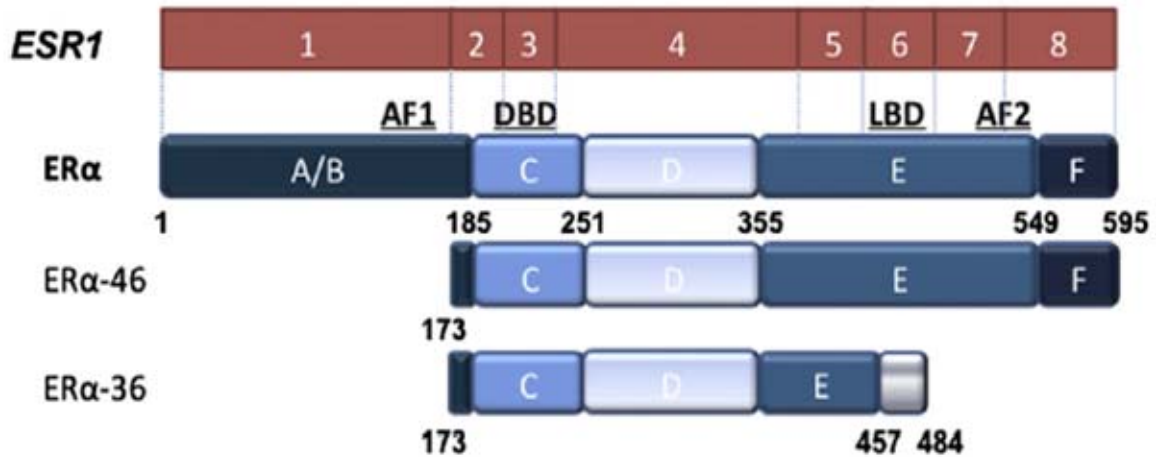
Il existe deux isoformes de récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) codés par deux gènes différents (Figure 22) (Soltysik et Czekaj, 2013; Green et al., 1986 ; Mosselman et al., 1996).

#### **III.2.1. Le récepteur ER $\alpha$**

##### **III.2.1.1. Le gène**

Le récepteur ER $\alpha$  (appelé aussi NR3A1) est codé par un gène nommé ESR1 localisé sur le bras long du chromosome 6 (6q25.1) chez l'homme. Ce gène s'étend sur environ 140 kb, il est constitué de huit exons numérotés de 1 à 8 (Gibson et Saunders, 2012).

La transcription du gène ESR1 peut être initiée à partir de plusieurs promoteurs résultant en la production d'isoformes différentes d'ARNm ayant des régions non traduites à l'extrémité 5' distinctes. L'utilisation des promoteurs alternatifs est impliquée dans l'expression tissu spécifique et la régulation transcriptionnelle (Figure 23) (Gibson et Saunders, 2012; Kos et al., 2002). Des variants d'épissage d'ER $\alpha$  ont été trouvés dans les tissus normaux et malades (cancéreux par exemple).



**Figure 24 : Le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ .**

Les 8 exons du gène ESR1 qui code la forme sauvage de la protéine ER $\alpha$  représentée sous forme de cases numérotées. Les domaines protéiques sont désignés A à F, avec la numérotation désignant le numéro des acides aminés basés sur la protéine « full length ». L'exon 1 code une grande partie du domaine A/B qui contient le domaine de transactivation AF1 en N-terminal, un objectif pour la phosphorylation. Les exons 2 et 3 contribuent aux acides aminés du domaine C (liaison d'ADN), tandis que l'exon 4 code des parties des domaines C et E, et tout le domaine D. Le domaine E est également codé par les exons 5, 6 et 7, tandis que l'exon 8 code le reste du domaine E et le domaine F. Le domaine E/F contient le LBD et le domaine AF2. La protéine ER $\alpha$  comporte 595 acides aminés. ER $\alpha$  46 est produit à partir d'un codon d'initiation alternatif et il consiste en une forme tronquée dépourvue des premiers 173 acides aminés incluant le domaine AF1. ER $\alpha$  36 est généré à partir d'un promoteur localisé dans le premier intron. Il lui manque non seulement la partie codée par le premier exon mais aussi les derniers 138 acides aminés codés par les exons 7 et 8. Il possède par contre 27 acides aminés dans la région C-terminale. ER $\alpha$  36 est dépourvu des deux domaines de transactivation AF1 et AF2. (D'après Gibson et Saunders, 2012).



**Figure 25 : Structure tri-dimensionnelle du complexe LBD-E2 du récepteur ER $\alpha$ .**

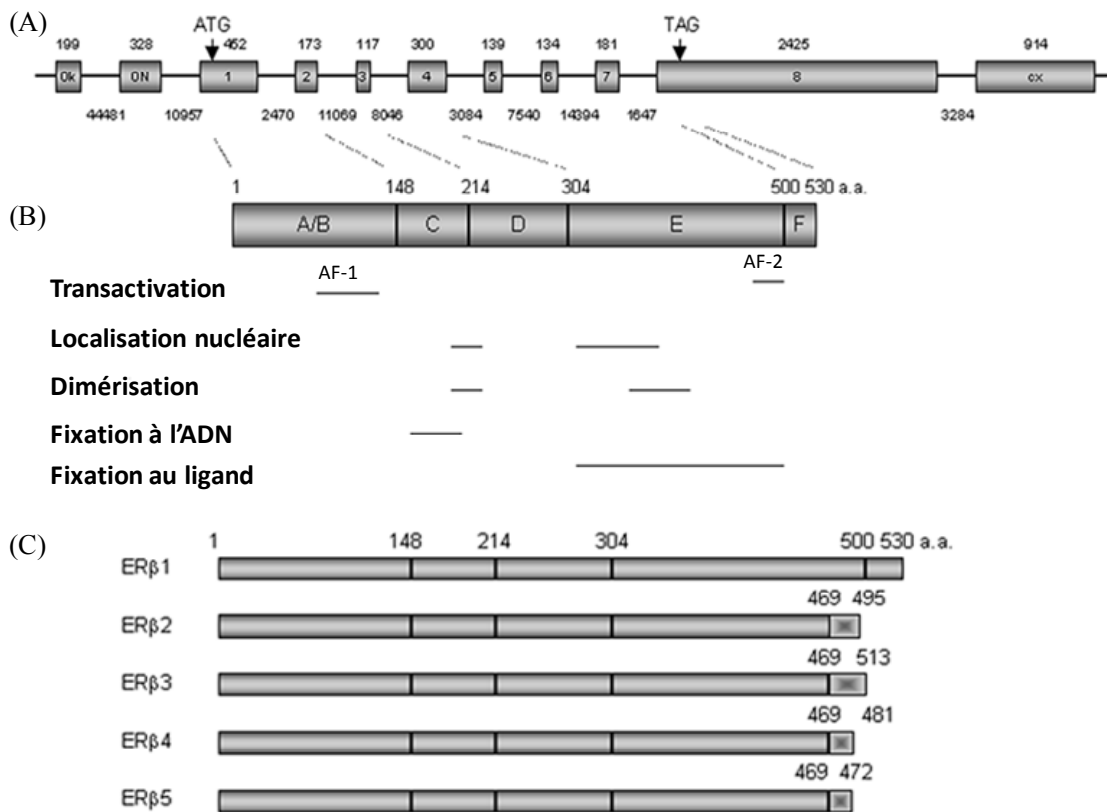
Les hélices  $\alpha$  sont représentées en violet, les feuilletts  $\beta$  en vert, et l'hélice H12 en bleu. Les atomes de l'E2 sont représentés en blanc et rouge. (D'après Ascenzi et al., 2006).

### **III.2.1.2. Structure du récepteur ER $\alpha$ (ER $\alpha$ 66)**

ER $\alpha$ , comme la plupart des récepteurs nucléaires, contient six domaines distincts qui sont étiquetés de A à F. La région N-terminale (A/B) est la région la plus variable selon les espèces. Elle contient le premier domaine de transactivation (AF1). Le domaine C de l'ER est le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Cette région qui est le domaine le plus conservé entre les ERs chez les différentes espèces, contient deux doigts de zinc. Cette région est aussi impliquée dans la dimérisation du récepteur. Le domaine D qui est une région charnière, s'étend entre le DBD et le domaine de liaison du ligand (LBD). Le LBD se trouve dans la région E de l'ER. C'est dans cette région que le ligand se fixe pour activer le domaine AF2 situé dans la partie C-terminale de la région E. Le LBD médie aussi la dimérisation et l'interaction avec les protéines de choc thermique et des protéines co-régulatrices. La région F indique la fin de l'AF2 et s'étend jusqu'à l'extrémité C-terminale du récepteur. Aucune fonction spécifique n'a encore été attribuée à cette région (Figure 24) (Nelson et Habibi, 2013).

La forme longue du récepteur ER $\alpha$  constitue une protéine composée de 595 acides aminés qui a une masse moléculaire d'environ 66kDa.

Les domaines de liaison au ligand d'ER $\alpha$  (et ER $\beta$ ) ont été cristallisés et leur structure tridimensionnelle déterminée : les deux LBD consistent en 12 hélices  $\alpha$ , avec les acides aminés dans les hélices de 3 à 12 qui tapissent la surface de la poche de liaison du ligand. On observe trois couches d'hélices  $\alpha$  antiparallèles comprenant une couche formant un noyau central de trois hélices (H5-6, H9 et H10), qui est prise en sandwich entre deux couches supplémentaires d'hélices  $\alpha$  (H1-4, H7, H8 et H11). La cavité de liaison au ligand est formée par des résidus de H3 et H6, de la boucle entre H7 et H8, H8, H11 et H12. L'hélice H12 contient la séquence essentielle à la fonction de transactivation AF2 qui participe au recrutement de co-facteurs (Figure 25) (Ascenzi et al., 2006; Gibson et Saunders, 2012).



**Figure 26 : Gène, protéine et isoformes d'ERβ.**

A) Le gène ERβ humain. Les rectangles représentent les exons, les lignes entre les rectangles représentent les introns. Les chiffres au-dessus des rectangles correspondent aux tailles des exons en paires de bases (pb). Les chiffres en dessous des lignes représentent les tailles des introns correspondants. Les exons numérotés de 1 à 8 correspondent aux régions codantes. ATG représente le codon start et TAG le codon stop. B) Domaines fonctionnels de la protéine ERβ humaine. Les domaines sont notés de A à F. Les acides aminés ainsi que la fonction de chaque domaine sont représentés. C) Isoformes d'ERβ. Le rectangle ombré indique la divergence de la région C-terminale de chaque isoforme. Les nombres d'acides aminés constituant chaque isoforme et chaque domaine sont indiqués au-dessus. (D'après Zhao et al., 2008).

### **III.2.1.3. Formes tronquées d'ER $\alpha$**

Des isoformes tronquées ont été identifiées comme ER $\alpha$ 46 (isoforme de 46kDa). ER $\alpha$ 46 est généré à partir d'un codon d'initiation interne après l'exon1 et par conséquent cette isoforme est dépourvue du domaine N-terminal AF1. ER $\alpha$ 46 peut s'hétérodimériser avec la forme longue ER $\alpha$ 66 et inhiber l'activité transcriptionnelle dépendante du domaine AF1 (Gibson et Saunders, 2012).

ER $\alpha$ 36 est une autre isoforme tronquée qui sera détaillée plus loin.

Chez l'homme, dans les cellules de cancer du sein, il a été observé sur des western blots des bandes de récepteur aux œstrogènes avec une intensité variable et différents poids moléculaires de 66, 50, 37 et 28 kDa (Lee et al., 2008).

Le rat adulte femelle exprime dans l'hypophyse antérieure une forme tronquée d'ER $\alpha$  de 20-22kDa (TERP-1). Cette protéine est localisée principalement dans les cellules lactotropes et gonadotropes, et peut moduler l'action des ERs. D'autres variants d'ER $\alpha$  de 50, 39 et 37 kDa ont été détectés (Zárate et al., 2012).

Chez la truite arc-en-ciel, il a été observé une autre isoforme d'ER $\alpha$  (ER $\alpha$ 2) qui existe probablement chez d'autres espèces de poissons (téléostéens tétraploïdes) (Nelson et Habibi, 2013).

### **III.2.2. Le récepteur ER $\beta$**

En 1996, un récepteur supplémentaire des œstrogènes a été cloné à partir de la prostate de rat, et nommé ER $\beta$ . Ce récepteur a été cloné ensuite chez de nombreuses espèces, dont l'homme et la souris (Zhao et al., 2008).

#### **III.2.2.1. Le gène codant ER $\beta$ et les différents variants d'ARNm**

Le gène humain codant ER $\beta$  (appelé Esr2) est localisé sur le chromosome 14 en position q23.2 et s'étend sur 61,2 kb. Il comporte huit exons codants et deux exons non codants (0N et 0K), un exon dans la région 5' et un exon à l'extrémité 3', qui peuvent être adjoints à l'exon 7 afin de produire une autre isoforme alternative de ER $\beta$ , appelée ER $\beta$ 2 (Figure 26) (Zhao et al., 2008).



Chez l'homme, cinq transcrits ont été identifiés (ER $\beta$ 1 à 5), issus d'épissage alternatif. ER $\beta$ 3 semble être spécifique du testicule, mais les autres transcrits ont aussi été identifiés dans différents tissus humains, ainsi que dans différentes lignées cellulaires humaines.

### **III.2.2.2. Structure de la protéine ER $\beta$**

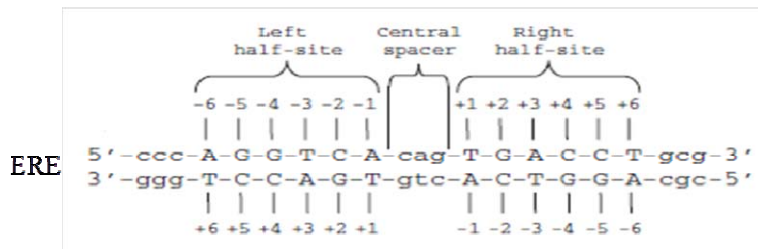
Comme ER $\alpha$ , ER $\beta$  est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, constitué de cinq domaines nommés A/B, C, D, E et F, (les fonctions de chaque domaine ont déjà été décrites dans le paragraphe consacré à ER $\alpha$ ) (Figure 26). Les cinq isoformes ont une séquence identique jusqu'à une position commune dans l'hélice 10 au niveau du LBD.

Les domaines LBD d'ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont des structures tridimensionnelles très proches. Cependant, la poche de fixation du ligand d'ER $\beta$  est significativement plus petite que celle d'ER $\alpha$  (d'environ 20%), ce qui pourrait avoir des implications sélectives pour l'affinité des ligands et la pharmacologie (Gibson et Saunders, 2012; Zhao et al., 2008). Le domaine C, domaine de liaison à l'ADN (DBD), qui est aussi impliqué dans la dimérisation du récepteur, est fortement conservé entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  (95% de similarité ou identité). Par contre, les autres domaines sont moins conservés entre les deux types de récepteurs : A/B (20%), D (30%), E (55%) et F (20%).

## **III.3. ERs et voies génomiques des œstrogènes**

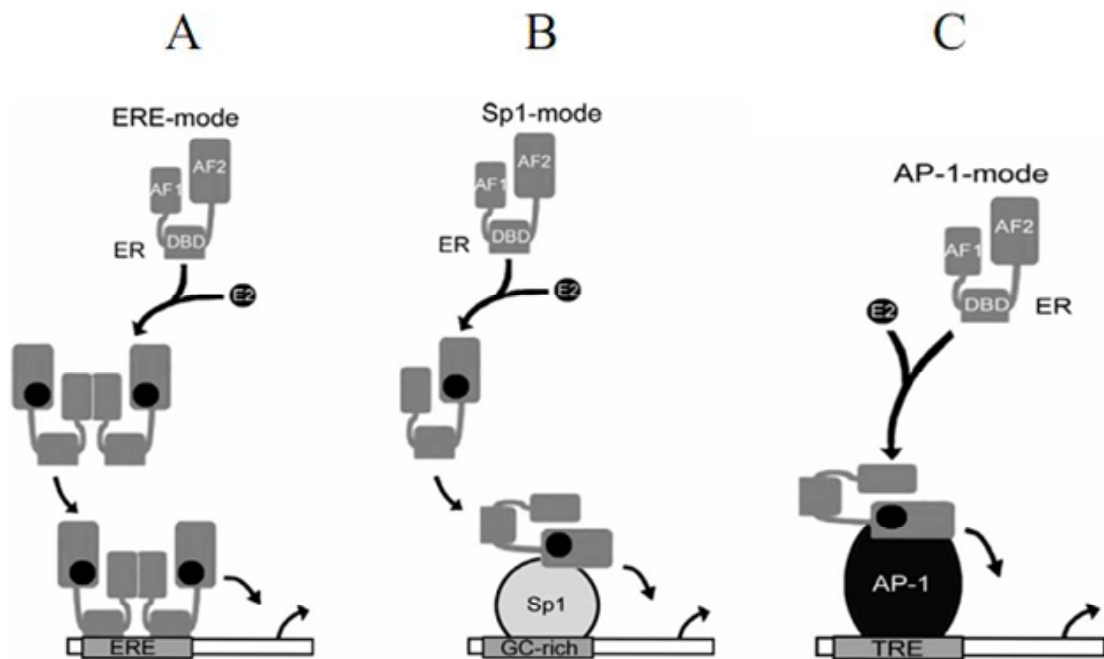
### **III.3.1. Mode d'action des ERs**

En absence de ligand, les récepteurs sont surtout présents dans le cytoplasme sous forme complexée avec des protéines de choc thermique HSP (Heat Shock Proteins), principalement HSP56, HSP70 et HSP90, qui maintiennent les récepteurs dans un état inactif. Dans le mécanisme classique d'action des œstrogènes, ceux-ci diffusent dans les cellules et se lient à ER $\alpha$  qui, sous forme d'homodimère migre dans le noyau. Le complexe peut alors se lier aux séquences appelées « éléments de réponse aux œstrogènes » (ERE) directement sur le promoteur des gènes cibles (voie génomique directe). Les deux doigts de zinc dans le



**Figure 27 : Séquence consensus de l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE).**

Les différents nucléotides de chaque demi-site (à gauche et à droite) sont numérotés par rapport à un espace central de 3 paires de bases, CAG sur le brin sens (en haut) et GTC sur l'antisens (en bas). (D'après Deegan et al., 2011).



**Figure 28 : Représentation schématique de trois modes par lesquels ERα module la transcription des gènes cibles.** La voie classique en A représente l'interaction avec un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) consensus. Les deux autres modèles (B et C) représentent les fixations indirectes via des interactions avec des protéines sur les sites Sp-1 et AP-1. (D'après Ascenzi et al, 2006).

domaine DBD se replie afin de former une structure compacte tridimensionnelle, ce qui permet au récepteur d'interagir avec les EREs (Nelson et Habibi, 2013).

Les EREs sont constitués d'une séquence palindromique en répétition inversée de 13 paires de bases contenant 3 paires de bases de nature variable (Figure 27). La reconnaissance de l'ADN est réalisée par la P-box (Proximal domain), une série d'acides aminés à la base du premier doigt de zinc du DBD. A la base du deuxième doigt de zinc se trouve la D-box (Distal box), une série d'acides aminés impliqués dans la dimérisation du récepteur (Ascenzi et al., 2006; Nelson et Habibi, 2013).

ER $\alpha$  peut aussi se fixer sur des promoteurs qui contiennent des ERE imparfaits ou des demi-sites ERE (Zou et al., 2009). La fixation sur l'ADN peut aussi par le biais d'interactions protéine-protéine avec des facteurs de transcription comme la protéine activatrice 1 (AP-1), NF $\kappa$ B ou la protéine SP-1 qui reconnaissent d'autres séquences (voie génomique indirecte) (Figure 28).

L'activation de l'expression des gènes cibles sera permise par la liaison d'ER $\alpha$  activé par son ligand avec des co-activateurs comme la famille p160, CBP et p300, qui permettront le remodelage de la chromatine indispensable à la transcription qui nécessitera le recrutement de l'ADN polymérase II. La liaison d'ER $\alpha$  avec des co-répresseurs entraînera la répression du gène cible.

Une activation ligand-indépendante des ER peut aussi avoir lieu. Elle est induite en absence de ligand par une phosphorylation de l'ER. Les kinases telles que MAPK ou PKA ont été décrites comme pouvant médier cette activation (Cenni et Picard, 1999; Etique et al., 2007). Ces phosphorylations des ERs induisent une augmentation de l'affinité du récepteur pour la séquence ERE et une activation de la transcription de gènes cibles. Il ne se produit pas dans ce cas de protéolyse du récepteur après son activation contrairement à ce qui est observé en réponse à l'œstradiol ou à l'anti-œstrogènes Tamoxifène (Etique et al., 2007).

### III.3.2. Rôles des ERs

Les œstrogènes jouent un rôle clef au cours du développement et dans la physiologie de nombreux tissus. Ce sont des régulateurs de la fertilité chez les femelles et chez les mâles. Ces hormones sont aussi impliquées dans des pathologies comme l'ostéoporose, des maladies cardio-vasculaires, des maladies neurodégénératives et des cancers (sein, endomètre principalement). Je décrirai ici essentiellement les fonctions associées aux gonades.

Chez les souris femelles dont le gène codant l'aromatase (responsable de la synthèse des œstrogènes) a été invalidé, on observe une stérilité liée à un arrêt de la croissance folliculaire au stade antral.

L'implication des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans les différents processus régulés par les œstrogènes a été étudiée *in vivo* lors d'expériences d'invalidation de ces gènes sur des modèles murins (Arnal et al., 2013).

ER $\alpha$  est surtout impliqué dans le développement et la fonction de la glande mammaire et de l'utérus, ainsi que dans le maintien de l'homéostasie métabolique et osseuse. Les souris femelles ER $\alpha$ -KO sont stériles. Leurs ovaires présentent des follicules hémorragiques et n'ovulent pas. ER $\alpha$  est surtout présent dans l'épithélium ovarien de surface, dans les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque des follicules matures (Gibson et Saunders, 2012).

Lorsque l'invalidation du gène codant ER $\alpha$  ne touche que les cellules de la thèque, un phénotype similaire à celui des souris ER $\alpha$ -KO est observé. Cependant des études immunohistochimiques ont aussi rapporté la présence d'ER $\beta$  dans tous les types cellulaires somatiques de l'ovaire. Les souris femelles ER $\beta$ -KO ont un fonctionnement ovarien réduit par rapport aux témoins, leurs portées sont moins nombreuses et plus petites. Les souris ayant subi une double invalidation (ER $\alpha\beta$ -KO) sont déficientes en cellules de la granulosa qui pourraient se transdifférencier en cellules de Sertoli.

Chez les souris mâles, les œstrogènes jouent aussi un rôle dans la physiologie des gonades. Une biosynthèse d'œstrogènes a lieu localement dans le testicule, avec l'aromatase qui est exprimée dans les cellules de Leydig et certaines populations de cellules germinales (spermatocytes, spermatides rondes et spermatozoïdes) (Carreau et al., 2007, 2010).

Les souris AromKO sont stériles à l'âge adulte en raison d'anomalies de la spermatogenèse (réduction du nombre et de la motilité des spermatozoïdes).

ER $\alpha$  est détecté dans la gonade indifférenciée dès 10 jpc chez la souris. Il est localisé dans les cellules de Leydig des rongeurs mais n'est pas présent dans le testicule humain (Saunders et al., 2001). Les souris mâles ER $\alpha$ -KO ont un phénotype testiculaire normal jusqu'à la puberté mais ensuite leurs testicules dégénèrent et s'atrophient par manque de résorption de fluide dans l'épididyme.

ER $\beta$  a été détecté dans le testicule dès 14 jpc chez la souris. Il est localisé majoritairement dans les gonocytes mais aussi dans les cellules de Leydig chez la souris et dans les cellules de Sertoli chez toutes les espèces étudiées (O'Donnell et al., 2001).

Les souris mâles ER $\beta$ -KO montrent par contre un phénotype testiculaire normal. Ces souris montrent aussi des signes d'hyperplasie de la prostate avec l'âge. ER $\beta$  joue un rôle antiprolifératif et pro-différenciateur au sein de l'épithélium prostatique (Zhao et al., 2008).

Les souris mâles ER $\alpha\beta$ -KO présentent une abolition de leur comportement sexuel à l'état adulte (Ogawa et al., 2000).

Les œstrogènes jouent aussi un rôle dans la fonction de reproduction masculine durant la vie fœtale. Chez les souris mâles ER $\beta$ -KO, on observe une augmentation de 50% du nombre de gonocytes à 2 jpp qui résulte d'une activité mitotique accrue et d'une activité apoptotique réduite, sans que le nombre de cellules de Sertoli soit modifié (Habert et al., 2006). Les souris mâles ER $\beta$ -KO ne montrent pas de modification de la stéroïdogénèse.

Chez les souris mâles ER $\alpha$ -KO il n'y a pas d'augmentation du nombre de gonocytes ou de cellules de Sertoli, mais la production de testostérone augmente (Habert et al., 2006). Cette augmentation est détectée à 13,5 jpc et résulte d'une action directe des œstrogènes sans modification de la sécrétion de LH.

#### **III.4. Les récepteurs membranaires des œstrogènes**

Des évidences croissantes montrent que les œstrogènes peuvent également agir par des voies non génomiques. Par exemple l'œstradiol induit très rapidement et transitoirement l'activation de plusieurs kinases comme les MAPK (mitogen-activated protein kinases), PI3K (phosphoinositide 3-kinase) ou PKC (protéine kinase C), de phosphatases ou de l'adénylcyclase. Il peut aussi induire rapidement des changements dans le niveau de calcium intracellulaire. .

Ces MISS (Membrane Initiated Steroid Signaling) sont médiés par des ERs intracellulaires localisés au niveau la membrane plasmique dans les cavéoles (micro-invaginations

membranaires). Parmi les diverses modifications post-traductionnelles, la palmitoylation de la cystéine 447 apparaît importante pour l'emplacement à la membrane via une interaction physique avec la cavéole 1. D'autres protéines telles que la protéine adaptatrice (MNAR) ou striatine ont également été présentées pour participer à l'action membranaire des œstrogènes (Arnal et al., 2013).

Lorsque l'ER est localisé à la membrane plasmique, il fait partie d'un complexe avec de nombreuses protéines de signalisation (signalosome), dont la nature dépend du type cellulaire. Dans ce complexe, l'ER joue un rôle central. Il est près de molécules telles que l'IGFR (Insulin-Like Growth Factor1 Receptor) ou l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) récepteur. La protéine RAS (petite protéine G), la protéine adaptatrice SHC (active la voie MAPK en recrutant Grb2/Sos), le proto-oncogène c-Src et la PI3K, ce qui rationalise la production de second messenger pour induire les ERE et assurer une activation de la transcription de gènes cibles (Soltysik et Czekaj, 2013).

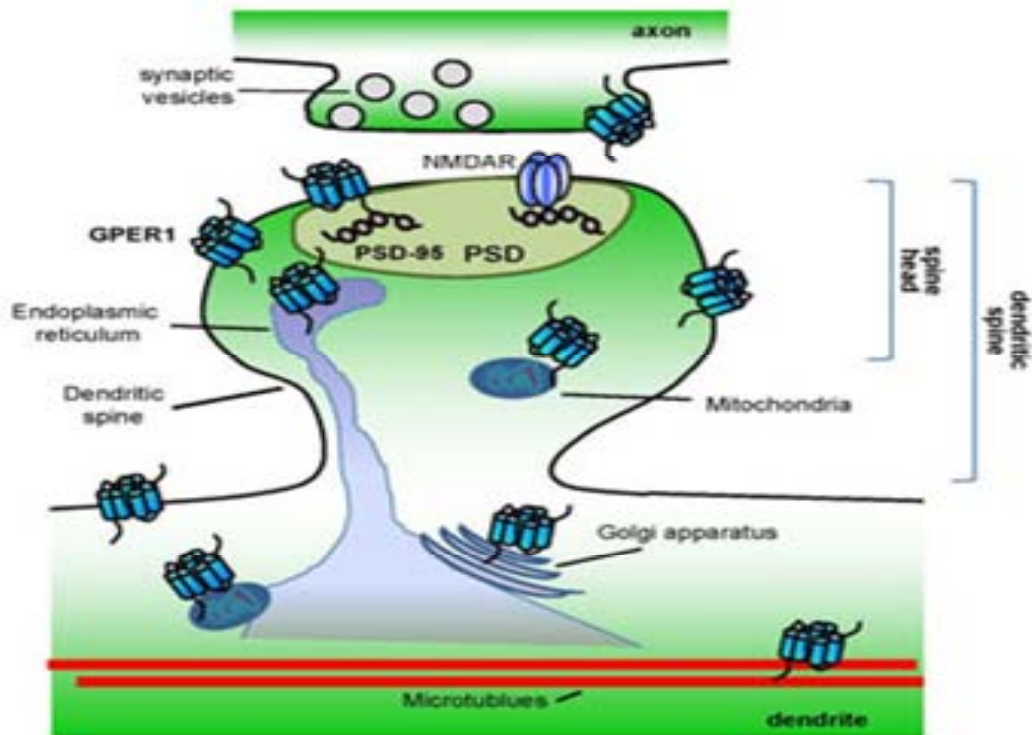
#### **III.4.1. Récepteur des œstrogènes couplé aux protéines G (GPER)**

Précédemment nous avons décrit les récepteurs nucléaires des œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ). Les œstrogènes peuvent aussi interagir avec de réels récepteurs membranaires. Un récepteur membranaire appelé initialement GPR30 puis GPER (G Protein-coupled Estrogen Receptor) est capable de lier l'œstradiol et d'initier des cascades de signalisation intracellulaires (Nelson et Habibi, 2013; Soltysik et Czekaj, 2013).

##### **III.4.1.1. La protéine GPER**

Le récepteur à 7 domaines transmembranaires GPER fait partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) (Barton, 2012; Rago et al., 2011; Ruan et al., 2012). Le gène codant GPER est localisé en position 7p22.3 (Soltysik et Czekaj, 2013; Carmeci et al., 1997).

Sa structure à 7 passages transmembranaires implique son insertion dans une membrane. Des études ont suggéré que GPER est en effet incorporé dans la membrane plasmique, puisqu'il co-localise avec la concanavaline A (un marqueur de la membrane). Cette localisation favorise également le couplage avec des protéines G hétérotrimériques G $\alpha$  et G $\beta/\gamma$  lors de l'activation de la signalisation intracellulaire. Par ailleurs, il a également été montré une co-



**Figure 29 : Localisation de GPER au niveau de synapses.**

GPER a été décrit au niveau des synapses dans la région CA1 de l'hippocampe et du striatum dorsal. Ce récepteur est rapporté être associé à la membrane plasmatique et au niveau des membranes internes, y compris le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries. (D'après Srivastava et Evans, 2013).

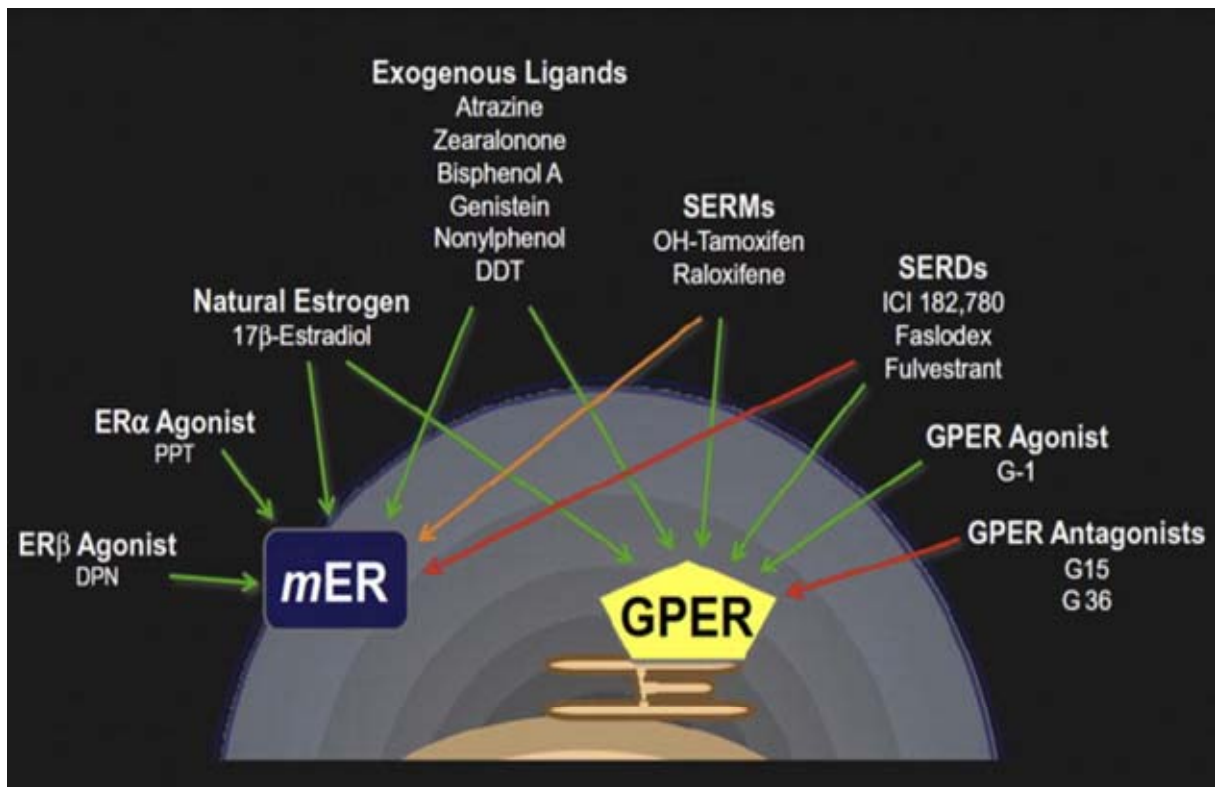
localisation avec les marqueurs du réticulum endoplasmique, de la mitochondrie et de l'appareil de Golgi (Figure 29) (Srivastava et Evans, 2013).

Chez les souris et le rat, l'analyse des ARNm de GPER a montré que ce récepteur est largement présent dans différents tissus. Dans le système nerveux central, une expression forte de GPER est détectée dans l'iso-cortex, l'hippocampe, la couche mitrale du bulbe olfactif, le cortex piriforme et le noyau hypothalamique ventro-médian. Concernant les autres organes, l'expression de GPER a été détectée dans le cœur, la médullosurrénale, le bassinnet du rein, le poumon, les glandes mammaires, l'utérus, l'ovaire et le testicule. Dans l'ovaire l'expression apparaît principalement dans les cellules de la granulosa, alors que dans le testicule, elle est détectée dans les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig, les spermatocytes et les spermatogonies (Soltysik et Czekaj, 2013).

Ce récepteur est exprimé dans des cellules normales et dans des cellules néoplasiques, notamment dans le cancer de l'ovaire, du sein, de l'endomètre et de la thyroïde. Concernant les testicules, GPER a été détecté dans les cellules somatiques normales ou cancéreuses et dans les tumeurs d'origine germinale (Rago et al., 2011). L'activation de GPER est associée à différentes fonctions : neuroendocrines et cérébrales, système immunitaire, métabolisme, vasculaire et myocardique, rénale, reproduction et développement (Prossnitz et Barton, 2014).

Des études *in vivo* visant à évaluer l'impact de l'inactivation du gène codant GPER ont été réalisées (Soltysik et Czekaj, 2013). Cependant les souris GPER-KO ne présentent pas un phénotype homogène. Dans les quatre modèles disponibles, aucune perturbation de l'appareil reproducteur n'a été observée et les souris des deux sexes sont fertiles. Dans deux modèles GPER-KO, le poids des animaux n'était pas affecté même en cas de régime riche en graisse alors qu'un autre modèle montre une perte de poids et le quatrième une augmentation de poids. Un des quatre modèles montre une augmentation de la taille des os chez les mâles mais cela est observé chez les femelles dans un second modèle et aucune anomalie n'est détectée chez un troisième dans les deux sexes. Ces phénotypes différents pourraient s'expliquer par le fait que les méthodes utilisées pour générer les souris KO étaient différentes (Soltysik et Czekaj, 2013).





**Figure 30 : Agonistes et antagonistes des sous-populations de récepteurs des oestrogènes associées à la membrane (mER).**

Les effets peuvent être induits par des œstrogène naturels (17 $\beta$ -œstradiol) ainsi que par des drogues synthétiques (agonistes sélectifs pour l'ER $\alpha$ , ER $\beta$  ou GPER), SERMs, SERDs, des substances d'origine végétale (génistéine), ou des polluants environnementaux très stables et xéno-œstrogènes (atrazine, zearalonone, bisphénol A, nonylphénol, ou DDT).

Flèches vertes: activation. Flèches rouges: inhibition. Flèche orange: activation ou inhibition tissus-dépendante. (D'après Barton, 2012).

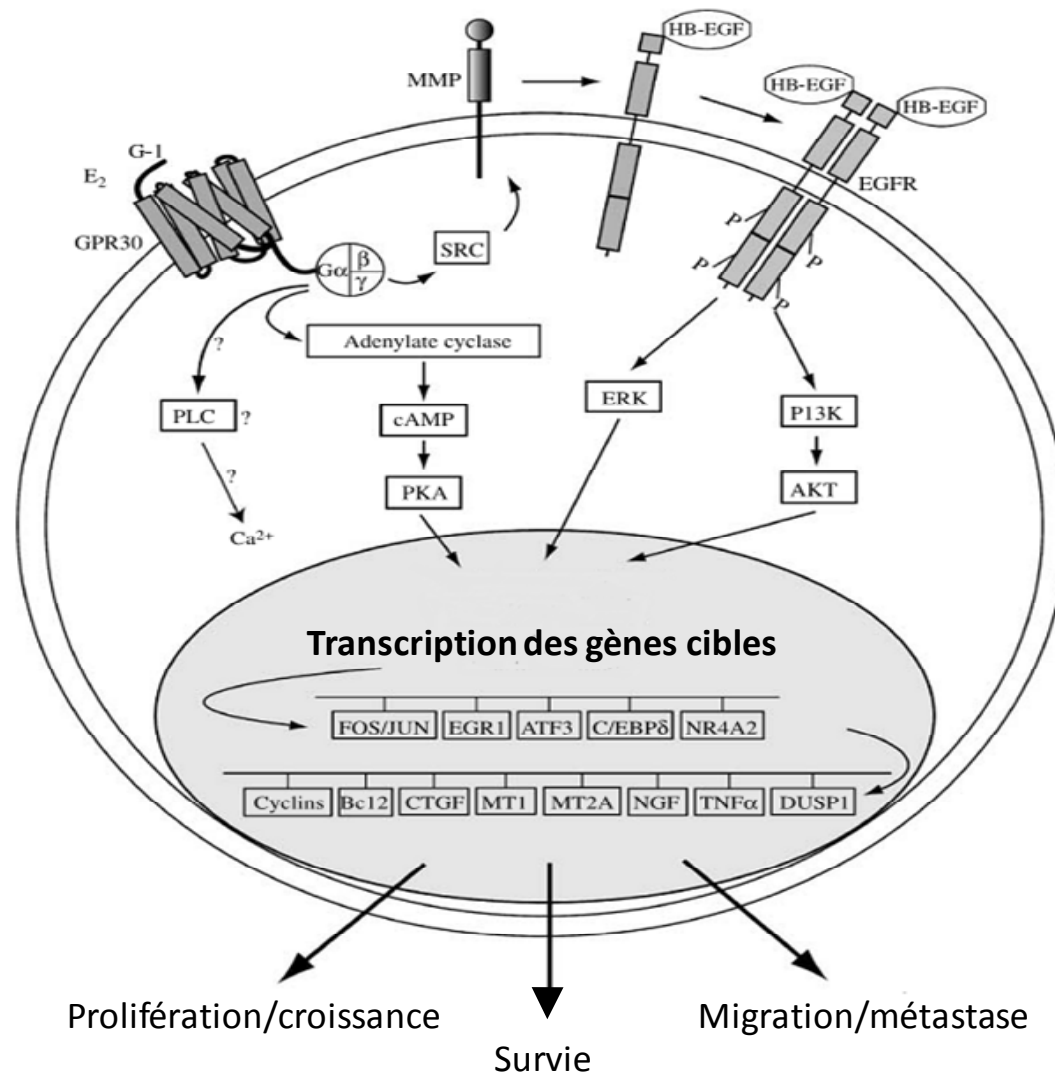
### **III.4.1.2. Signalisation dépendante de GPER**

Plusieurs études ont démontré que la réponse œstrogénique est observée non seulement dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 qui expriment les récepteurs ER $\alpha$ , ER $\beta$  et GPER, mais également dans les cellules tumorales mammaires SKBR3 qui n'expriment pas les ERs mais seulement GPER (Ruan et al., 2012).

Les travaux de Filardo et son équipe ont montré que la phosphorylation rapide des protéines kinases MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) de type ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase) en réponse à l'E2 était dépendante de la présence de GPER (Filardo et al., 2000). Ils ont également montré que l'activation d'ERK1/2 sous l'effet de l'E2 résulte d'une transactivation du récepteur à l'EGF ou EGFR, qui est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. D'autres voies de signalisation (non génomiques), peuvent être également induites via GPER telle que la voie PKA activée à la suite d'une augmentation de l'AMPc (Filardo et al., 2002). En 2005, la liaison de l'E2 à GPER a été démontrée par plusieurs équipes utilisant des approches différentes (E2 tritié, dérivé fluorescent de l'E2) (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005). Au sein des stéroïdes, l'œstradiol montre une sélectivité pour GPER 1000 fois supérieure à celle de la testostérone, du cortisol ou de la progestérone (Thomas et al., 2005).

L'anti-œstrogène ICI182 780 (un « SERD » pour selective estrogen receptor down-regulator) peut aussi se lier à GPER mais contrairement à son action sur les ERs, il a ici un effet activateur (Filardo et al., 2000). De la même façon, le 4-hydroxy tamoxifène (métabolite actif du tamoxifène qui est un « SERM » pour selective estrogen receptor modulator) se lie aussi à GPER et agit comme agoniste (Revankar et al., 2005). De nombreux composés de synthèse comme les plastifiants ou des pesticides dont les effets œstrogéno-mimétiques sont connus, peuvent aussi activer GPER (Prossnitz et Barton, 2014). Un agoniste sélectif (G-1) a été décrit en 2006 (Bologa et al., 2006). Cette découverte ainsi que l'identification de plusieurs antagonistes (G-15) ont permis d'étudier la signalisation et les fonctions de GPER (Figure 30) (Dennis et al., 2009).

Deux sous-unités G $\beta\alpha$  et G $\alpha$ s ainsi que la protéine SRC peuvent jouer un rôle dans la signalisation. En aval des protéines G, la signalisation conduit à l'activation la tyrosine kinase SRC, à la phosphorylation de la protéine adaptatrice SHC, et probablement grâce à une activation de métalloprotéases permet la libération extracellulaire du facteur de croissance



**Figure 31 : Représentation schématique des voies de signalisation de GPER/GPR30.**

À la suite de l'activation de GPER/GPR30 par un ligand physiologique, comme l'œstradiol (E2) ou son ligand spécifique G-1, GPR30 adopte une conformation active qui conduit à l'échange de GDP par du GTP sur la protéine G $\alpha$ s, la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  des sous-unités  $\beta\gamma$  et la mise en route d'une série d'événements de signalisation intracellulaire. Ces événements seraient l'activation de la voie PKA, la stimulation des flux de calcium ou encore l'activation de récepteurs à l'EGF et l'activation de kinases en aval, notamment la voie des ERK, ou la voie PI3K/AKT.

PLC, phospholipase C ; cAMP, adénosine monophosphate cyclique; PKA, protéine kinase A; SRC, rox sarcoma virus; MMP, matrix metallo protease; HB-EGF, heparan-bound epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERK, extra cellular signal regulated kinase; PI3K, phosphoinositol triphosphate-dependent kinase. (D'après Maggiolini et Picard, 2010).

épidermique HB-EGF (Heparan-Bound Epidermal Growth Factor). Celui-ci stimule le récepteur de l'EGF (EGFR) conduisant à une activation de la voie MAPK (Figure 31) (Maggiolini et Picard, 2010). L'activation post-traductionnelle rapide d'un premier niveau de facteurs de transcription, y compris SRF, CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding protein) et le membre de la famille ETS, favorise l'expression d'une deuxième vague de facteurs de transcription tels que FOS, JUN, EGR1, ATF3, C/EP6 et NR4A2 (Figure 31) (Maggiolini et Picard, 2010).

D'autre part, dans la lignée immortalisée de cellules rénales de singe (COS-7), la transfection stable de GPER stimule l'activation de PI3K et la libération de  $Ca^{2+}$  par des concentrations physiologiques d'E2 (Soltysik et Czekaj, 2013).

Chez la souris, dans la lignée spermatogoniale GC-1, l'E2 et l'agoniste spécifique de GPER (G-1) induisent aussi l'expression de c-fos et de cycline D1 (gène impliqué dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire) et stimulent la prolifération cellulaire via GPER.

Un cross-talk entre GPER et les récepteurs  $ER\alpha$  a été rapporté. GPER est requis tout comme  $ER\alpha$  pour médier les effets de l'E2 dans les cellules cancéreuses (Albanito et al., 2007).

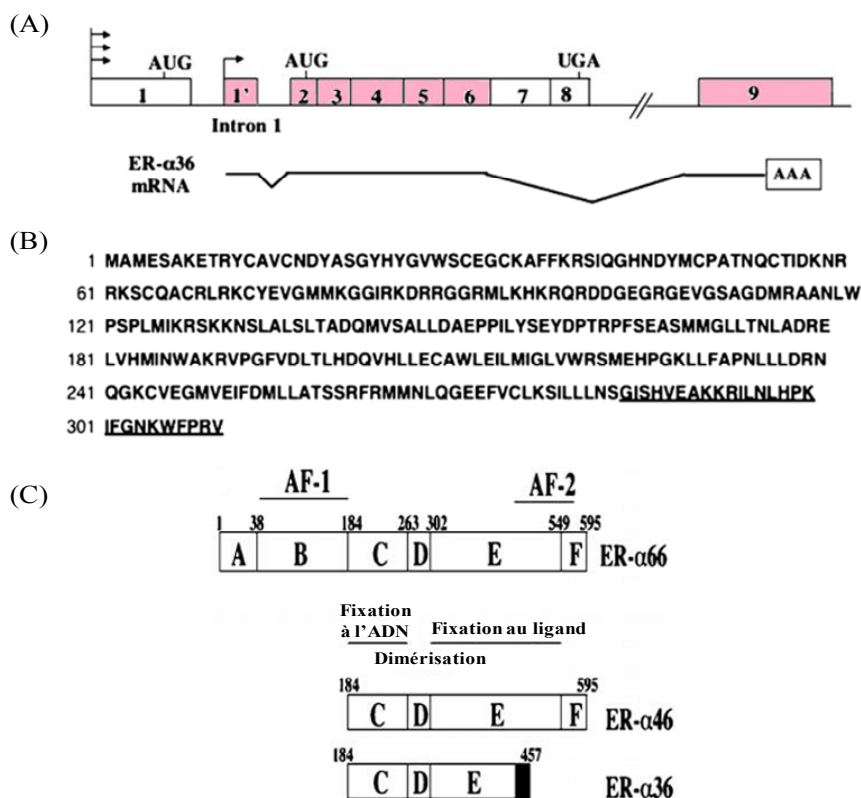
GPER peut inhiber les fonctions d' $ER\alpha$  dans les cellules épithéliales utérines (Gao et al., 2011). De plus, un variant d' $ER\alpha$ ,  $ER\alpha36$  pourrait intervenir dans l'activation des voies de signalisation non génomiques activées par l'E2, en aval de GPER, ou indépendamment de ce dernier, dans les différentes lignées cellulaires cancéreuses mammaires (Kang et al., 2010; Zhang et al., 2011).

### **III.4.2. Le récepteur $ER\alpha36$**

#### **III.4.2.1. Découverte et structure**

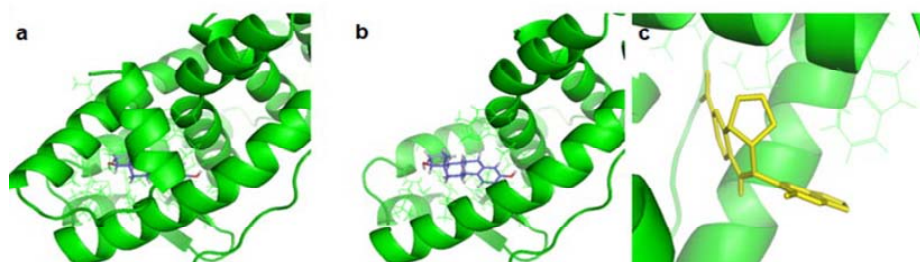
En 2005, Wang et son équipe ont cloné l'ADNc d'un variant d'épissage de  $ER\alpha66$ , appelé  $ER\alpha36$  (en raison de sa masse moléculaire de 36 kDa) (Wang et al., 2005).

$ER\alpha36$  est généré à partir d'un promoteur localisé dans le premier intron du gène codant  $ER\alpha66$ , indiquant que son expression est régulée différemment de celle d' $ER\alpha66$  (Kang et al., 2010). L'épissage fait que les deux derniers exons (7 et 8) sont remplacés par l'exon 9.  $ER\alpha36$  est dépourvu des deux domaines de transactivation (AF1 et AF2) qui sont présents dans



**Figure 32 : ERα36, une nouvelle isoforme d'ERα.**

A) Organisation génomique du gène ERα36 humain. Les rectangles colorés en rose représentent les exons du gène ERα36. Les exons numérotés de 1 à 8 correspondent au gène ERα66. L'intron 1 contenant un exon non-codant dit « exon 1' » à partir duquel ERα36 a été généré est indiqué. AUG représente le codon start et UGA le codon stop. La structure de l'ARNm de ERα36 est indiquée. B) Séquence en acides aminés d'ERα36, les derniers 27 acides aminés spécifiques d'ERα36 sont soulignés. C) Domaines fonctionnels des isoformes d'ERα humaine. Les domaines sont notés de A à F. Le nombre d'acides aminés et la fonction de chaque domaine sont représentés. Le domaine qui contient les derniers 27 acides aminés spécifiques d'ERα36 est en noir. (D'après Wang et al., 2005).



**Figure 33 : Structures des récepteurs ERα36 et ERα66.**

Les récepteurs ERα66 (a) et ERα36 (b) sont colorés en vert. Le ligand E2 (17β-œstradiol) est coloré en bleu. La conformation est tirée de base des données de co-cristallisation ERα66/agoniste (Protein Data Bank Code: 1ERE). Le ligand-binding domain d'ERα36 peut aussi accueillir l'agoniste G1 (c). Les structures optimales de G1 docké dans ERα36 sont basées sur la modélisation (AutoDock) des interactions entre protéines. G1 apparaît en jaune, et les résidus complémentaires sur ERα36 sont indiqués en vert. (D'après Kang et al., 2010).

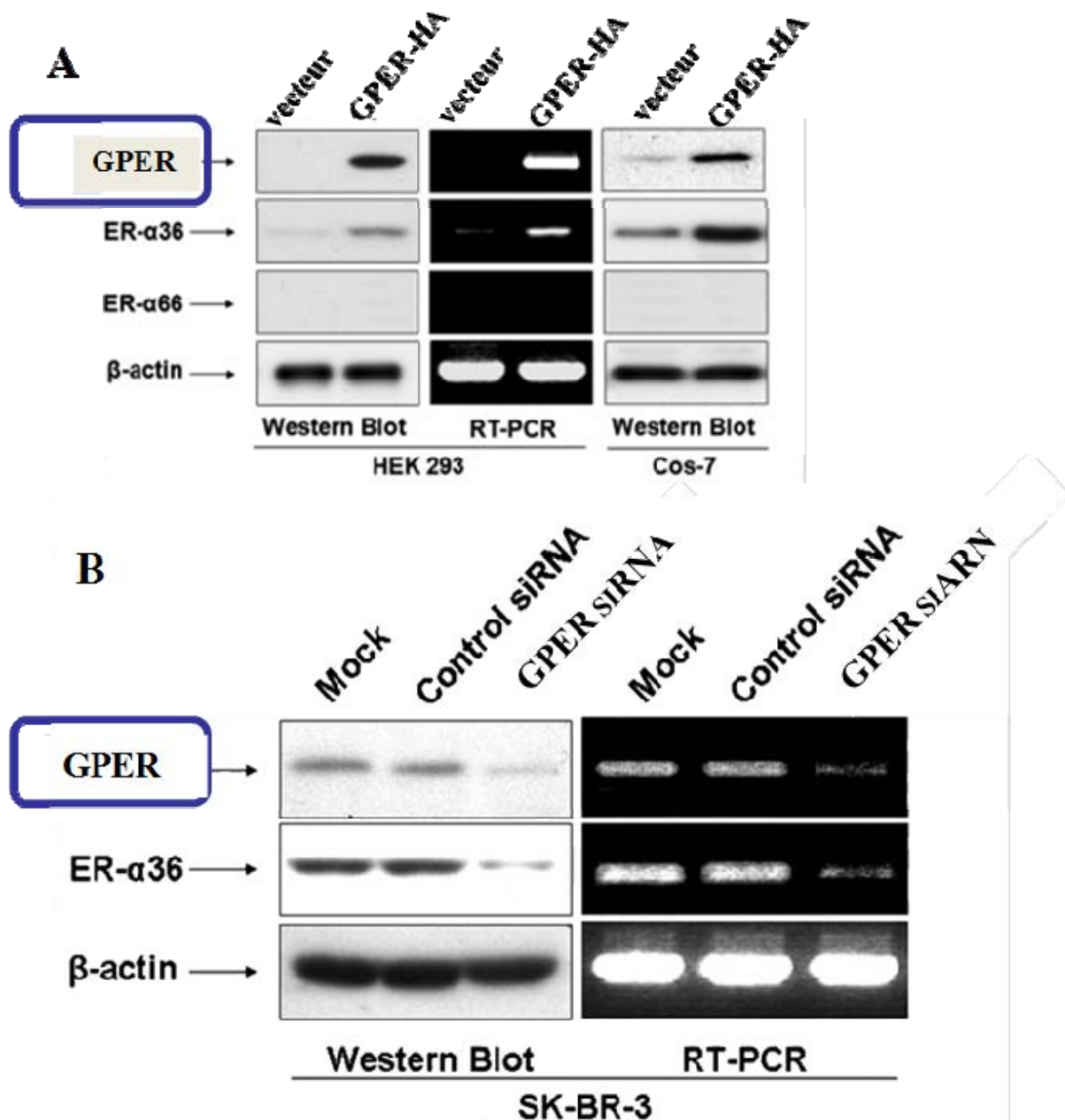
ER $\alpha$ 66, mais il conserve son domaine de liaison à l'ADN, le domaine de dimérisation partiel, le domaine de liaison au ligand et trois sites de myristoylation potentiels situés près de l'extrémité N-terminale sur les résidus 25-30 (GVWSCE), 76-81 (GMMKGG) et 171-176 (ELLTNL) (Figure 32) (Lin et al., 2010; Wang et al., 2005). L'exon 9 code une nouvelle séquence courte de 27 acides aminés qui n'est pas présente dans ER $\alpha$ 66 (Figure 32) (Pelekanou et al., 2012; Wang et al., 2005).

ER $\alpha$ 36 est dépourvu des hélices 9-12 du domaine de liaison au ligand par rapport à ER $\alpha$ 66. Kang et son équipe ont montré que le domaine de liaison au ligand d'ER $\alpha$ 36 possède une conformation différente de celle d'ER $\alpha$ 66 avec une poche de liaison plus ouverte, ce qui suggère qu'ER $\alpha$ 36 a un spectre de ligands différent de celui d'ER $\alpha$ 66. Ces auteurs ont également montré que G-1 (agoniste de GPER) est susceptible d'entrer dans la poche de liaison au ligand d'ER $\alpha$ 36 (Figure 33) (Kang et al., 2010).

ER $\alpha$ 36 possède 310 acides aminés dont les 27 derniers sont spécifiques de ce récepteur ; ils remplacent les 138 derniers acides aminés codés par les exons 7 et 8 du gène codant ER $\alpha$ 66.

Contrairement à ER $\alpha$ 66, qui est souvent détecté dans le noyau de la cellule, ER $\alpha$ 36 est localisé principalement dans le cytoplasme et à proximité de la membrane plasmique où il médie les effets non génomiques des œstrogènes (Lee et al., 2008; Wang et al., 2006; Zhang et Wang, 2013). Dans les cellules HEK 293 transfectées avec un vecteur permettant d'exprimer ER $\alpha$ 36, on observe la phosphorylation des MAPK ERK1/2 en réponse à l'E2 (Wang et al., 2006). ER $\alpha$ 36 agit comme un effecteur dominant-négatif de ER $\alpha$ 66 (Lee et al., 2008).

L'étude de Zou et collaborateurs montre que l'expression d'ER $\alpha$ 66 supprime l'expression de ER $\alpha$ 36 (Zou et al., 2009). Ces auteurs ont cloné la séquence 5' flanquante d'ER $\alpha$ 36 et ils ont trouvé que la séquence clonée possède une activité de promoteur fort. Ils y ont identifié de nombreux sites SP1 et AP-1 ainsi qu'un demi-site ERE imparfait qui chevauche un site AP1, susceptible d'être un site de liaison pour ER $\alpha$ 66. Dans les cellules HEK-293 qui ont un taux très faible d'ER endogène, la co-transfection d'un vecteur exprimant ER $\alpha$ 66 avec un plasmide exprimant un gène rapporteur sous contrôle du promoteur d'ER $\alpha$ 36 montre une suppression par deux niveaux d'expression du gène rapporteur. Cet effet n'est pas observé si ER $\alpha$ 66 est transfecté simultanément avec un vecteur permettant l'expression d'ER $\alpha$ 36.



**Figure 34 : Relation entre GPER et ER $\alpha$ 36.**

A) Des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney) et COS-7 transfectées de façon transitoire avec un vecteur permettant l'expression de GPER-HA (Hemagglutinin) sont comparées aux cellules témoins transfectées avec un vecteur vide. Les analyses par Western blot et par RT-PCR ont été utilisées pour étudier les niveaux d'expression de GPER et ER $\alpha$ 36 et ER $\alpha$ 66. B) Des cellules SK-BR-3 (cellules de cancer du sein, ER-négative) ont été transfectées avec des ARN interférents (siRNA) dirigés contre GPER ou avec des siRNA témoins. Les niveaux d'expression d'ER $\alpha$ 36 et de GPER ont été évalués par Western blot et par RT-PCR. (D'après Kang et al, 2010).

Les travaux de Kang et collaborateurs ont montré que GPER induit l'expression d'ER $\alpha$ 36 et qu'ER $\alpha$ 36 médie l'action non-génomique des œstrogènes (Figure 34) (Kang et al., 2010).

Contrairement à GPER, ER $\alpha$ 36 est activé non seulement par le 17 $\beta$ -œstradiol mais aussi par l'œstrone ou l'œstriol. Son activation induit l'activation d'ERK1/2. Le tamoxifène et l'ICI182 780 agissent comme agonistes sur ER $\alpha$ 36. En revanche, l'œstriol qui est un antagoniste de GPER a une action agoniste sur ER $\alpha$ 36.

#### **III.4.2.2. ER $\alpha$ 36 et cancers**

ER $\alpha$ 36 est exprimé dans différents types de cancers, comme le cancer du sein, de l'endomètre, le cancer colorectal et le cancer gastrique.

En ce qui concerne le cancer du sein, des études réalisées sur les lignées cellulaires et les tissus cancéreux mammaires montrent qu'ER $\alpha$ 36 est exprimé non seulement dans les cellules ER $\alpha$ 66-positives (70% de l'ensemble de ces tumeurs) comme MCF-7 mais aussi dans les cellules ER $\alpha$ 66-négatives (30% de l'ensemble de ces tumeurs) comme MDA-MB-231 et MDA-MB-436 (Li et al., 2013b; Rao et al., 2011). D'autre part, l'expression d'ER $\alpha$ 36 n'est pas détectée dans les cellules mammaires non transformées comme celles de la lignée MCF10A (Rao et al., 2011).

Zhang et son équipe ont trouvé que le niveau d'expression d'ER $\alpha$ 36 est plus élevé dans les tumeurs ER $\alpha$ 66-négatives par rapport à celles qui sont ER $\alpha$ 66-positives (Zhang et al., 2012a). De plus, d'autres études ont également montré qu'ER $\alpha$ 36 est exprimé de façon prédominante dans les cancers du sein triple-négatifs, qui n'expriment ni le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ 66, ni le récepteur de la progestérone PR, ni le récepteur HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2) (Pelekanou et al., 2012; Zhang et al., 2011).

Dans ces tumeurs triples négatives, la fraction membranaire d'ER $\alpha$ 36 est inversement corrélée à l'expression du miRNA210 qui est un miR proangiogénique. La survie des patientes dont la fraction membranaire d'ER $\alpha$ 36 est plus importante est supérieure de 16 mois (Pelekanou et al., 2012).



Zhang et al. ont montré dans leurs travaux sur les cellules cancéreuses mammaires ER $\alpha$ 66 négatives MDA-MB-231 et MDA-MB-436, qu'ER $\alpha$ 36 intervient dans l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK via l'induction du récepteur de l'EGF (EGFR) (Zhang et al., 2011). En outre, sur ces cellules ER $\alpha$ 36 médie l'effet mitogénique en réponse à de faibles concentrations (concentration physiologique) d'œstrogènes (1nM) agissant via la voie de signalisation EGFR/Src/STAT5 (Zhang et al., 2012c).

La même équipe a montré que G1, un agoniste sélectif pour GPER, stimule l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ 36. En effet, les effets des œstrogènes sur GPER sont atteints principalement grâce à une augmentation de l'expression d'ER $\alpha$ 36 (Kang et al., 2010).

Le tamoxifène (TAM) est un antagoniste des récepteurs ER $\alpha$ 66 communément utilisé en thérapeutique. Il permet de réduire l'agressivité de la tumeur dans le cancer du sein ER $\alpha$ 66 positif et empêche la récurrence du cancer après une chimiothérapie ou une radiothérapie (Chaudhri et al., 2012). Cependant, dans les cellules qui expriment ER $\alpha$ 36, le TAM agit comme un agoniste. Cet effet passe par l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK. Cela pourrait expliquer que les patientes ayant des tumeurs qui expriment fortement ER $\alpha$ 36 sont résistantes à un traitement au TAM (Kang et al., 2010; Wang et al., 2006).

Les travaux de Li et al, ont montré que les cellules MCF-7 (ER $\alpha$ 66) deviennent résistantes au TAM (MCF-7/TAM) après une culture en présence de plus de 1 $\mu$ M de TAM pendant 6 mois. Une augmentation de l'expression d'ER $\alpha$ 36 a été observée dans ces cellules par rapport aux cellules MCF-7 parentes. Ils ont trouvé que la surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans les cellules MCF-7 diminue la sensibilité de ces cellules au TAM et cela s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'EGFR et une diminution de l'expression d'ER $\alpha$ 66 (Li et al., 2013a). La surexpression stimule aussi la prolifération cellulaire, ainsi que la capacité de migration et d'invasion de ces cellules. Alors que la diminution de l'expression d'ER $\alpha$ 36 dans les cellules MCF-7/TAM conduit à une réduction du niveau de la prolifération cellulaire avec une diminution de la capacité de migration et d'invasion, ainsi qu'une diminution de l'expression d'EGFR (Li et al., 2013a).

Ces données indiquent qu'ER $\alpha$ 36 peut être utilisé comme un facteur pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein sous traitement par le TAM. Il peut aussi être considéré comme une cible thérapeutique potentielle dans les tumeurs qui ont acquis une résistance au TAM (Li et al., 2013a).

L'hélice-12 est un domaine essentiel pour la dégradation d'ER $\alpha$ 66 induite par l'anti-œstrogène ICI 182 780 (Pearce et al., 2003). Le positionnement de cette hélice et du domaine F de la protéine ER $\alpha$ 66 expliquent le comportement agoniste ou antagoniste des ligands (Mahfoudi et al., 1995). Puisque ER $\alpha$ 36 est dépourvu des hélices 9-12 du domaine de liaison au ligand, ceci peut donner une explication moléculaire au fait que les anti-œstrogènes ne puissent bloquer la voie de signalisation non génomique des œstrogènes médiée par ER $\alpha$ 36 dans le cancer du sein (Kang et al., 2010).

D'autre part, l'utilisation du TAM à long terme est associée à une incidence accrue de cancer de l'endomètre chez les patientes. L'étude de Lin et son équipe a montré que le TAM et l'E2 stimulent la prolifération des cellules de cancer de l'endomètre (Hec1A) via ER $\alpha$ 36 et l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/AKT. ER $\alpha$ 36 est présent à la membrane plasmique et dans le cytoplasme des cellules Hec1A (Lin et al., 2010). L'expression d'ER $\alpha$ 36 dans les tumeurs de l'endomètre est significativement plus faible que dans l'endomètre sain, et son profil d'expression diffère de celui d'ER classique. ER $\alpha$ 36 peut donc être une cible moléculaire dans le cancer de l'endomètre. ER $\alpha$ 36 peut être un biomarqueur important pour le diagnostic, le pronostic et le choix du traitement en cas de cancer de l'endomètre (Sun et al., 2013).

Dans les tumeurs gastriques, l'ARNm d'ER $\alpha$ 36 est exprimé davantage que l'ARNm d'ER $\alpha$ 66, ce qui peut être l'un des facteurs qui influencent les résultats d'un traitement par le TAM chez les patients atteints de cancer gastrique (Wang et al., 2012).

Chez l'homme, ER $\alpha$ 36 est fortement exprimé dans les tissus gastriques, principalement sur la membrane plasmique, et dans le cytoplasme pour les cellules cancéreuses gastriques. Cette expression est associée à l'invasion des ganglions lymphatiques, ce qui indique qu'ER $\alpha$ 36 peut être un marqueur de métastase pour ce type de cancer (Wang et al., 2013).

Les travaux de Wang et son équipe ont montré qu'ER $\alpha$ 36 médiait la signalisation des œstrogènes qui induisent la prolifération des cellules cancéreuses gastriques SGC7901, *in vitro* et *in vivo* (Wang et al., 2013). Cet effet de l'E2 est inhibé en cas d'interférence ARN ciblant ER $\alpha$ 36. Cela implique l'activation de la voie de signalisation c-Src et induit l'expression de la cycline D1. En effet c-Src est phosphorylée sur le résidu Tyr416 après

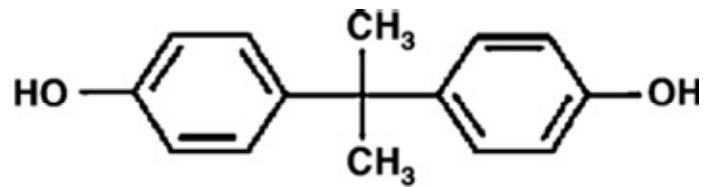
traitement à l'E2 et l'effet de l'E2 est inhibé en présence de l'inhibiteur de Src PP2 (Fu et al., 2013). Cette action de l'œstradiol est dépendante de la concentration : une faible dose d'E2 (0.1 nM) stimule la prolifération cellulaire du cancer gastrique et l'expression d'ER $\alpha$ 36, tandis qu'une forte dose d'E2 (5  $\mu$ M) inhibe la prolifération et l'expression d'ER $\alpha$ 36.

Par ailleurs, ER $\alpha$ 36 protège les cellules cancéreuses gastriques de l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique (Fu et al., 2013). Dans ces cellules, l'E2 induit via ER $\alpha$ 36 une augmentation du niveau de l'expression de GRP94 (Glucose-Regulated Protein 94), une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique qui participe au repliement des protéines, à l'homéostasie du calcium, aide à l'adressage des protéines mal repliées vers la voie ERAD, et empêche la mort cellulaire liée à un stress du réticulum (Fu et al., 2013).

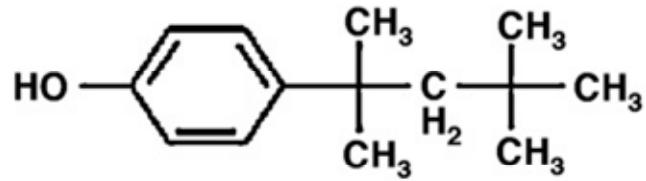
Dans les échantillons de tumeurs gastriques, les niveaux élevés de GRP94 sont associés à un stade tumoral plus avancé, à des métastases ganglionnaires et sont corrélés à des niveaux élevés d'ER $\alpha$ 36. Les cellules SGC7901 qui surexpriment ER $\alpha$ 36 forment des tumeurs plus grosses avec un index mitotique plus élevé quand elles sont xéno greffées à des souris nues. Les tumeurs formées expriment fortement GRP94. Cette protéine pourrait donc être un effecteur en aval d'ER $\alpha$ 36 (Fu et al., 2013).

L'ensemble de ces résultats indiquent qu'ER $\alpha$ 36 pourrait jouer un rôle important dans le développement du cancer gastrique chez l'homme. ER $\alpha$ 36 peut servir à établir une thérapie ciblée dans ce type de cancer (Wang et al., 2013).

**BISPHENOL A**



**4-t-OCTYLPHENOL**



**4-NONYLPHENOL  
(mixture of isomers)**

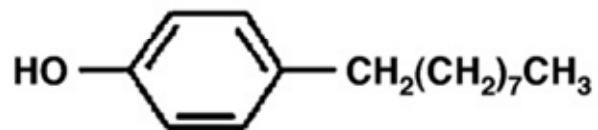


Figure 35 : Structures moléculaires du Bisphénol A, du 4-tert-Octylphénol et du 4-Nonylphénol. (D'après Asimakopoulos et al., 2012).

## **IV. Perturbateurs endocriniens**

### **IV.1. Définition**

En 1999, selon l'Union Européenne, un perturbateur endocrinien (PE) est une substance ou un mélange de substances exogènes altérant les fonctions du système endocrinien, et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou de sous-populations (Jean et al., 2012).

Selon l'US EPA (l'Agence de Protection Environnementale Américaine), ce sont des agents exogènes qui interfèrent avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination d'hormones intervenant dans l'homéostasie, la reproduction, le développement et comportement (Jean et al., 2012; Vandenberg et al., 2009).

En 2012 l'Endocrine Society a redéfini les PEs plus simplement comme toute substance ou mélange de substances chimiques exogènes pouvant interférer avec l'action d'une hormone (Nassouri et al., 2012).

Dans la suite de mon mémoire, je vais tout d'abord présenter la diversité des perturbateurs endocriniens puis je me focaliserai sur la famille des alkylphénols incluant bisphénol A, 4-tert-octylphénol, 4-nonylphénol (Figure 35), en précisant l'impact d'une exposition à ces molécules sur le développement et la reproduction. Je traiterai enfin des effets de mélanges complexes d'alkylphénols.

### **IV.2. Diversité**

Les populations sont exposées aux PEs dans les différents milieux tels que l'air, l'eau, mais aussi au travers de la nourriture et de différents produits industriels, y compris les produits de soins personnels (Marques-Pinto et Carvalho, 2013).

Les PEs présents dans l'environnement peuvent être d'origine naturelle ou d'origine synthétique. Ces polluants peuvent être classés en trois catégories selon leur nature et leur origine : (i) des composés naturels comme les phyto-œstrogènes (produits par les végétaux) et myco-œstrogènes (produits par les champignons), (ii) des hormones naturelles (animales, humaines, végétales) ou synthétiques, et (iii) des composés synthétiques.

Les phyto-œstrogènes et myco-œstrogènes ont des structures chimiques qui miment en partie les effets des œstrogènes. Ils perturbent donc le système endocrinien et l'équilibre hormonal. Parmi les hormones naturelles ou synthétiques, humaines ou animales figurent les œstrogènes médicamenteux (pilule du lendemain, pilules contraceptives, traitement hormonal de la ménopause...). Ces composés sont généralement excrétés dans les urines et rejetés dans les eaux usées. Les composés chimiques synthétiques à usages agricoles ou domestiques, comme les pesticides (fongicides, insecticides, larvicides et herbicides) se retrouvent aussi dans l'environnement. Il y a aussi un grand nombre de produits chimiques industriels et des produits pharmaceutiques (Jean et al., 2012; Sultan et al., 2011).

De nombreux produits chimiques sont considérés comme perturbant le système endocrinien, y compris le Bisphénol A (BPA), certains organochlorés, les retardateurs de flamme polybromés, les substances perfluorées, les alkylphénols, phtalates, pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, des solvants et des produits ménagers (y compris certains détergents), des désodorisants, des colorants capillaires, les produits cosmétiques et les crèmes solaire. Même certains métaux ont été montrés comme possédant des propriétés de perturbateurs endocriniens (De Coster et van Larebeke, 2012).

Les PE ont des effets différents selon leurs modes d'action : i) un effet mimétique (agoniste) quand ils imitent l'action d'une hormone naturelle en se liant au récepteur cible de cette hormone, ii) un effet antagoniste quand ils bloquent l'action d'une hormone naturelle, et iii) un effet perturbant, quand ils interfèrent avec les processus physiologiques de production, de transport ou de dégradation d'une hormone naturelle (Jean et al., 2012).

La plupart des PE sont connus pour agir comme des ligands imparfaits (agonistes ou antagonistes) sur les récepteurs nucléaires et/ou membranaires, interférant ainsi avec la régulation hormonale et perturbant les voies de signalisation et l'expression des gènes cibles hormono-dépendants. La plupart de ces produits sont supposés agir via plusieurs mécanismes, qui peuvent avoir des résultats synergiques ou antagonistes (Marques-Pinto et Carvalho, 2013).

La majorité des composés perturbateurs endocriniens présents actuellement dans l'environnement ont des effets ostrogéniques ou anti-androgéniques. Ils miment l'action des œstrogènes, affectant les niveaux d'œstrogènes ou se liant aux récepteurs des œstrogènes, comme les récepteurs nucléaires ERs ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et AR ou les récepteurs membranaires comme GPER (De Coster et van Larebeke, 2012; Fucic et al., 2012).

Parmi les substances qui ont des effets œstrogéno-mimétiques on trouve par exemple (i) le Diéthylstilbestrol (DES) qui est une substance non-stéroïde synthétique (xéno-estrogènes) plus puissante que l'œstradiol et qui traverse la barrière placentaire, (ii) les phyto-œstrogènes (œstrogènes naturels) qui ont des effets intermédiaires (moyen), (iii) les composés comme le bisphénol A, l'octylphénol et le nonylphénol (tensio-actifs des détergents), le DDT (dichlorodiphénol-trichloréthane), la dieldrine, l'endosulfan, le métoxychlore et d'autres pesticides qui ont des effets plus faibles que les autres composés (en i et ii).

Concernant les composés qui ont des effets anti-androgéniques on trouve par exemple, les phtalates (présents dans les matières plastiques), des pesticides (linuron, métabolites de la vinclozoline, etc). Il y a d'autres produits chimiques comme les polybromodiphényles (retardateur de flamme), perchlorates, dioxines, polychlorobiphényles (PCB), furanes, et autres (Joffe, 2001).

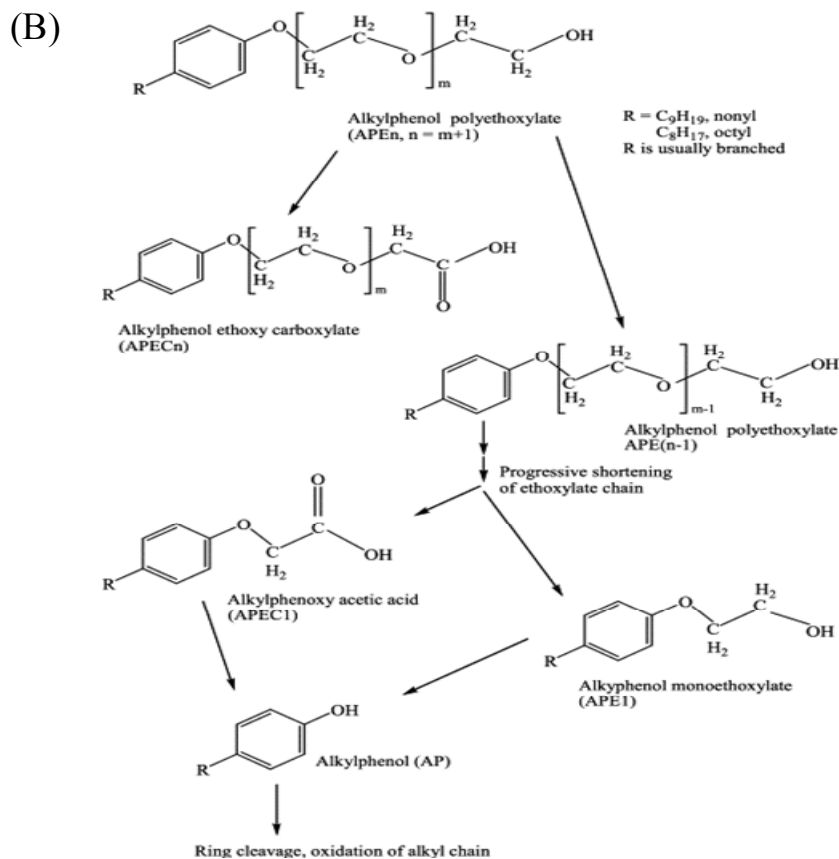
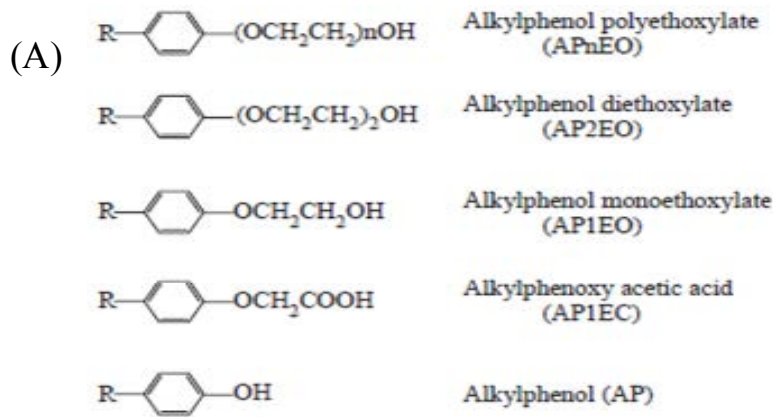
La plupart des xénoestrogènes sont des composés hydrophobes et lipophiles qui peuvent s'accumuler dans les tissus gras et ainsi entraîner une exposition œstrogénique chronique (Chen et al., 2013).

En 2000, le rapport du « National Toxicology Program » a confirmé qu'il y avait suffisamment de preuves pour soutenir l'affirmation que beaucoup de ces produits avaient des effets à faibles doses dans l'environnement (Vandenberg et al., 2009).

### **IV.3. Les Alkylphénols**

Les alkylphénols (APs) sont fabriqués en grandes quantités, et servent d'intermédiaires dans la fabrication des agents tensioactifs, des résines phénoliques, etc (Becue et Nguyen, 2005; Kochukov et al., 2009).

Le 4-nonylphénol (mélange de nonylphénols à chaîne ramifiée ou non, substitués en position 4 sur le noyau phénolique), représente la majorité des nonylphénols (80 %) dans les mélanges techniques commerciaux. Le terme octylphénol (OP) désigne notamment le 4-tert-octylphénol. Pour les OP, cet isomère est un contaminant fréquent de 4-nonylphénol dans les procédés industriels.



**Figure 36 : Alkylphénols polyéthoxylés**

(A) Structures et noms communs d'alkylphénols polyéthoxylates et de leurs produits de biodégradation. Le nombre d'unités d'oxyde d'éthylène est indiqué par n (1-20). R est une chaîne alkyle ramifiée, généralement nonyl ou octyl. (D'après Goda et al., 2004).

(B) Voies de dégradation biologique des alkylphénols polyéthoxylés. (D'après Becue et Nguyen, 2005).



Les APs se forment principalement lors de la biodégradation des alkylphénol polyéthoxylés (APnEOs) qui représentent une importante classe d'agents tensioactifs non ioniques. La production annuelle de ces composés est d'environ 500 000 tonnes pour une utilisation majoritaire (55%) dans la fabrication des élastomères, du textile, des pesticides, et du papier, mais aussi (30%) de détergents industriels et enfin (15%) de produits ménagers et produits cosmétiques (Zeravik et al., 2004).

Après utilisation, ces APnEOs se retrouvent dans les eaux usées où a lieu leur biodégradation en alkylphénols. En conditions anaérobies, on observe d'abord un raccourcissement des chaînes carbonées des APnEOs qui entraîne la formation d'alkylphénols diéthoxylates (AP2EO), alkylphénols monoéthoxylate (AP1EO), et finalement une déséthoxylation qui génère les alkylphénol (AP) (Figure 36) (McAdam et al., 2011; Zeravik et al., 2004). En conditions aérobies, ils sont transformés en alkylphénol di- et mono-éthoxycarboxylates (AP2EC et AP1EC) eux-mêmes transformés en carboxyalkylphénoléthoxycarboxylates (Zeravik et al., 2004). Les APs tels que 4-tert-octylphénol (4-tert-OP), 4-nonylphénol (4-NP) sont les principaux produits de la dégradation des APnEOs.

Les APs sont des substances chimiques persistantes qui s'accumulent au niveau des sédiments, du sol, dans l'air et les milieux aquatiques à des concentrations qui peuvent affecter la santé et la fonction de reproduction chez les animaux et probablement chez l'homme. Les APs sont ubiquitaires dans l'environnement en raison de leur large spectre d'utilisation et de l'absence de traitement approprié dans les stations d'épuration. On estime que 65 % des APs et de leurs dérivés qui entrent dans les stations d'épuration sont rejetés dans l'environnement (Ahel et al., 1994).

Lors du traitement des eaux usées, la plupart des AP produits au cours de la biodégradation des APnEOs devient adsorbés aux solides, et les concentrations de ces produits chimiques dans les boues d'épuration peuvent être de l'ordre du gramme par kilogramme (Zeravik et al., 2004). A titre d'exemple, la demi-vie du 4-nonylphénol dans les sédiments est de 28 à 104 jours (Maguire, 1999).

La nature lipophile des APs favorise leur bioaccumulation, ces composés étant stockés dans les tissus adipeux chez les animaux et chez les humains. L'exposition à ces produits est fortement associée à l'infertilité. Les études sur les animaux ont aussi montré que l'exposition

aux APs peut affecter l'intégrité de l'acrosome et causer du stress oxydatif dans les spermatozoïdes stockés dans l'épididyme (Chen et al., 2013).

En outre, des données récentes ont indiqué que certains produits de biodégradation des APnEOs sont faiblement œstrogéniques (Becue et Nguyen, 2005; Goda et al., 2004).

Ces composés se lient aux récepteurs nucléaires des œstrogènes (ER $\alpha$ ) avec une affinité qui augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne aliphatique. Leur liaison et leur activation d'ER $\alpha$  restent moins puissantes que celles de l'œstradiol, mais ces paramètres peuvent être radicalement différents pour les ERs membranaires (mERs) (Kochukov et al., 2009).

#### **IV.4. Bisphénol A**

Le bisphénol A (BPA) est un monomère très largement utilisé dans la production industrielle (environ 3,5 millions tonnes fabriquées dans le monde en 2008), des résines (21%) et de plastiques en polycarbonate (plastique dure et translucide) (72%). Le BPA contient deux groupes phénoliques fonctionnels (Figure 35), et il est préparé à partir d'une combinaison de deux équivalents de phénols pour un équivalent d'acétone. Il est constitutif d'un large éventail de produits de consommation courante, y compris les contenants alimentaires en plastique, les biberons, et le revêtement de boîtes de conserves métalliques. Le BPA est utilisé également dans la production des retardateurs de flammes au sein des appareils électriques, dans les prothèses dentaires, et comme additif dans les produits en plastique PVC (Polyvinyl Chloride) (7%) (N'Tumba-Byn et al., 2012; Pupo et al., 2012; Talsness et al., 2009).

En termes d'impacts sur l'environnement, le BPA est un composé très persistant. Le milieu principalement concerné est le milieu aquatique qui permet le transport de ce composé dans l'ensemble des autres compartiments. En effet, les quantités rejetées via les eaux usées par l'homme ou via les déchets sont non négligeables (Jean et al., 2012). Une étude réalisée en France sur les eaux usées (brutes et traitées) a montré que dans les échantillons d'eau brute, la concentration la plus élevée de BPA était 1,430 ng/L. Les niveaux de BPA pour les échantillons dans les bouteilles d'eau fabriquées en polycarbonate allaient de 70 à 4,210 ng/L, avec un niveau plus grand observé pour les bouteilles récemment fabriquées. Cependant, la

législation européenne sur les matériaux et objets en plastique au contact avec les aliments a établi une limite de migration spécifique de 0,6 mg/kg pour le BPA (Colin et al., 2014).

L'homme est exposé au BPA principalement au moment de la consommation d'eau et d'aliments à travers les matériaux utilisés pour les contenants et les emballages. Lorsque la polymérisation est incomplète, des résidus de BPA lessivés à partir de la résine époxy ont le potentiel de contaminer les aliments conservés. Une contamination par du BPA a aussi été rapportée dans les préparations alimentaires pour nourrissons (Vandenberg et al., 2009).

Chez l'homme la consommation quotidienne estimée de BPA (en ne comptant que les boîtes de conserve) est 6,6 µg/personne aux Etats-Unis et de 0,48 à 1,6 µg/kg/j en Europe selon une étude du « European Commission's Scientific Committee on Food ». L'utilisation de ce composé dans la fabrication des produits tels que les biberons est interdite en France depuis 2010 (Nassouri et al., 2012).

Un petit nombre d'études ont cherché à déterminer la pharmacocinétique du métabolisme du BPA chez l'homme. Par exemple Völkel et al. ont administré 5 mg de BPA radioactif/personne (54–90g/kg) et ils ont rapporté que l'élimination du BPA était totale après 24 heures (Völkel et al., 2002). Les concentrations plasmatiques maximales étaient atteintes après 80 minutes et déclinaient ensuite pendant les 6 heures suivantes. Le BPA n'était détecté que sous sa forme glucuronidée mais pas sous forme libre. Cette étude indique donc que chez l'homme, le BPA est absorbé rapidement au niveau du tractus gastrointestinal, conjugué avec l'acide glucuronique dans le foie, puis le BPA–glucuronidé est rapidement filtré par les reins et excrété dans l'urine. Ce métabolisme diffère de celui des rongeurs chez lesquels une grande partie du BPA–glucuronide est éliminée dans les fèces.

Une clairance rapide a aussi été constatée chez ces modèles animaux (revue dans Vandenberg et al., 2009). Les expériences ont cependant consisté en des expositions aiguës à des doses relativement élevées, ce qui peut être différent de la situation chez l'homme soumis à une exposition chronique.

Concrètement, le foie joue un rôle essentiel dans le métabolisme du BPA chez les animaux et chez l'homme. Les enzymes hépatiques sont responsables de la glucuronidation du BPA et d'autres xéno-œstrogènes (UDP-glucuronosyl-transférases, comme UGT2B1), et produisent du BPA-glucuronide, principal métabolite du BPA chez les animaux et chez l'homme avec peu ou pas d'activité œstrogénique. Le BPA est également transformé en BPA-sulfate (*in vivo*) par les phénol sulfo-transférases trouvées dans le foie (comme par exemple, ST1A3) (Vandenberg et al., 2009).

Bien que le BPA soit principalement métabolisé en BPA-glucuronide et BPA-sulfate, mais aussi la forme non conjuguée, qui est la seule forme biologiquement active, a été détectée dans la majorité des individus dans de nombreux pays développés avec des variations inter-individuelles importantes (N'Tumba-Byn et al., 2012). Il est présent dans les fluides biologiques comme le sang maternel (1-10 ng/ml), le plasma fœtal, le liquide amniotique, le sang du cordon ombilical, le placenta (> 100 ng/g). Il peut traverser la barrière placentaire et les fœtus en développement pourraient y être davantage sensible puisque leur efficacité métabolique est moins efficace et que leur taux de protéines sériques capables de lier les xénobiotiques est plus faible (Schönfelder et al., 2002). Les auteurs ont rapporté la détection de BPA non conjugué dans le lait maternel (1-7 ng/ml de colostrum, avec une moyenne de 3,41 ng/ml). Le BPA s'accumule dans les tissus adipeux, les concentrations variant de 1,80 à 12,01 ng/g (moyenne 3,16 ng/g) (Vandenberg et al., 2010).

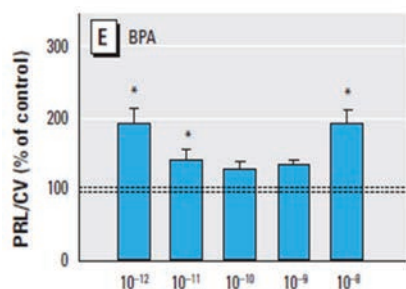
L'exposition au BPA a été liée à des désordres métaboliques, à l'infertilité, au cancer et à des anomalies du comportement (Susiarjo et al., 2013).

Ces modifications pourraient être liées au fait que le BPA a des effets œstrogéniques. Cela a pu être démontré par exemple avec le « E-SCREEN assay » qui utilise les cellules cancéreuses mammaires œstrogéno-sensibles MCF7 pour mesurer la prolifération cellulaire après traitement avec une gamme de concentrations d'un composé à tester, et l'œstradiol comme témoin positif.

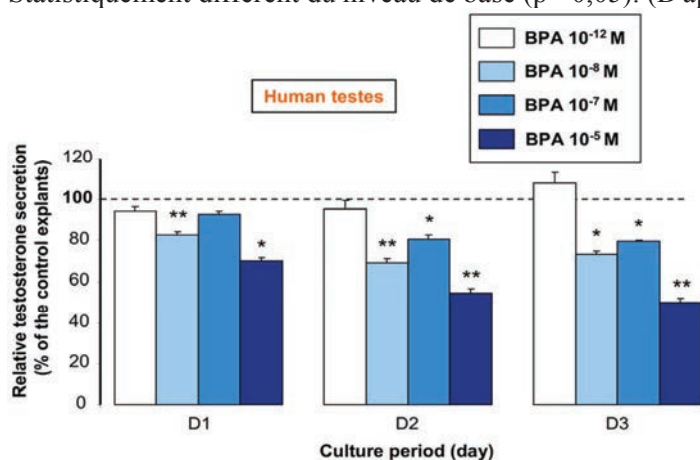
Les deux cycles benzéniques du BPA, avec les deux groupements (4,4')-OH, s'adaptent à la poche de liaison d'ER, ce qui donne au BPA ses propriétés œstrogéniques. Le BPA se lie à ER $\alpha$  et ER $\beta$  avec une affinité 10000 fois inférieure à celle de l'E2 et à ER $\alpha$  avec 10 fois plus d'affinité qu'à ER $\beta$  (Vandenberg et al., 2009).

Les effets œstrogéniques du BPA peuvent être médiés par d'autres récepteurs des œstrogènes. Le BPA a une affinité de liaison relativement élevée pour GPER. Il exerce une activité agoniste et active la voie de signalisation GPER-dépendante habituellement activée par les œstrogènes (Thomas et Dong, 2006).

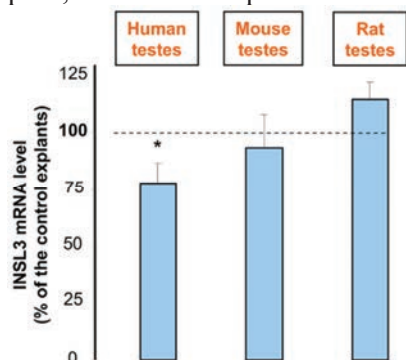
Pour illustrer les perturbations métaboliques, il a par exemple été rapporté que les cellules pituitaires (GH3/B6), qui expriment naturellement ER $\alpha$ 66, montrent en réponse au BPA une libération rapide de calcium intracellulaire suivie d'une libération de prolactine (Vandenberg et al., 2009).



**Figure 36 : Libération de prolactine induite par le BPA.** Les résultats indiquent la moyenne  $\pm$  SE mesurée dans les cellules pituitaires GH3/B6/F10 traitées pendant 3 minutes par le BPA (n = 16 échantillons/4 expériences). PRL/CV représente le pourcentage de la sécrétion basale de prolactine à chaque point de temps individuel, normalisée pour le nombre de cellules (déterminée par coloration au cristal violet, CV). Les lignes pointillées indiquent la marge d'erreur dans le niveau de base. \* Statistiquement différent du niveau de base ( $p < 0,05$ ). (D'après Wozniak et al., 2005).



**Figure 37 : Effet du BPA sur la sécrétion de testostérone par les testicules fœtaux humains.** Un testicule par fœtus (entre 6,5 et 10,5 semaines de gestation) a été coupé en deux morceaux cultivés dans des puits différents. Après 24 h (D0), la moitié des explants a été cultivée en l'absence (témoin) et l'autre moitié en présence de BPA à des concentrations allant de  $10^{-12}$  M à  $10^{-5}$  M pendant 3 jours (D1 à D3). La sécrétion de testostérone a été mesurée par radio-immunoassay. Les valeurs de D1 à D3 ont été normalisées par rapport à la sécrétion à D0 du même puits (% du témoin à D0). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  dans la comparaison entre les testicules traités et témoins. (D'après N'Tumba-Bynet et al., 2012).



**Figure 38 : Effet du BPA sur le niveau d'ARNm insl3 dans les testicules fœtaux chez l'homme, la souris et le rat.** Les testicules ont été prélevés sur des fœtus humains entre 6,5 et 10,5 semaines de gestation ou chez les souris à 12,5 jpc ou le rat à 14,5 jpc respectivement. Pour chaque fœtus, les deux testicules ont été cultivés dans un milieu témoin pendant 24 h (J0) puis l'un en présence de  $10^{-8}$  M de BPA et l'autre en absence BPA. Après 24 heures, l'amplification par RT-PCR a été effectuée. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM des niveaux d'ARNm insl3 normalisés par rapport à la  $\beta$ -actine, et exprimés en pourcentage du témoin. \* significativement différent ( $P < 0,05$ ). (D'après N'Tumba-Bynet et al., 2012).

Cependant cette libération de prolactine se présente sous la forme d'une courbe en forme de U, puisque des doses de ( $10^{-8}$ ,  $10^{-11}$  et  $10^{-12}$  M) induisent des réponses significatives pour ce qui est de la libération de prolactine, alors que des doses ( $10^{-9}$  et  $10^{-10}$  M) n'induisent pas ces réponses (Figure 37). Aucune réponse liée à l'activation de la voie génomique des œstrogènes n'est observée dans ces cellules.

En ce qui concerne l'infertilité, l'exposition in utero et néonatale au BPA de rats mâles affecte leur fonction reproductrice, particulièrement la spermatogenèse et la spermio-genèse (Aikawa et al., 2004; Toyama et Yuasa, 2004).

Chez le rat, l'exposition périnatale (gavage de la mère (F0) depuis 12<sup>ème</sup> jour de la gestation jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour après la mise bas) à des doses de 1,2-2,4 µg/kg/jour entraîne une réduction du nombre et de la motilité de spermatozoïdes chez les mâles de la génération F1. Ces mâles sont hypofertiles lorsqu'ils sont accouplés avec des femelles normales qui n'ont pas été exposées au BPA (Salian et al., 2009).

Ces effets persistent dans les générations ultérieures (F2 et F3). En effet, les mâles de la génération F3 présentent pratiquement une réduction de 50% du nombre de spermatozoïdes présents au niveau de l'épididyme par rapport aux témoins. Ils engendrent des portées environ deux fois plus petites que les témoins. Les effets du BPA sont donc transmis via la lignée germinale aux générations suivantes. Ces observations suggèrent que l'exposition périnatale au BPA chez le rat entraîne des effets néfastes à long terme sur la fertilité à l'âge adulte et que ces effets sont trans-générationnels (Salian et al., 2009).

Des testicules fœtaux prélevés entre 6,5 et 10,5 semaines de gestation chez l'homme ou à une période de développement équivalente chez le rat (14,5 jpc) et la souris (12,5 jpc) ont été cultivés *in vitro* et exposés à différentes doses de BPA pendant 3 jours (N'Tumba-Byn et al., 2012). Pour les testicules humains, une dose de ( $10^{-8}$  M) réduit la sécrétion de testostérone dès le 1<sup>er</sup> jour de culture organotypique tandis que des doses plus élevées ( $10^{-5}$  M) sont requises pour les testicules des rongeurs (Figure 38). Ces doses de BPA réduisent le niveau d'ARNm de l'insl-3 (Figure 39) (N'Tumba-Byn et al., 2012).

Ces effets du BPA sont toujours observés en cas d'inactivation d'ER $\alpha$ . En perturbant la stéroïdogénèse testiculaire et la différenciation des cellules de Leydig, le BPA crée un milieu paracrine intra-testiculaire anormal qui peut altérer le développement des cellules germinales chez la souris. En effet, le BPA module la production des androgènes induite par l'hCG (Human Chorionic Gonadotropin) dans les cellules de Leydig immatures chez la souris en

atténuant la conversion de la testostérone en  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol (Savchuk et al., 2013).

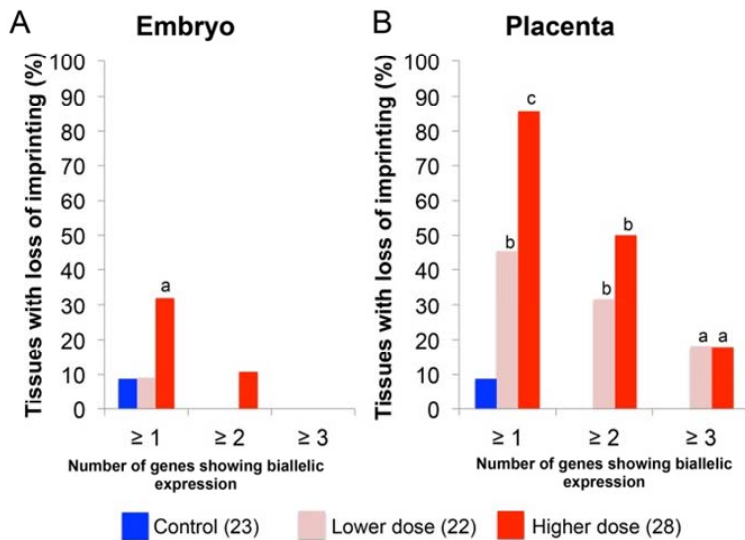
Pour ce qui est du cancer, les travaux de Pupo et collaborateurs montrent que le BPA induit l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la migration via le récepteur GPER, dans les cellules de cancer du sein SKBR3 et les cellules CAFs (Cancer-Associated Fibroblasts) qui n'expriment pas les récepteurs classiques des œstrogènes ( $ER\alpha$  et  $ER\beta$ ) (Pupo et al., 2012). Cependant il n'a pas pu être établi de corrélation claire entre concentration sanguine de BPA et le développement d'un cancer du sein (Rochester, 2013). L'exposition périnatale au BPA a des effets sur l'organisation du tissu de la glande mammaire. Le BPA altère les interactions stroma-épithéliales pendant la période d'exposition et cela a des répercussions à la puberté et à l'âge adulte avec un développement anormal des structures épithéliales (Vandenberg et al., 2009).

Le BPA stimule la prolifération des cellules séminomateuses chez l'homme (Pupo et al., 2012). Le BPA à très faibles doses (de  $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  M) stimule la prolifération des cellules de cancer testiculaire (JKT-1, séminome humaine), en permettant une activation rapide non génomique via GPER des voies de signalisation impliquant les kinases PKA et PKG (Guanosine monophosphate (cGMP)-dependent protein kinase) (Bouskine et al., 2009).

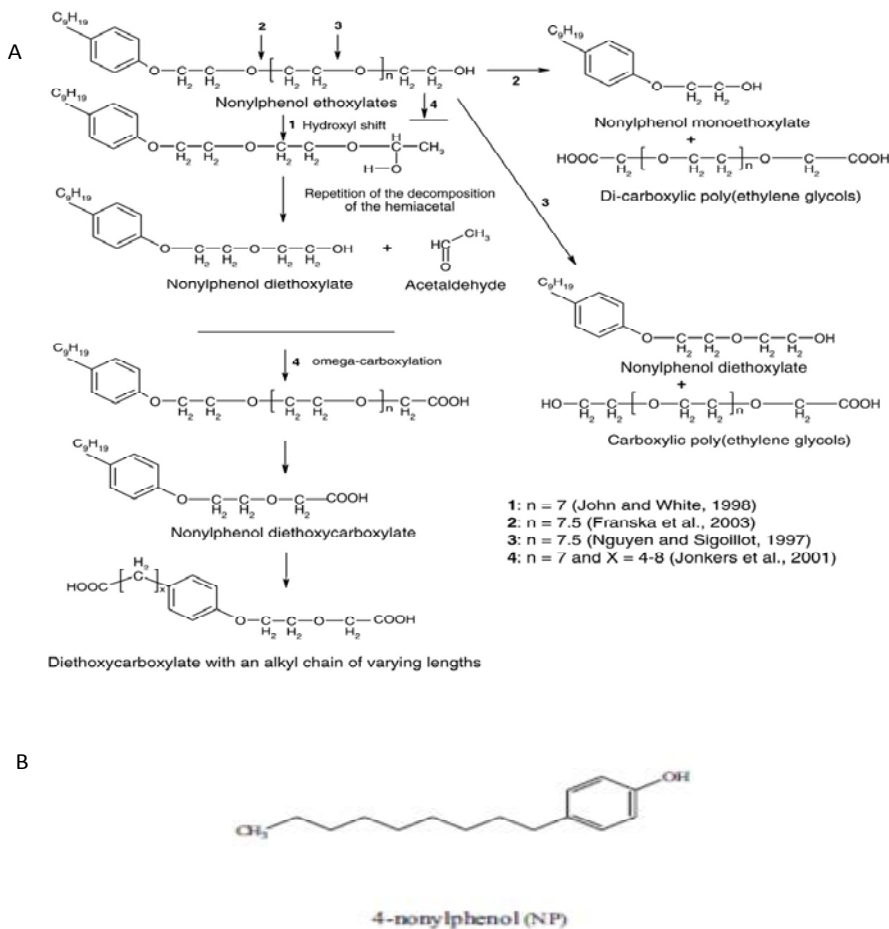
Des cellules de cancer de la prostate (LNCaP) répondent au BPA d'une manière similaire avec une prolifération maximale induite par  $10^{-9}$  M. La prolifération cellulaire est moindre à plus faible dose ( $10^{-10}$  M) et à plus forte dose ( $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  M) (Vandenberg et al., 2009). Ces études dose-réponse illustrent les courbes non monotones (NMDRs, Non-Monotonic Dose Responses) souvent observées avec les PE.

Des études récentes ont également rapporté des troubles du comportement chez les enfants exposés au BPA *in utero* ou avant la puberté, indiquant une perturbation du cerveau au cours des phases critiques du développement. Une corrélation a été rapportée entre un taux élevé de BPA urinaire chez la mère à 16 semaines de grossesse et un comportement hyperactif et de l'agressivité observés à l'âge de 2 ans chez les filles mais pas chez les garçons (Braun et al., 2009; Rochester, 2013).

Les effets du BPA pourraient être liés également à des changements de méthylation de l'ADN, ce qui indique que les mécanismes épigénétiques peuvent être pertinents. Les travaux de Susiajo et collaborateurs sur les souris suggèrent que l'exposition précoce à des composés



**Figure 40 : Impact d'une exposition au BPA sur le phénomène d'empreinte.** Différentes doses ont été utilisées (faible [rose], forte [Rouge] et témoin [Bleu]). Le pourcentage de avec perte d'empreinte (axe Y) est indiqué selon trois modalités : au moins 1 gène étudié affecté ( $\geq 1$ ), 2 gènes affectés ( $\geq 2$ ) ou 3 gènes affectés ( $\geq 3$ ), a=  $P < 0,05$  ; b=  $P < 0,01$ ; c=  $P < 0,001$ . Les effets de l'exposition au BPA sont plus importants dans le placenta que dans l'embryon. (D'après Susiarjo et al., 2013).



**Figure 41 :** A) Voies de la dégradation aérobie des nonylphénols éthoxylates. (D'après Soares et al., 2008). B) Structure chimique du 4-nonylphénol. (D'après Xie et al., 2013).



environnementaux communs (tels que BPA) ont le potentiel de perturber la santé du fœtus et du nouveau-né par des modifications épigénétiques de l'embryon et un développement anormal du placenta. Leurs résultats montrent que l'exposition à des doses de BPA communément retrouvées dans le sang maternel (1 à 3 ng/mL) perturbe l'expression et la méthylation des gènes soumis à l'empreinte, avec des effets plus significatifs observés dans le placenta (Figure 40) (Susiarjo et al., 2013).

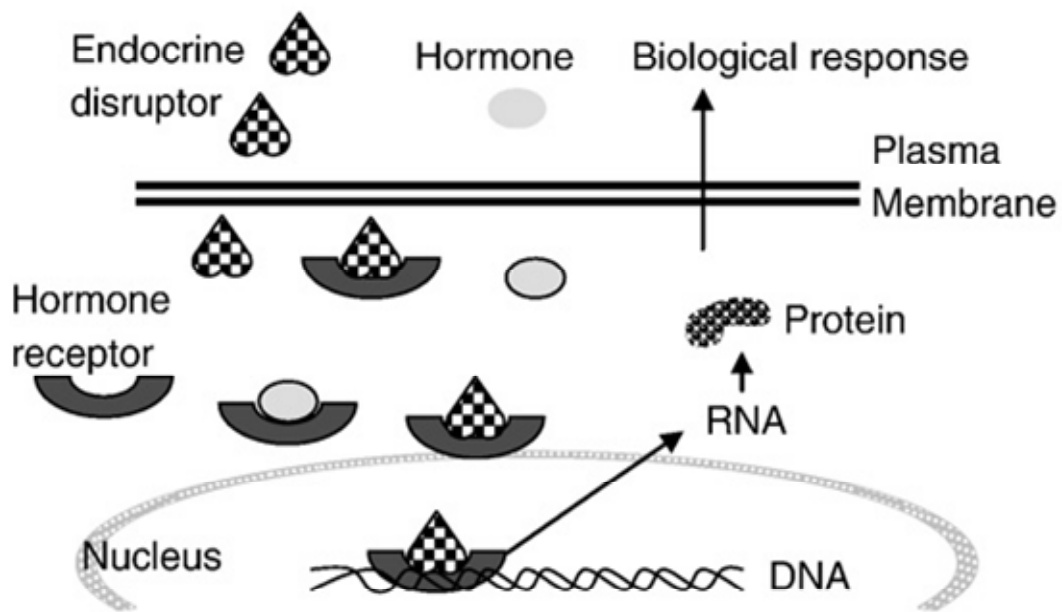
Après une exposition au BPA *in utero*, une méthylation anormale de l'ADN au niveau des éléments qui régulent l'expression du gène *Hoxa10* (un gène homéotique qui contrôle l'organogenèse utérine) conduit à une expression altérée de ce gène après la naissance (Bromer et al., 2010). Ces auteurs n'ont observé aucun changement significatif dans la méthylation de l'ADN dans *Hoxa10* chez l'adulte, ce qui suggère que la modification épigénétique ne peut être effectuée que pendant une fenêtre critique du développement. L'exposition *in utero* au BPA diminue l'expression ou l'activité des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN (DNMT1, DNMT3a et DNMT3b), et ensuite cette expression retrouve un niveau normal (Bromer et al., 2010).

L'ensemble de ces données montre que l'exposition à une faible dose de BPA au cours d'une période critique du développement peut conduire à des effets négatifs sur la santé, tels que le développement de l'appareil reproducteur, tant chez les animaux que chez l'homme.

#### **IV.5. 4-nonylphénol**

Le 4-nonylphénol (4-NP) est un composé xéno-biotique constitué d'un noyau phénolique portant une chaîne de neuf carbones sur la position para (Figure 41). A température ambiante, cet agent chimique, est un liquide visqueux de couleur pâle, non miscible à l'eau et il est produit industriellement par l'alkylation de phénol avec le nonène dans des conditions de catalyse acide. Le mélange final technique est composé de plus de 22 isomères de mono-alkylphénols 4-substitués.

En raison de sa structure, le 4-NP a été trouvé imiter l'hormone naturelle E2 (17  $\beta$ -œstradiol) par la compétition pour le site de liaison du récepteur aux œstrogènes, il montre des effets xéno-œstrogéniques (Soares et al., 2008; Wu et al., 2010).



**Figure 42 :** Compétition entre nonylphénol et  $17\beta$ -oestradiol. La concurrence pour la liaison au récepteur des œstrogènes est un des mécanismes d'action du nonylphénol comme suggéré par Warhurst (1995). (D'après Soares et al., 2008).

Le 4-NP (mélange de nonylphénols substitués en position 4) est un membre de la famille des APs dérivé principalement de la biodégradation de 4-nonylphénol éthoxylates 4-NPnEOs (n=nombre des unités éthoxylates) (Figure 41).

Il représente la grande majorité des nonylphénols (80%) dans les mélanges technique commerciaux (Becue et Nguyen, 2005; Loyo-Rosales et al., 2004; Raecker et al., 2011).

Le 4-NP est utilisé dans une large gamme de détergents et les matières plastiques (Daidoji et al., 2003). Ce produit pénètre dans l'environnement aquatique principalement via les effluents industriels à l'issue du traitement des eaux usées, mais également par rejet direct après l'application des pesticides. Il a la capacité de s'adsorber sur les particules (sédiments et sols) (Vitali et al., 2004).

De plus, le 4-NP présent dans les emballages plastiques en HDPE (High-Density PolyEthylene) a la capacité de migrer dans l'eau de boisson et les aliments. Il contamine moins l'eau que le lait, probablement parce que le lait est normalement stocké à une température inférieure et pendant des périodes plus courtes. La concentration du 4-NP n'augmente que légèrement avec le temps dans les conteneurs de lait stockés à 20°C, alors qu'elle augmente 3,5 fois après 15 jours de stockage à 40°C (Loyo-Rosales et al., 2004).

De nombreuses études rapportent la présence de 4-NP dans les aliments. Dans une analyse faite en Allemagne, les teneurs en 4-NP varient de 0,1 à 19,4 µg/kg (du poids frais des produits alimentaires). L'apport quotidien de 4-NP pour un adulte a été évalué à 7,5 µg/kg/jour alors que les doses prises pour les nourrissons qui sont exclusivement nourris au lait maternel ou au lait infantile peuvent être estimées de 0,2 à 1,4 µg/kg/jour, respectivement (Guenther et al., 2002). La présence ubiquiste de 4-NP dans les aliments pour bébé a été confirmée dans une étude plus récente portant encore sur la population allemande (Figure 42) (Raecker et al., 2011).

Ce composé a été détecté dans 24 catégories différentes d'aliments jusqu'à des concentrations de 17,1 µg/kg. Chez les consommateurs moyens, les apports quotidiens en 4-NP varient entre 0,01 et 0,08 µg/kg/jour (kg de poids corporel) pour les bébés et 0,04 à 0,05 µg/kg/jour pour enfants. Pour les grands consommateurs, l'apport quotidien de 4-NP est nettement plus élevé : de 0,23 à 0,65 µg/kg/jour pour les bébés, et de 0,11 à 0,37 µg/kg/jour pour les enfants (Raecker et al., 2011).

Le 4-NP a été classé, dans le cadre de la Directive Eau de l'Union Européenne, comme une substance dangereuse prioritaire, de telle sorte qu'une action de prévention de ses rejets dans l'eau sur 20 ans soit requise dans les pays membres :

(*Décision N° 2455/2001/EC du Parlement Européen et du Conseil à 20 novembre 2001 établissant la listes des substances prioritaires dans le domaine de l'eau et modifiant la directive 2000/60/CE*) le N° 10 de ;

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:348:0084:0097:FR:PDF>

(Asimakopoulos et al., 2012; Becue et Nguyen, 2005).

Le 4-NP tend à s'accumuler dans les lipides des organismes, et a été détecté chez plusieurs espèces aquatiques, y compris les plantes aquatiques, les algues, les moules et les poissons. Il peut se lier au récepteur aux œstrogènes et peut être nocif à la santé humaine (Xie et al., 2013). Le 4-NP montre une activité œstrogénique : des essais biologiques *in vitro* et *in vivo* ont confirmé leur potentiel œstrogénique et anti-androgénique (Lee et al., 2003). Le 4-NP a une plus grande activité que le BPA dans les tests ER et aromatase (Bonefeld-Jørgensen et al., 2007).

Le 4-NP a été rapporté comme étant extensivement converti en glucuronide dans le foie d'animaux tels que la truite arc en ciel et le rat (Daidoji et al., 2003).

En Chine, une étude réalisée sur 713 témoins et 877 patients atteints d'infertilité a permis d'étudier les relations entre les concentrations urinaires de différents composés dont le 4-NP sur la qualité du sperme (Chen et al., 2013). La présence de glucuronide et sulfate conjugués de 4-NP et excrétés dans l'urine chez l'homme dans les échantillons urinaire a été associée à l'infertilité idiopathique (Chen et al., 2013). Les patients ayant les taux les plus élevés de 4-NP sont ceux qui ont le moins grand nombre de spermatozoïdes. Chez le rat, l'accumulation du 4-NP dans le tissu adipeux, conduit à des niveaux d'exposition plus longs et plus élevé dans les organes cibles et altère la spermatogenèse (Chen et al., 2013).

L'administration de 4-NP à des rats (250 mg/j) pendant 50 jours diminue le niveau de testostérone en inhibant l'activité de l'enzyme P-450c17, une enzyme importante dans la synthèse de la testostérone dans les cellules de Leydig (Mathur et D'Cruz, 2011).

L'exposition néonatale précoce au 4-NP provoque un dysfonctionnement de la fonction de reproduction chez les rats femelles (post-puberté), ainsi que le développement de gonades perturbées chez les rats mâles et femelles. Le 4-NP administré via la voie orale (50 mg/kg) induit significativement une augmentation du poids de l'utérus des rates pré-pubères et avance l'âge de l'ouverture vaginale (Daidoji et al., 2003).

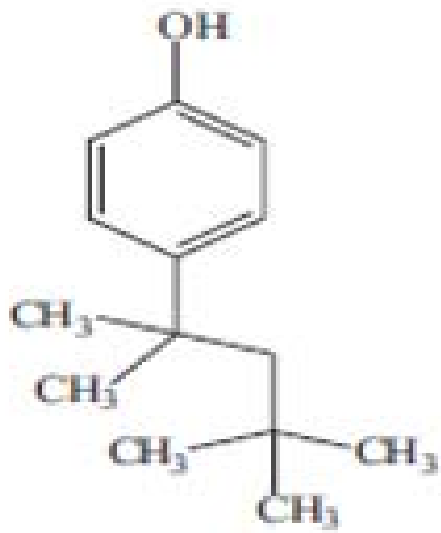
L'administration de fortes doses de 4-NP (500 mg/kg/j) à des rats nouveau-nés peut entraîner des perturbations du système reproducteur et des performances de reproduction, une réduction du poids de l'épididyme, de la densité des spermatozoïdes et des anomalies testiculaires. De plus, le 4-NP non seulement inhibe la croissance des testicules, mais il affecte également la production et la survie des spermatozoïdes chez le rat (Wu et al., 2010).

L'exposition *in vivo* de rats au 4-NP à forte doses (600 mg/kg pendant 3 jours), induit l'expression du gène codant l'hormone de croissance (GH, Growth Hormone) dans les cellules pituitaires, alors qu'à dose plus faible (10 ou 100 mg/kg) on n'observe pas de changement par rapport au témoin (Dang et al., 2009). Cette activation est inhibée par l'anti-œstrogène ICI 182780. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* sur les cellules pituitaires GH3 (Dang et al., 2009). Le 4-NP active dans ces cellules différentes voies de signalisation rapides (30 min) impliquant ERK, Akt et PKG.

Chez la souris, l'administration par voie orale de 4-NP (dose quotidienne de 45 mg/kg) pendant 32 semaines, augmente significativement le taux de cancer mammaire (Acevedo et al., 2005).

Sur les cellules de cancer ovarien humaines (BG-1), très sensibles à l'E2 et qui expriment  $E\alpha$ , le 4-NP ( $10^{-6}$  M) et l'E2 ( $10^{-9}$  M) peuvent stimuler la prolifération cellulaire par inhibition de la signalisation du TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) via la diminution de l'expression du récepteur TGF- $\beta$ RII et l'induction de l'expression de l'oncogène c-myc (Park et al., 2011a).

En résumé, le 4-NP est présent dans différents milieux et produits industriels. L'homme est exposé à ce produit quotidiennement, et notamment en raison de ses propriétés oestrogéno-mimétiques, il peut exercer des effets négatifs sur la santé et la fonction reproductive, tels que la spermatogenèse et la stéroïdogenèse.



4-tert-octylphenol (OP)

Figure 43 : Structure chimique du 4-tert-OP.

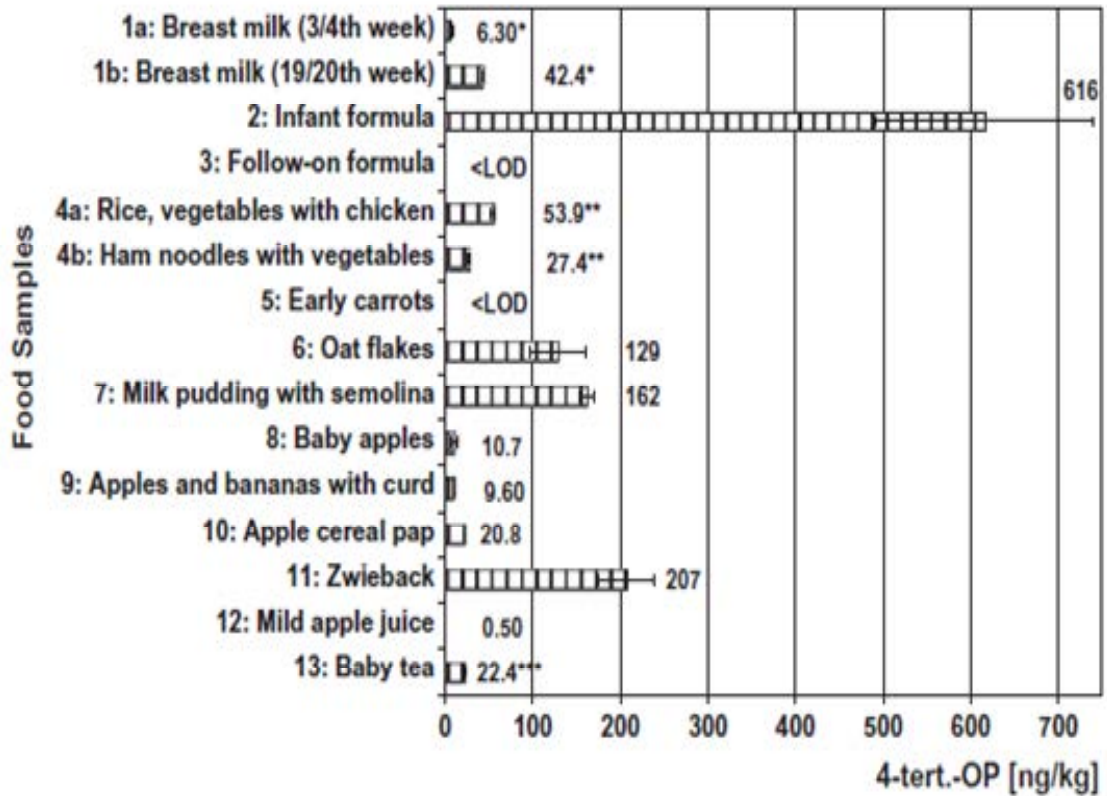
#### **IV.6. 4-tertiary-octylphénol**

Le terme « octylphénol » désigne un grand nombre de composés isomères dont la formule générale est  $C_8H_{17}.C_6H_4(OH)$ . Le groupe octyle ( $C_8H_{17}$ ) peut être ramifié de diverses manières ou constituer une chaîne droite et peut être situé en position 2-, 3- ou 4- sur le phénol. Parmi ces isomères potentiels, c'est le 4-tert-octylphénol (4-tert-OP) qui est le plus important du point de vue commercial (Figure 43). Le 4-tert-OP peut résulter de la biodégradation de la forme correspondante des éthoxylates (OPnEOs) (Becue et Nguyen, 2005; Loyo-Rosales et al., 2004; Raecker et al., 2011).

Le 4-tert-OP est couramment utilisé dans l'industrie. On en produit environ 23000 tonnes en Europe dont l'intégralité est utilisée sur place. Le 4-tert-OP est principalement utilisé comme intermédiaire dans la fabrication des résines phénoliques ou du formaldéhyde (98 % de la consommation) ainsi que dans la fabrication des éthoxylates octylphénoliques (2 % de la consommation). Les résines phénoliques sont utilisées comme agent d'adhérence dans le caoutchouc des pneumatiques, dans les encres d'impression, dans l'industrie de la fonderie, dans les peintures pour l'industrie nautique et comme enduit pour papier. Les éthoxylates octylphénoliques sont des agents émulsifiants pour les polymères (styrène-butadiène), pour la fabrication de textile et de cuir, pour la fabrication de peintures à base aqueuse ; ils entrent aussi dans la formulation de pesticides.

Le 4-tert-OP est présent en concentrations importantes dans l'environnement (Park et al., 2011b). Du fait de sa faible pression de vapeur saturante et de sa tendance à s'adsorber sur les sols et les sédiments, les concentrations atmosphériques de 4-tert-OP semblent extrêmement faibles (mais peu de données sont disponibles). Davantage d'informations sont disponibles pour les concentrations dans les eaux : les concentrations moyennes en 4-tert-OP sont inférieures à 1  $\mu\text{g/L}$ . Dans les milieux aquatiques il a été détecté chez plusieurs espèces y compris des plantes, des algues, des poissons et des moules (Qin et al., 2013; Xie et al., 2013). Dans le lait maternel humain, le 4-tert-OP a été trouvé à une concentration moyenne de 0,08 ng/ml (Ademollo et al., 2008).

Dans une étude portant sur des femmes espagnoles, un niveau médian de 4-tert-OP de 4,5 ng/g de tissus adipeux a été mesuré (Lopez-Espinosa et al., 2009). Dans des échantillons urinaires de 2517 sujets, le 4-tert-OP a été détecté dans 57,4% des participants avec des



**Figure 44 : Concentrations de 4-tert-OP dans les aliments pour bébé.**

Etude réalisée en Allemagne visant à mesurer les apports quotidiens de 4 tert-OP sur la base des 13 catégories d'aliments différents pour les bébés. Les concentrations de 4 tert-OP sont exprimées sur la base du poids frais. (\*) Pour le lait maternel, 1a correspond au lait pour les bébés âgés de 3 mois et 1b au lait pour les bébés âgés de 6 mois et plus. Pour 1b la deuxième valeur de la double analyse était inférieure à la limite de quantification. (\*\*) Pour les menus complets la valeur la plus élevée de 4a a été prise pour la calcul. (\*\*\*) Poudre de thé solide sec (ng/kg); la teneur calculée de 4-tert-OP pour une portion prête-à-boire (2,5 g de poudre et 100 ml d'eau) était de 0,6. (D'après Raecker et al., 2011).



concentrations totales (4-tert-OP libre et conjugué) allant de 0,2 à 20,6 ng/ml, la médiane étant de 0,3 ng/ml (Calafat et al., 2008).

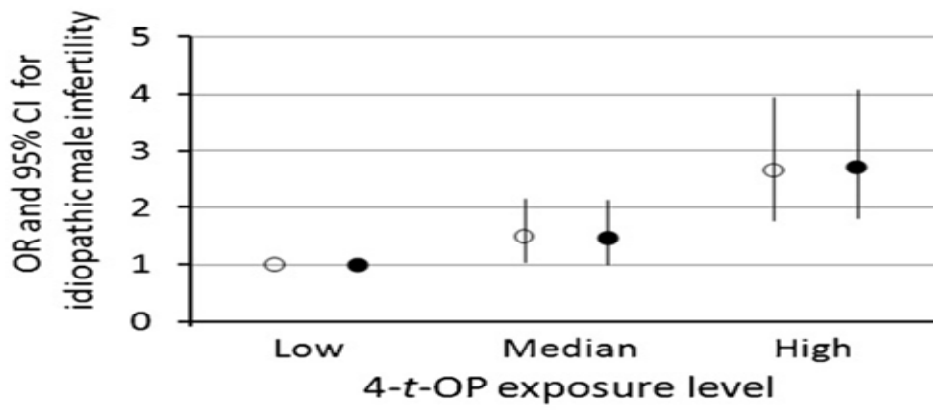
Raecker et collaborateurs ont montré dans leur étude que les doses de 4-tert-OP prises quotidiennement par des consommateurs moyens sont comprises entre 0,6 et 2,7 ng/kg (poids corporel) pour les bébés et entre 2,3 et 3,9 ng/kg (de poids de corps) pour les enfants, alors que pour les grands consommateurs, ces doses de 4-tert-OP pour les bébés vont de 11,9 à 22,5 ng/kg (poids corporel) et de 5,5 à 11,7 ng/kg (poids corporel) pour les enfants (Figure 44). La prise quotidienne est plus élevée pour les bébés que pour les enfants (Raecker et al., 2011). Les données pour les adultes ne sont pas disponibles. Dans le lait maternel, le 4-OP a été trouvé à une concentration moyenne de 32 ng/ml.

Les résultats de l'étude de Raecker et son équipe montrent que le 4-tert-OP est moins important dans la contamination alimentaire que le 4-NP. Le 4-NP est omniprésent dans les aliments pour les bébés, tandis que le 4-tert-OP n'a pu être détecté que dans 80% de tous les échantillons alimentaires (Raecker et al., 2011).

L'exposition au 4-tert-OP est un sujet de préoccupation, car ce genre de composé a des effets toxiques. Le seuil létal pour la crevette est de  $4 \cdot 10^{-6}$  M. Ce composé tue les splénocytes de rat ou de souris *in vitro* à très faible dose ( $10^{-12}$  M), les cellules d'adénohypophyse à et de la granulosa à des doses plus élevées ( $10^{-6}$  M et  $10^{-7}$  M respectivement) (Blake et al., 2004).

Raychoudhury et al. ont montré que le 4-tert-OP est toxique pour les cellules de Sertoli ( $10^{-12}$  M) et les cellules spermatogènes ( $10^{-8}$  M) (Raychoudhury et al., 1999). En revanche, le 4-tert-OP ne tue pas les cellules de Leydig à des concentrations assez fortes de  $10^{-6}$  M (Blake et al., 2004).

D'autre part, l'exposition au 4-tert-OP est aussi un sujet de préoccupation car des activités œstrogéniques ont été décrites. Le 4-tert-OP peut interférer avec la fonction endocrine normale en se liant aux récepteurs des œstrogènes chez l'homme. L'activité œstrogénique du 4-tert-OP est approximativement de  $10^{-3}$  à  $10^{-7}$  % de celle d'E2. Cette faible efficacité du 4-tert-OP peut résulter de la faible affinité avec laquelle il se lie aux récepteurs des œstrogènes (ERs) (Park et al., 2011b).



**Figure 45 : Relation entre exposition au 4-tert-OP et infertilité masculine.**

Odd ratios en valeurs brutes (cercles vides) et ajustées (cercles pleins) (Intervalle de confiance à 95%) pour l'infertilité masculine idiopathique et l'exposition au 4-tert-OP. (D'après Chen et al., 2013).

L'exposition humaine aux produits chimiques œstrogéniques, dont le 4-tert-OP, est supposée être associée à une gamme de troubles de la reproduction, et à des cancers (Chen et al., 2013; Qin et al., 2013).

Chez les rates, l'exposition sous-cutanée néonatale au 4-tert-OP (50 mg/kg de poids corporel), pendant les 10 premiers jours après la naissance, altère le début de la puberté, l'ovulation, le cycle œstrien, les taux de LH (Willoughby et al., 2005). Le poids de l'ovaire est inférieur à celui des femelles témoins tandis que le poids de l'utérus est supérieur. Les ovaires montrent un plus faible nombre de corps jaunes et un plus grand nombre de follicules pré-antraux et atrésiques. Les femelles ne montrent pas de pic de LH en réponse à une injection d'E2 (Willoughby et al., 2005). L'exposition au 4-tert-OP au cours de la période critique de la différenciation sexuelle du cerveau affecte donc le début de la puberté et la mise en place de la fonction reproductrice.

Chez les rats mâles adultes, l'exposition au 4-tert-OP (administré dans l'eau potable entre  $10^{-5}$  M et  $10^{-9}$  M pendant 4 mois) provoque une augmentation des anomalies de la queue des spermatozoïdes (40% à  $10^{-9}$  M contre 7% seulement chez les témoins) (Blake et al., 2004; Qin et al., 2013). Aucune autre anomalie n'est détectée ce qui est différent des administrations sous cutanées de 4-tert-OP (Boockfor et Blake, 1997). Une forte exposition au 4-tert-OP a été associée à des élévations significatives des risques d'infertilité masculine (Qin et al., 2013). Dans une étude cas/témoins portant sur des hommes atteints d'infertilité, des taux plus élevés de 4-tert-OP ont été mesurés chez les patients (Figure 45) (Chen et al., 2013).

Puisqu'il a été rapporté que l'exposition au 4-tert-OP à faible dose est toxique pour les cellules de Sertoli ( $10^{-12}$  M) et les cellules germinales ( $10^{-8}$  M), cela peut s'ajouter à l'aspect PE pour expliquer un dysfonctionnement de la production de sperme (Chen et al., 2013).

Le 4-tert-OP ( $10^{-6}$  M) peut se lier à l'ER et donc activer une signalisation anormale ER-dépendante. Cette activation conduit probablement à induire l'expression des oncogènes, et donc la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro*, comme c'est le cas pour les cellules de cancer du sein MCF-7. Chez des souris xénogreffées avec des cellules cancéreuses mammaires, l'exposition au 4-tert-OP entraîne une croissance importante des tumeurs mammaires par rapport au témoin (Lee et Choi, 2013).

En résumé, le 4-tert-OP est un produit œstrogéno-mimétique qui a des effets néfastes sur le développement des CGs et sur l'appareil reproducteur ; même à faible dose il peut altérer la spermatogenèse et conduire à l'infertilité et/ou au cancer testiculaire.

#### **IV.7. Mélanges de perturbateurs endocriniens**

De nombreux PE sont présents ensemble dans l'environnement et donc les organismes sont exposés à de multiples substances, susceptibles d'agir de façon indépendante, synergique, additive ou antagoniste (Jean et al., 2012; Marques-Pinto et Carvalho, 2013; Nassouri et al., 2012). Par conséquent, l'évaluation de leur activité œstrogénique par exemple, et des risques sanitaires liés à l'exposition aux ces composés est très complexe (De Coster et van Larebeke, 2012).

Ainsi, une étude chez le rat portant sur l'effet de l'exposition à un mélange de PE anti-androgéniques, a montré des effets synergiques sur l'incidence des anomalies génitales de l'appareil reproducteur (Marques-Pinto et Carvalho, 2013).

De même, Hernández et al, ont montré que les pesticides se trouvent presque toujours en mélange dans l'environnement. Les effets toxicologiques combinés de deux ou plusieurs composés dans un mélange de pesticides peuvent prendre une des trois formes : indépendants, doses additives ou interactions (Hernández et al., 2012).

Chez la rate juvénile, un mélange de produits phytochimiques (PCs, comprenant coumestrol, genistein, naringenin, (+,-) catechin, (-,-) epicatechin et quercetin) et un mélange de produits chimiques synthétiques (SCs, comprenant beta-hexachlorocyclohexane, methoxychlor, dibutylphthalate, 4-NP ; 4-tert-OP et BPA) ont été testés sur le « uterotrophic assay » (van Meeuwen et al., 2007). Dans ce test, le poids de l'utérus est utilisé comme marqueur de l'effet œstrogénique d'un composé à tester, après une administration sous-cutanée pendant 3 jours consécutifs à l'âge de 21 jours. Les concentrations utilisées étaient proches de celles mesurées dans le sang des femmes ménopausées. Les auteurs ont montré que le mélange PCs avait des effets additifs avec ceux de l'E2 tandis que ce n'était pas le cas pour le mélange SCs.

Ces mélanges de PE ont aussi été étudiés sur la prolifération des cellules de cancer du sein MCF-7 et l'expression de pS2 (un gène cible des œstrogènes) (van Meeuwen et al., 2007). Ils ont ici des effets additifs avec l'E2. Les mélanges réalisés peuvent être complexes.

Compound (MW)	Test range MCF-7 cell proliferation assay	[1 × mix] <sup>a</sup>	[1 × mix] <sup>a</sup>	[1 × mix] <sup>a</sup>
Endogenous 17β-estradiol	0.3–1E3 pM			
SCmixes		SCeq-mix(1)	SCeq-mix(2)	SCeq-mix(3)
4-Octylphenol (272.4 g/mol)	0.001–1 μM	0.5 nM	0.5 nM	0
Methoxychlor (345.65 g/mol)	0.01–10 μM	2 nM	2 nM	0
Dibutyl phthalate (278.35 g/mol)	0.1–100 μM	0.5 nM	0.5 nM	0
4-Nonylphenol (220.35 g/mol)	1E–6–1E1 μM	0.01 nM	0	0.01 nM
Bisphenol A (228.3 g/mol)	0.01–3 μM	1 nM	0	1 nM
β-HCH (290.83 g/mol)	1E–4–1E1 μM	1 nM	0	1 nM
Total concentration		5.01 nM	3.00 nM	2.01 nM
Test range MCF-7 cell proliferation assay		1–10,000×	1–3000×	1–10,000×

**Tableau 6 :** Données sur les conditions expérimentales et la composition des mélanges de produits chimiques œstrogéniques synthétiques testés. <sup>a</sup> Concentration d'un composé dans 1x mélange lorsqu'il est dilué dans le milieu SF (steroid free medium). (D'après van Meeuwen et al., 2007).

Chemical	Use	Mechanisms of action	Reproductive tract alterations	Effects on AGD & NR	NOAEL (mg/kg/day)	LOAEL (mg/kg/day)
DBP	Phthalate, used as plasticizers	Inhibitor of testosterone synthesis (4, 10)	Cryptorchidism and decreased sperm production (5, 6)	AGD ↓, nipples ↑ (5, 6)	50 (22)	100 (22)
DEHP	Phthalate, used as plasticizers	Inhibitor of testosterone synthesis (4, 7)	Cryptorchidism, testicular and epididymal abnormalities (1, 2, 3, 4)	AGD ↓, nipples ↑ (2, 3, 4)	3 (2)	10 (5.0 for NR) (2)
Vindozolin	Dicarboximide fungicide	AR-antagonist (12, 13)	Cleft phallus with hypospadias, cryptorchidism, vaginal pouch (12, 13, 14)	AGD ↓, nipples ↑ (13, 14, 23)	5 (23)	10, 5.0 for NR (23)
Prochloraz	Imidazole fungicide	AR-antagonist, inhibitor of foetal steroidogenesis (16), oestrogen receptor antagonist (17)	Reduction in testosterone, increase in progesterone levels in male rat foetuses at GD 21 in testis and plasma (16, 17), mild dysgenesis of external genitalia (17)	AGD ↓, nipples ↑ (15, 17)	5 (24)	10 (24)
Procymidone	Dicarboximide fungicide	AR-antagonist (3, 23, 25)	Reduced weight of several anti-androgen-dependent tissues, hypospadias and cryptorchidism (25)	AGD ↓, nipples ↑ (3, 23, 25)	10 (23)	25 (23)
Linuron	Urea-based herbicide	AR-antagonist (8, 9), inhibitor of foetal testosterone synthesis (8)	Enlarged testes, testicular and epididymal abnormalities (11), reduced testicular testosterone production (8)	AGD ↓, nipples ↑ (8, 11)	25 (26)	50 (26)
Epoxiconazole	Triazole fungicide	The site of action is possible lyase function of CYP17 in steroidogenesis (27)	No reproductive tract malformations detected, marked fetotoxicity in dams who were unable to deliver (27)	no effects (27)	15 (27)	-
p,p'-DDE	Metabolite of the insecticide DDT	AR-antagonist (29)	hypospadias (3)	AGD ↓, nipples ↑ (29, 30)	-	10 (30)
4-MBC	UV-filter	Oestrogenic (31), possess <i>in vitro</i> AR-antagonist potential (38)	Delay of preputial separation and weight decreases of ventral prostate (33)	-	0.7 (33)	7 (33)
OMC	UV-filter	Oestrogenic (31), possess <i>in vitro</i> AR-antagonist potential (38)	Decreased testosterone levels and decreased relative weight of testis (g/100 g bw) at PND 16, reduced sperm count at 8 month of age (34)	-	-	500 (34)
Bisphenol A	Plasticizers	Oestrogenic (35), <i>in vitro</i> AR-antagonist (39)	Decreased sperm count and motility (35)	-	5 (37)	1.2 μg/kg/day -for effects seen in (35)
BP	Antifungal preservative in cosmetics	Oestrogenic (36), <i>in vitro</i> AR-antagonist (38)	Decreased sperm count and motility (36)	-	-	100 (36)
Paracetamol	Analgesic and antipyretic	Inhibitor of prostaglandin synthesis (19, 20)	Positive association between ingestion during first and second trimester and cryptorchidism in humans (19)	AGD ↓, nipples ↑ (18)	-	350 (for AGD 150) (18)

AGD ↓ = decreased AGD, nipples ↑ = retained nipples. A hyphen (-) denotes cases where values could not be located in the open literature. References are bracketed itaics numbers and listed in the footnotes to this table.

References: 1 = (Andrade et al., 2006); 2 = (Christiansen et al., 2010); 3 = (Wolf et al., 1999); 4 = (Parks et al., 2000); 5 = (NRC, 2008); 6 = (Mykhreest et al., 1998); 7 = (Wilson et al., 2004); 8 = (Hotchkiss et al., 2004); 9 = (McIntyre et al., 2001); 10 = (Schultz et al., 2001); 11 = (McIntyre et al., 2002); 12 = (Kelce et al., 1994); 13 = (Gray et al., 1999); 14 = (Gray et al., 1994); 15 = (Vinggaard et al., 2005); 16 = (Vinggaard et al., 2006); 17 = (Lai et al., 2006); 18 = (Hass et al., 2010); 19 = (Kristensen et al., 2011); 20 = (Kristensen et al., 2010); 21 = (Buser et al., 2006); 22 = (Mykhreest et al., 2000); 23 = (Hass et al., 2007); 24 = (Christiansen et al., 2009); 25 = (Ostby et al., 1999); 26 = (McIntyre et al., 2001); 27 = (Taxvig et al., 2007); 28 = (Scianni et al., 2010); 29 = (Kelce et al., 1995); 30 = (You et al., 1998); 31 = (Schlumpf et al., 2001); 32 = (Axelstad et al., 2011); 33 = (Durrer et al., 2007); 34 = (Cousins et al., 2002); 35 = (Salian et al., 2009); 36 = (Kang et al., 2002); 37 = (European Food Safety Authority (EFSA) (2010)); 38 = (Ermler et al., 2011) and 39 = (Ermler et al., 2010).

**Tableau 7. Caractéristiques des 13 produits chimiques sélectionnés pour les inclure dans un mélange.** (D'après Christiansen et al., 2012).

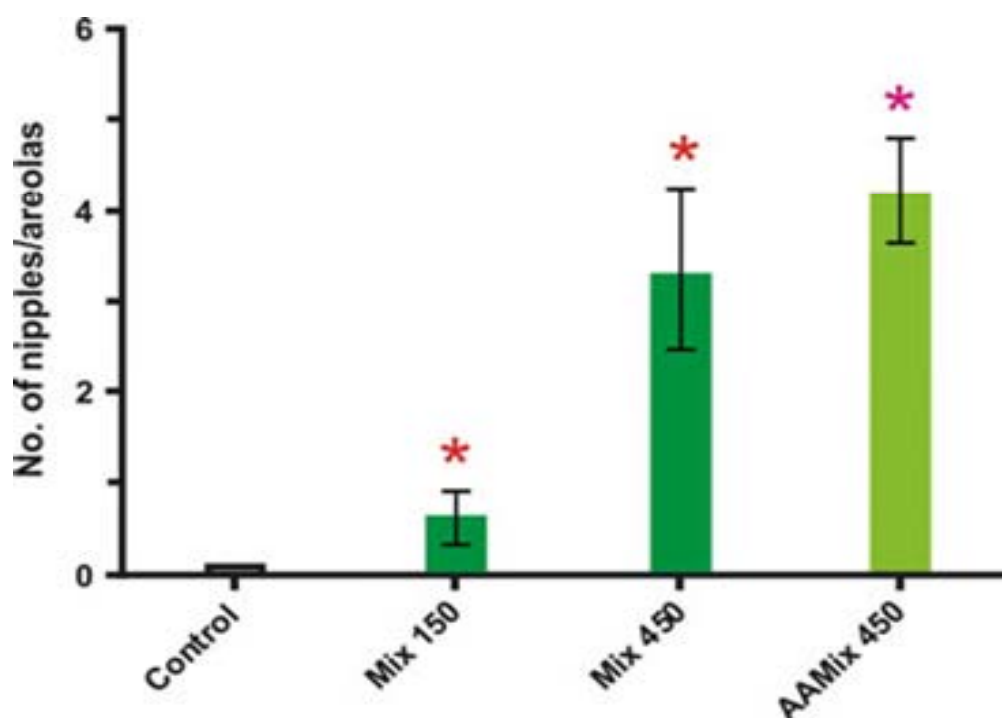
Concernant les SCs, trois mélanges sont réalisés pour l'étude : (i) le mélange SCéq-mix1 est composé de telle manière que chaque composé œstrogénique est présent en concentration équipotente sur la base du potentiel œstrogénique, (ii) et (iii) sont deux mélanges SCs supplémentaires qui ont été faits avec des concentrations de composés pour lesquelles l'effet prolifératif n'est pas maximal (SCéq-mix2) et des concentrations auxquelles l'effet est maximal (SCéq-mix3). Alors que pour PCmixes, ils sont étudié 4 types différents de mélanges (Tableau 5) (van Meeuwen et al., 2007). Ces mélanges semblent agir via le récepteur classique des œstrogènes (ER $\alpha$ ) (van Meeuwen et al., 2007).

Des expériences ont démontré que des mélanges de PEs à action anti-androgénique à des doses où individuellement chaque composé n'a pas d'effet, peuvent alors être actifs (Christiansen et al., 2009). Des œstrogéno-mimétiques peuvent aussi perturber le développement de l'appareil reproducteur masculin mais peu de choses sont connues sur les effets de mélanges d'œstrogéno-mimétiques et d'anti-androgènes (Christiansen et al., 2012). En outre, peu d'études utilisent dans ces mélanges des doses inspirées des concentrations auxquelles sont exposés les humains.

Ces auteurs ont aussi étudié l'effet d'un mélange de 13 composés (présentés dans le tableau 7) (œstrogéniques et/ou anti-androgéniques) sur le développement des mamelons (nipple retention) (Christiansen et al., 2012). Les rats mâles ont 0-1 mamelon tandis que les rates en ont 12-13. Plusieurs conditions ont été envisagées : présence des 13 composés dans le mélange (Mix450 ou Mix150), et élimination des 4 composés qui ont des effets œstrogéniques pour ne garder que les 9 composés qui ont des effets anti-androgéniques (AAMix450). Les mélanges ont été administrés à la mère par gavage du 7<sup>ème</sup> jour de gestation jusqu'au 22<sup>ème</sup> jour après la naissance.

Concernant le mélange Mix150, les doses combinées 150 fois plus élevées que les apports humaines ajustées devraient toujours être dans la gamme entre une NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) et une LOAEL (lowest-observed-adverse-effect-level), alors que les doses qui sont 450 fois plus élevées (Mix450) devraient conduire à effacer les signes de différenciation sexuelle, avec des changements significatifs dans la distance ano-genital et le nombre de mamelons (Christiansen et al., 2012).

Chez les mâles nouveaux-nés qui ont été exposés au Mix450 une augmentation significative du nombre de mamelons est observée (3,27) ainsi qu'une réduction significative du poids de



**Figure 46 : Effets d'une exposition combinée à des composés œstrogéniques et à des anti-angrogènes sur le développement des mamelons chez les rats mâles.**

Les observations sont faites 13 jours après la naissance. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type d'observations faites sur 13-14 portées. La signification statistique est indiquée par \*, avec  $p < 0,01$ .

Mix150 (doses combinées 150 fois plus élevées que les doses ajustées chez l'homme) et Mix450 (doses combinées 450 fois plus élevées que les doses ajustées chez l'homme) se réfèrent au mélange de 13 composés. AAMix450 correspond au mélange de 9 composés (exclusion des 4 composés œstrogéniques). (D'après Christiansen et al., 2012).

la prostate. Ces effets apparaissent aussi chez les rats exposés au AAMix450 (seulement les 9 composés anti-androgéniques) (Figure 46) (Christiansen et al., 2012).

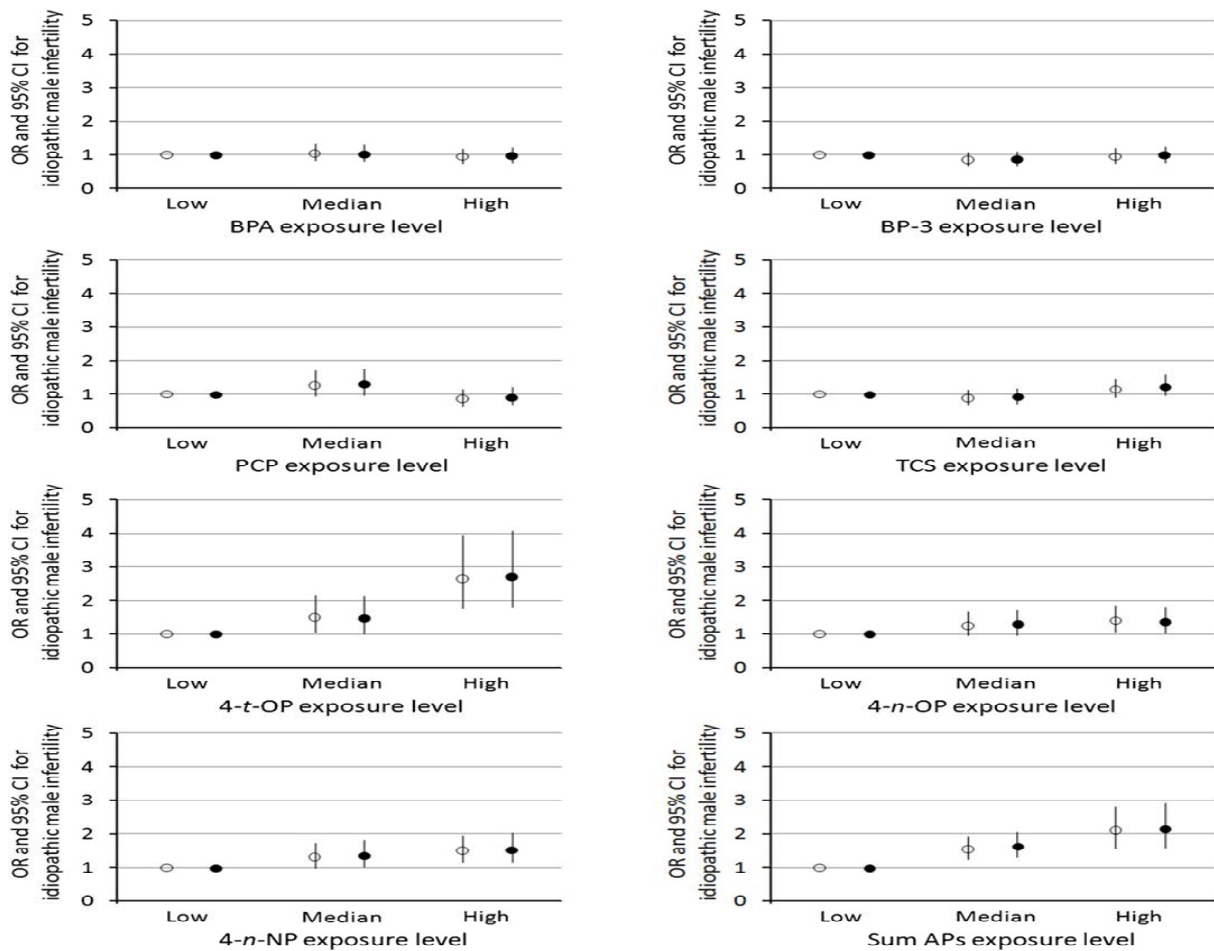
L'étude de Hernández et collaborateurs a montré que la présence des pesticides en mélange dans l'environnement ou dans la nourriture en faibles doses, a des effets toxiques sur la santé humaine. L'exposition à long terme à ces produits peut conduire à une gamme d'effets sur la santé, dont le cancer, la toxicité pour la reproduction et le développement. L'interaction entre les composés chimiques peut conduire à des réponses différentes selon leurs propriétés chimiques et les modes d'actions de chaque composé, ainsi que cette interaction représente une déviation de la simple additivité parce que les composés individuels affectent la toxicité d'un autre, ce qui entraîne, plus ou moins, un effet additif (Hernández et al., 2012).

Viñas et Watson ont comparé l'effet de produits xéno-œstrogènes (BPA, BPS, 4-NP) utilisés seuls ou en mélanges sur les cellules pituitaires (GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>/F<sub>10</sub>) chez le rat (Viñas et Watson, 2013). La concentration d'E2 utilisée comme témoin est 10<sup>-9</sup> M (concentration physiologique). Leurs résultats ont montré qu'utilisés individuellement, le bisphénol A et S n'ont pas activé JNK (c-Jun-N-terminal Kinase) tandis que le 4-NP le fait. La combinaison de deux ou trois composés xéno-œstrogènes avec l'E2 génère une dose réponse non monotone de ce qui concerne l'activation de JNK. L'E2 et ces composés utilisés isolément stimulent tous la prolifération des cellules mais en mélange les xéno-œstrogènes suppriment la stimulation de prolifération cellulaire habituellement induite par l'E2, suggérant même un effet apoptotique (Viñas et Watson, 2013).

L'activité de la caspase8 extrinsèque est supprimée par l'E2, élevée avec BPS, non affectée par les mélanges. L'activité intrinsèque de la caspase9 est inhibée par l'E2 et par des combinaisons mélanges des xéno-œstrogènes à (10<sup>-14</sup> et 10<sup>-8</sup> M). Ces mélanges empêchent la libération de prolactine (PRL) induite par l'E2. Le mélange (BPA+BPS+E2) inhibe la libération de PRL à faible dose (de manière significative à 10<sup>-11</sup> M) alors que le mélange (BPA+BPS+NP+E2) semble à 10<sup>-8</sup> M avoir abouti à la libération de PRL (Viñas et Watson, 2013).

Chen et son équipe ont trouvé chez l'homme, en mesurant les concentrations urinaires des composés phénoliques, un lien significatif entre l'exposition aux APs (4-n-NP, 4-n-OP et





**Figure 47 : Relation entre exposition aux APs et infertilité masculine.**

Odd ratios en valeurs brutes (cercles vides) et ajustées (cercles pleins) (Intervalle de confiance à 95%) pour l'infertilité masculine idiopathique lorsque l'exposition à BPA, BP-3 , PCP, TCS, 4-tert-OP, 4-n-OP, 4-n-NP augmente. La somme des APs (4-tert-OP, 4-n-OP et 4-n-NP) est également présentée (données ajustées pour l'âge, l'index de masse corporelle et la créatinine urinaire). (D'après Chen et al., 2013).

4-tert-OP) et l'infertilité masculine. En combinant l'exposition à ces APs ensemble, des corrélations significatives plus importantes ont été trouvées entre l'infertilité et l'exposition à l'ensemble de ces APs qui reflètent les niveaux d'exposition totale aux APs (Figure 47). Ces données confirment que le risque de la reproduction masculine causé par une exposition mixte aux APs dans la vie quotidienne doit être pris en compte (Chen et al., 2013).

Il a été mis en évidence des périodes de vie critiques (fœtale, périnatale et croissance) pour l'exposition aux PE. Le fœtus a d'une part, des mécanismes de filtration, de protection et de réparation moins performant que chez l'adulte, ce qui peut accroître la toxicité cellulaire. Ainsi, l'exposition prénatale peut aussi modifier le développement et les fonctions cellulaires en modifiant la (programmation) cellulaire, l'expression génique, la transcription. Les PE peuvent aussi engendrer des modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, avec des maladies qui n'apparaîtront qu'aux générations suivantes (effets transgénérationnels) (Nassouri et al., 2012).

En résumé, l'étude des effets de mélanges de perturbateurs endocriniens est nécessaire car les organismes sont exposés à de multiples substances dans l'environnement. Certaines données montrent des effets simples additifs ou synergiques mais des effets antagonistes peuvent aussi être observés.

## **Contexte et objectifs**

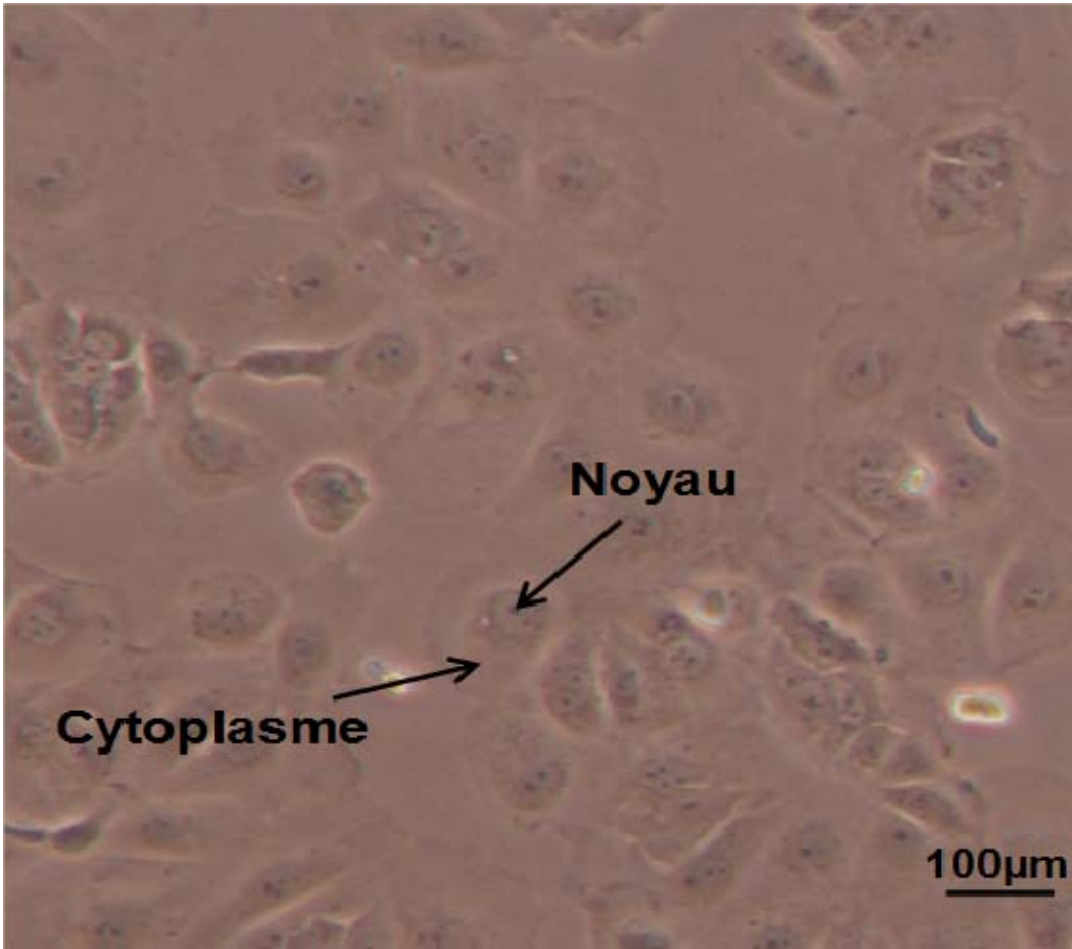


Figure 48 : Morphologie des cellules TCam-2 en culture adhérente.

Nous allons décrire les modèles cellulaires utilisés dans cette étude et les résultats obtenus par différentes expériences dans les différentes parties de l'étude.

## **1. Modèles cellulaires**

### **1.1. Cellules TCam-2**

Les tumeurs issues de cellules germinales testiculaires peuvent être classées en deux groupes : les séminomes et les non-séminomes.

Dans le cas des séminomes, qui représentent environ 50% de l'ensemble des TGCTs, il n'existe à ce jour aucun modèle animal mais deux lignées cellulaires permettent l'étude de la physiologie cellulaire : les cellules JKT-1 et les cellules TCam-2 (Figure 48). Toutes les deux sont des lignées cellulaires humaines issues de cancer testiculaire d'origine germinale de type séminome (de Jong et al., 2008).

Une caractérisation et une comparaison des différents marqueurs exprimés par les cellules JKT-1 et TCam-2 a permis de démontrer que les cellules TCam-2 sont les seules cellules séminomateuses alors que JKT-1 sont des cellules de carcinome embryonnaire dérivées d'une tumeur séminomateuse (Eckert et al., 2008).

C'est pour cette raison que le laboratoire a choisi d'effectuer ses recherches sur les cellules TCam-2, établies en 1993 par Mizuno à partir d'une tumeur séminomateuse pure prélevée chez un patient de 35 ans. Cette lignée a également été propagée par les mêmes auteurs après xénogreffe sur des souris SCID et représente donc actuellement la seule lignée séminomateuse disponible. Peu d'études ont été réalisées à ce jour sur ces cellules (Eckert et al., 2008; de Jong et al., 2008).

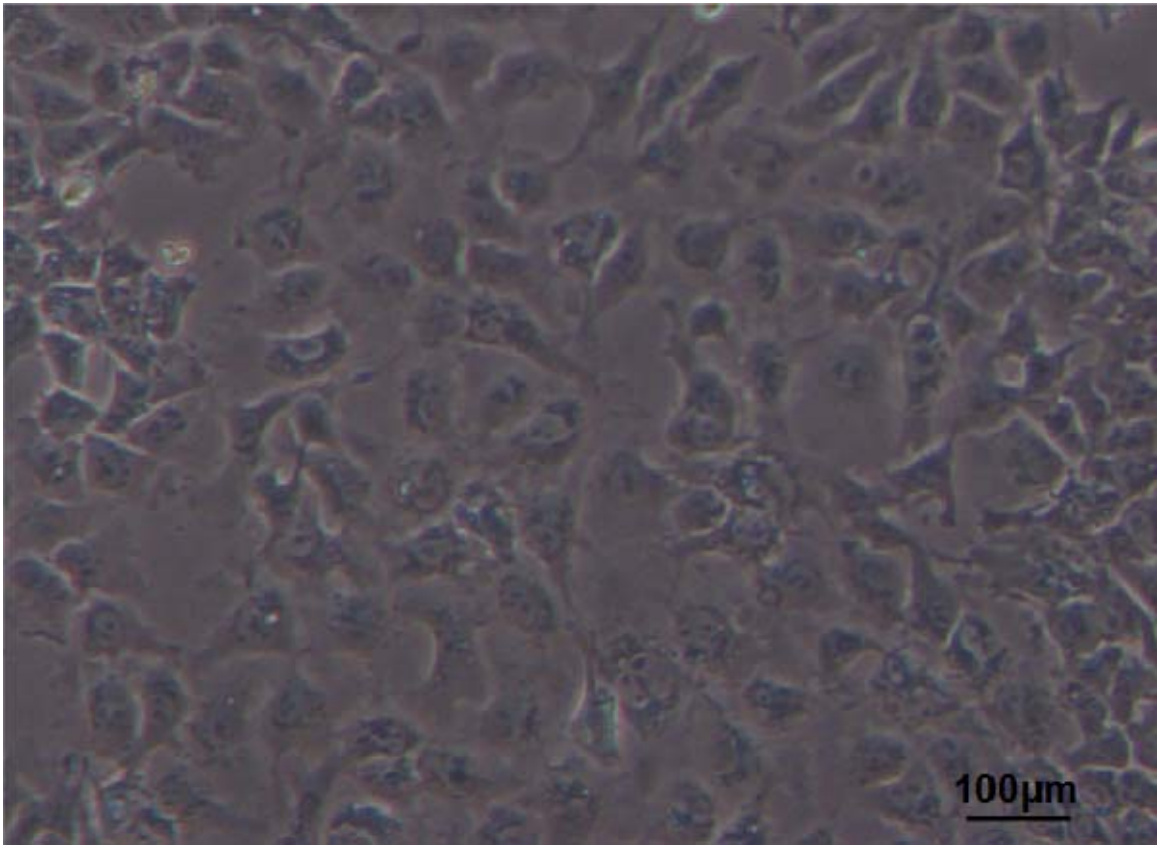
De plus, de Jong et collaborateurs ont étudié la constitution génomique, les mutations et l'expression de différents marqueurs exprimés dans les cellules TCam-2, la mutation d'un proto-oncogène BRAF, conduisant à l'activation constitutive de la voie de signalisation RAS, cette mutation pourrait expliquer que ces cellules puissent être propagées *in vitro* (de Jong et al., 2008).

Concernant la constitution génomique de la lignée TCam-2, de Jong et son équipe ont montré qu'il y a un gain d'un chromosome complet ou de bras complets (7p, 8q, 12p et le chromosome 20), par contre les délétions chromosomiques sont (9q, 13, 17p, 22 et Y). Les chromosomes (1, 2, 4, 7, 11, 18 et X) contiennent des gains ou des pertes d'une région restreinte. Le gain du bras court du chromosome 12 (12p), une aberration chromosomique caractéristique de toutes les TGCTs invasives, est clairement présent dans les cellules TCam-2, ainsi que dans les lignées cellulaires de carcinome embryonnaire (CE).

L'analyse des mutations montre que les cellules TCam-2 expriment des marqueurs de pluripotence tels que OCT3/4 et NANOG, ainsi que le récepteur c-Kit et son ligand KITLG, ainsi que PLAP (de Jong et al., 2008).

En revanche, des marqueurs tels que SOX2 (un marqueur de cellules souches embryonnaires) et CD30 (membre de la famille du tumor necrosis factor receptor, TNFR) ne sont pas exprimés dans les cellules TCam-2. En raison de la perte du chromosome Y, le gène TSPY ne s'exprime pas dans ces cellules. Concernant la mutation du gène BRAF, il s'agit d'une transversion de thymine par une adénine en position 1796 (T1796A), conduisant à la substitution de l'acide glutamique par la valine en position 600 (V600E).

Les cellules séminomateuses généralement entrent en apoptose rapidement quand leur microenvironnement est perturbé. Cependant, la présence d'une mutation soit dans la voie RAS ou une grande amplification de séquences 12p, conduisent à une prolongation de survie *in vitro*. Les deux événements améliorent la capacité de survie des cellules et de résistance à l'apoptose (de Jong et al., 2008).



**Figure 49 : Morphologie des cellules NT2/D1 en culture adhérente.**

## **1.2. Cellules NT2/D1**

La lignée NT2/D1 est une lignée de TGCTs non séminomateuse dérivée à partir d'une métastase pulmonaire de carcinome embryonnaire pluripotent, prélevée chez un patient âgé de 22 ans. Les cellules de cette lignée cellulaire sont hypotripléïdes (Figure 49).

Le chromosome Y ainsi qu'une seule copie des chromosomes 1, 10, 11 et 13, sont présents dans ces cellules. La plupart des autres chromosomes sont présents en deux ou trois copies par cellule (<http://www.lgcstandards-atcc.org>).

## **2. Problématique de la thèse**

Concernant l'exposition aux produits chimiques connus comme perturbateurs endocriniens, il est avéré que l'exposition des populations humaines à ces produits ne se limite pas à la période fœtale mais se poursuit de façon chronique, tout au long de la vie.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a eu pour objectif de déterminer l'effet d'une exposition aux androgènes aromatisables ou à des mélanges de perturbateurs endocriniens œstrogéno-mimétiques sur la prolifération de cellules de cancers testiculaires *in vitro* et *in vivo*. J'ai également caractérisé les mécanismes d'action mis en jeu.

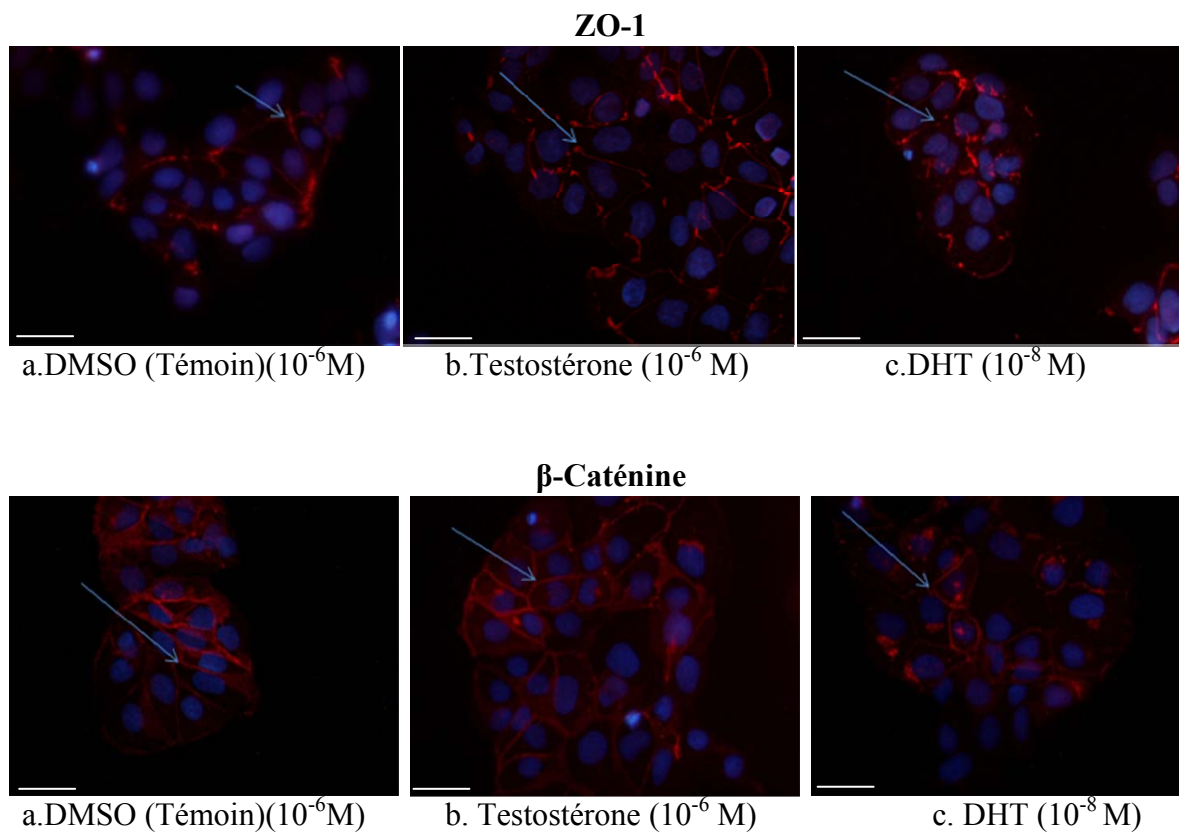
- en complément du doctorat d'Angelina Wallacides, qui visait à déterminer le rôle des œstrogènes sur la prolifération des cellules TCam2, j'ai tout d'abord étudié les effets d'une exposition à la testostérone, androgène aromatisable majoritairement produit dans le testicule post-pubère (**publication 1**).

- dans un second temps, et dans le cadre d'un partenariat avec l'ANSES (convention EST-08-09), j'ai caractérisé les effets de plusieurs mélanges de perturbateurs endocriniens œstrogéno-mimétiques sur la prolifération des cellules TCam-2.

- cette étude plus appliquée m'a conduit à me focaliser sur les effets d'un mélange d'alkylphénols à longue chaîne. J'ai ainsi caractérisé les effets prolifératifs de ce mélange, *in vitro* sur des cellules séminomateuses et de carcinome embryonnaire, et *in vivo* dans un modèle de souris Nude xénogreffées. J'ai déterminé *in vitro* les voies de signalisation activées. Enfin, une analyse par puces à ADN m'a permis de mettre en évidence les gènes cibles de ce mélange (**publication 2**).



## **Résultats**



**Figure 50 : Détermination de la localisation des protéines ZO-1 et  $\beta$ -Caténine dans les cellules TCam-2.** Après avoir été synchronisées pendant 72h, les cellules ont été exposées pendant 24h au traitement. En utilisant les marqueurs des jonctions intracellulaires, nous observons qu'il n'y a pas de différence de localisation des protéines entre les cellules traitées ou non traitées. La flèche indique le marquage membranaire. ZO-1 et  $\beta$ -Caténine en rouge, les noyaux en bleu (hoechst). La barre d'échelle correspond à  $10\mu\text{m}$ .

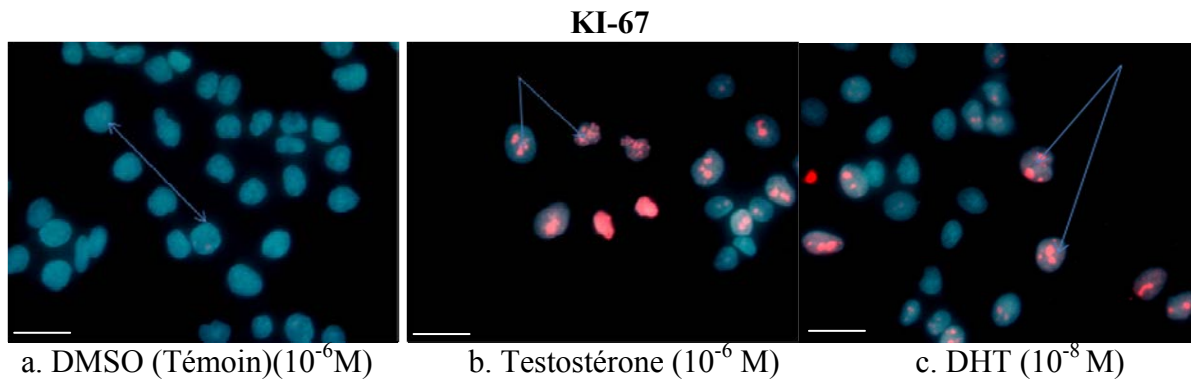
## **Résultats Partie I**

Au cours de sa thèse, A. Wallacides a montré que les œstrogènes augmentent la prolifération des cellules de la lignée TCam-2. Elle a examiné la voie signalisation de réponse à l'œstradiol ( $E_2$ ). En parallèle, nous avons donc étudié l'effet de la testostérone, un androgène aromatisable, et de la dihydrotestostérone (DHT), un androgène non aromatisable, sur la prolifération des cellules de cancer testiculaire, puis mis en évidence certains gènes cibles de ces androgènes et les voies de signalisation impliquées. Les doses utilisées ( $10^{-6}$  M pour la testostérone et  $10^{-8}$  M pour la DHT) correspondent à celles retrouvées classiquement dans le testicule humain adulte (Roth et al., 2010).

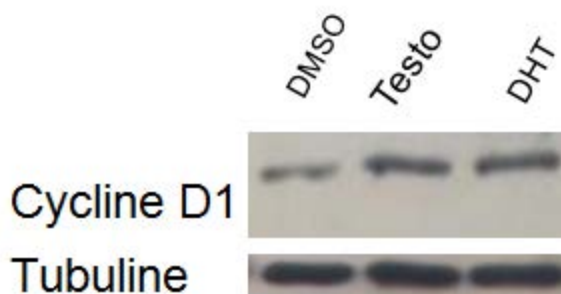
### **1. Caractérisation des effets de la testostérone les cellules TCam-2**

#### **1.1. Marqueurs de jonctions cellulaires**

L'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines ZO-1 et  $\beta$ -caténine, qui sont des marqueurs de jonctions intercellulaires, a montré que ces cellules expriment ces protéines au niveau de leur membrane. De plus, il n'y a pas de changement de la localisation de ces protéines dans les cellules après le traitement par la testostérone (Figure 50).



**Figure 51 : Marquage des cellules TCam-2 par le marqueur de prolifération KI-67.** Les cellules ont été synchronisées pendant 72h, puis traitées par le DMSO, la testostérone ou la DHT pendant 24h. Après fixation, les cellules ont été incubées avec l'anticorps et un marquage de l'ADN au hoechst a été réalisé pour visualiser les noyaux. Les cellules traitées par DMSO ne montrent aucun marquage par le KI-67. Après 24h de traitement par les androgènes, nous observons qu'il y a une augmentation du nombre des cellules marquées par l'anticorps KI-67. La barre d'échelle correspond à  $10\mu\text{m}$ .



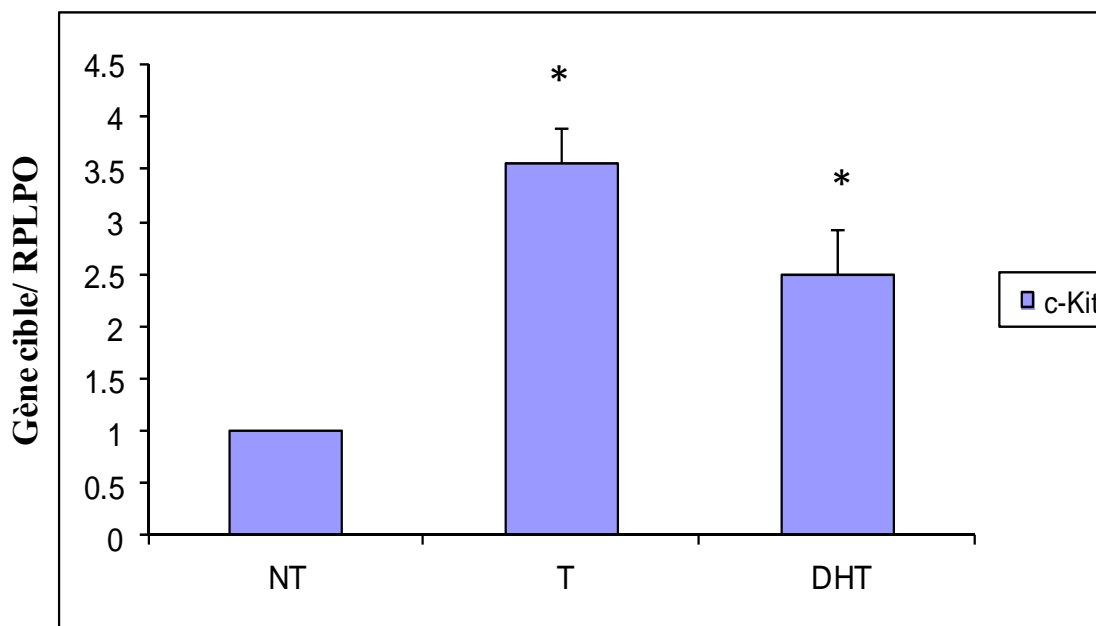
**Figure 52 : Détection de la cycline D1 par western blot.** Les résultats sont obtenus à partir d'échantillons de protéines extraites des cellules TCam-2 traitées pendant 24h par le DMSO (témoin), la Testostérone ( $10^{-6}$  M) ou la DHT ( $10^{-8}$  M).

## 1.2. Marqueurs de prolifération

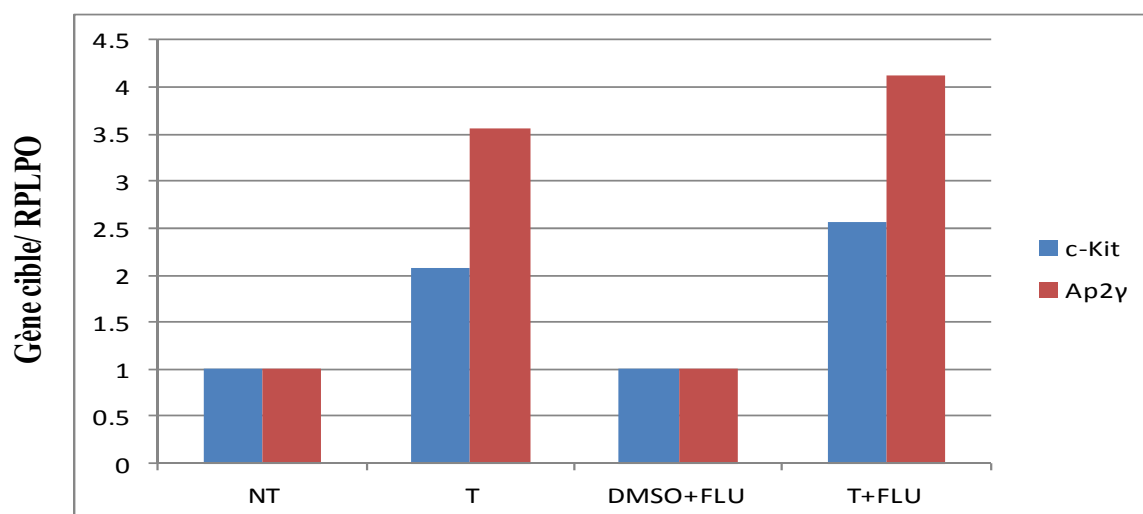
Des tests de viabilité cellulaire sont rapportés dans la publication qui suit (Wallacides et al., 2011), et ont permis de montrer qu'une exposition à la testostérone induit la prolifération des cellules TCam-2 selon une courbe dose-réponse en cloche. Ces résultats ont été complétés par l'étude de l'expression de divers marqueurs de prolifération cellulaire.

Nous avons marqué les cellules avec l'anticorps anti-KI-67, qui est un marqueur de la prolifération cellulaire. Cet anticorps est dirigé contre une protéine nucléaire que les cellules expriment quand elles entrent en phase G1 du cycle cellulaire mais n'expriment pas quand elles sont en G0. Nous avons observé une augmentation du nombre des cellules marquées par l'anticorps anti-KI-67 après le traitement par les androgènes (Figure 51).

Nous avons aussi mesuré l'expression de la Cycline-D1, marqueur d'entrée en G1 du cycle cellulaire. Donc nous avons testé l'expression de Cycline-D1 par Western Blot (Figure 52). Nous avons comparé à l'expression de la tubuline alpha, protéine de référence (présente dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et utilisée comme un témoin parce qu'elle indique la quantité totale de protéines dans les échantillons). Le résultat a montré qu'après stimulation par la testostérone ( $10^{-6}$  M), les cellules expriment plus la cycline D1 et ce qui est cohérent avec l'augmentation de la prolifération cellulaire.



**Figure 53 : Effets de la Testostérone et de la DHT sur l'expression du gène c-Kit.** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules traitées pendant 24h par le DMSO (NT témoin), la Testostérone ( $10^{-6}$  M) ou la DHT ( $10^{-8}$  M). Les rapports c-Kit/RPLPO sont montrés pour les différents traitements. Le rapport du témoin exposé au DMSO (NT) est ramené à 1. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  s.e.m de 3 expériences indépendantes. \*, significativement différent du témoin (NT) ( $p < 0,01$ ). (Test de Student).



**Figure 54 : Effet du flutamide (antagoniste du récepteur des androgènes) sur l'expression de c-Kit et AP2γ induite par la testostérone.** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules traitées pendant 24h par le DMSO (témoin), la Testostérone (T,  $10^{-6}$  M) en présence de Flutamide (FLU  $10^{-6}$  M). Les rapports gène d'intérêt/RPLPO sont montrés pour les différents traitements. Le rapport du témoin (DMSO + FLU) est ramené à 1. Les valeurs correspondent à une expérience.

Nous avons testé aussi l'expression du gène c-Kit qui est un gène marqueur de cellules souches de la lignée germinale et un marqueur de la prolifération cellulaire. La testostérone stimule significativement ( $t = 9,93$   $p < 0,01$ ) l'expression de c-Kit (Figure 53).

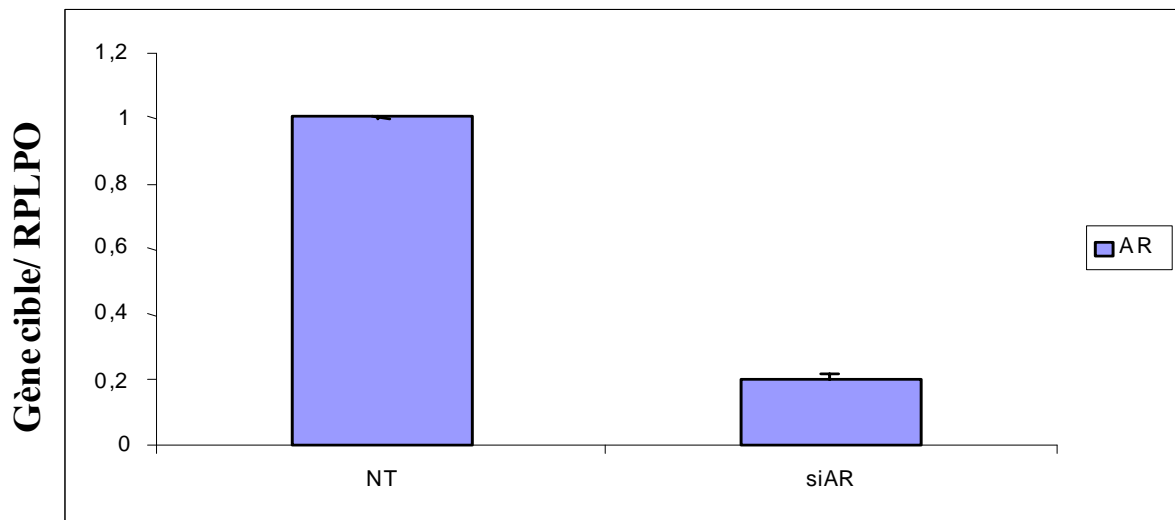
## **2. Mode d'action de la testostérone**

### **2.1. Rôle du récepteur des androgènes**

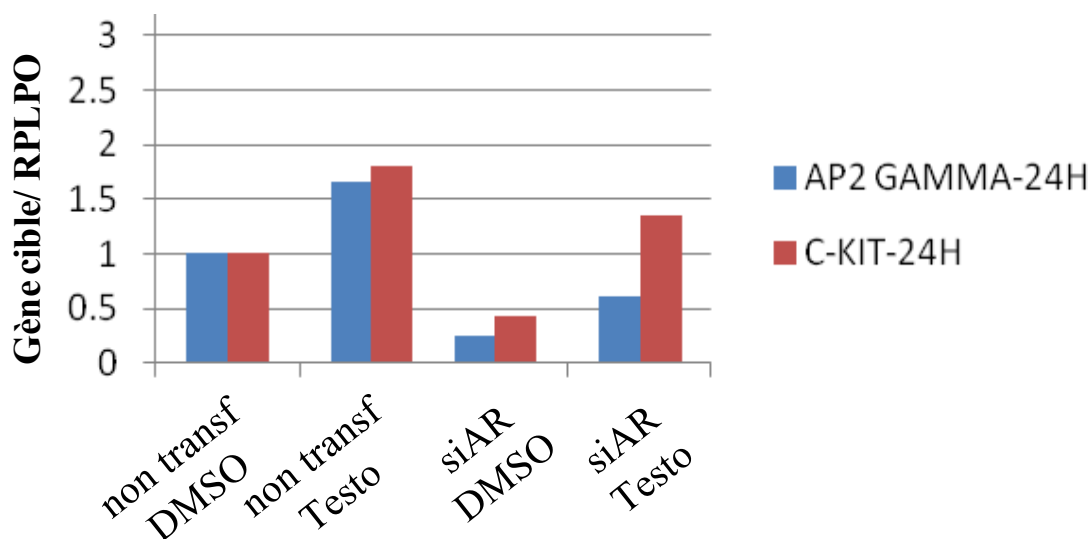
#### **2.1.1. Antagonistes**

Pour savoir si le récepteur des androgènes était impliqué dans l'action de la testostérone, nous avons utilisé des antagonistes pour ce récepteur : le Flutamide (flu) et le Cyprotérone acétate (cyp.A). Nous avons étudié l'effet par l'analyse de c-Kit marqueur de la prolifération ainsi que par analyse du gène cible des œstrogènes AP2 $\gamma$ .

Après 24h de traitement par la testostérone, les résultats d'une expérience montrent qu'il n'y a pas d'effet significatif du Flu à  $10^{-6}$  M, sur l'expression d'AP2 $\gamma$  et de c-Kit qui sont toujours stimulés (Figure 54). Les résultats obtenus avec l'acétate de Cyprotérone n'étant pas cohérents, ils ne sont pas présentés.



**Figure 55 : Vérification par PCR en temps réel de la diminution l'expression du gène AR (androgène récepteur) sous l'effet d'ARN interférent.** L'analyse est faite 24h après la transfection des cellules TCam-2 avec le siARN dirigé contre le récepteur AR (siAR). Les cellules témoins (NT) sont traitées avec des siARN témoins ne ciblant aucun gène. Les valeurs correspondent à la moyenne +/- s.e.m. de 3 expériences indépendantes. (Test de Student).



**Figure 56 : Effet de la transfection par siAR sur l'expression des gènes qui sont des marqueurs de la prolifération cellulaire (c-Kit) et de la signalisation des œstrogènes (AP2 $\gamma$ ).** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules traitées par le DMSO ou la testostérone ( $10^{-6}$  M) pendant 24h. Le rapport gène d'intérêt/RPLPO du témoin est ramené à 1. Les valeurs correspondent à une expérience.



### **2.1.2. Interférence ARN**

Nous avons utilisé une autre stratégie avec de séquences siARN dirigées contre le récepteur des androgènes (AR). L'ARN interférence entraîne la dégradation de l'ARNm et inhibe donc la traduction correspondante.

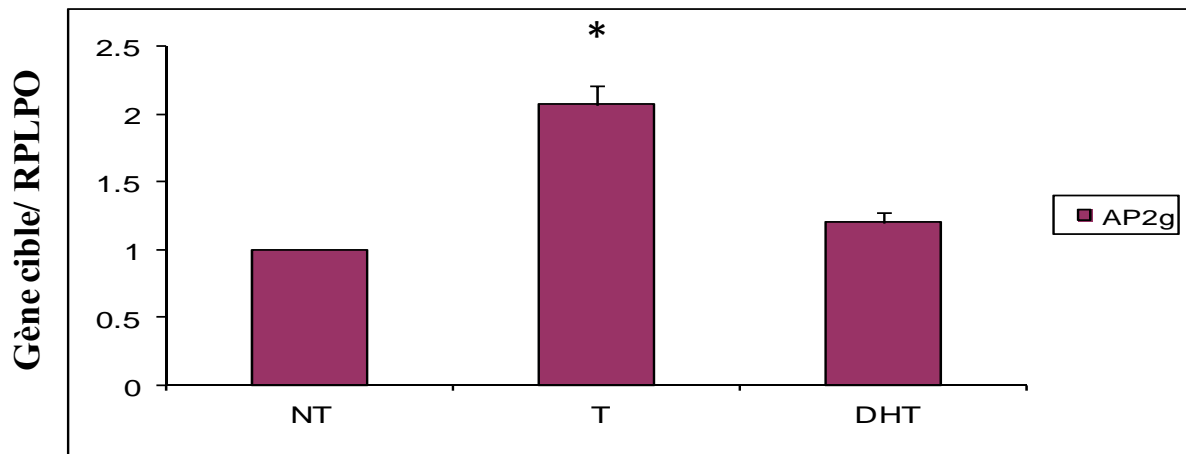
Nous avons vérifié l'efficacité de la transfection par les ARN interférants en comparant l'expression du récepteur des androgènes dans des cellules TCam-2 non transfectées par rapport aux cellules transfectées (Figure 55). L'interférence est très efficace car nous observons environ 80% d'inhibition de l'expression d'AR en présence de siAR.

Ensuite, nous avons mesuré l'expression d'AP2 $\gamma$  et c-Kit après 24h de traitement par la testostérone dans des cellules transfectées par le siAR (Figure 56). Nous observons que le siAR n'inhibe pas significativement l'augmentation d'expression d'AP2 $\gamma$  ni de c-KIT induites par la testostérone.

### **2.2. Les autres voies de signalisation**

Les résultats présentés dans la publication ont montré que l'augmentation de prolifération habituellement induite par de la testostérone, androgène aromatisable, est bloquée en partie par un inhibiteur d'aromatase (AI1). Cela suggérerait une action de la testostérone due au moins partiellement à son aromatisation en E<sub>2</sub>. Pour confirmer cette hypothèse nous avons d'abord analysé l'expression d'un gène cible des œstrogènes, AP2 $\gamma$ .

Nous avons testé l'expression des gènes comme AP2 $\gamma$  qui est décrit comme un gène cible de l'œstradiol dans le cancer du sein. Seule la testostérone stimule significativement l'expression



**Figure 57 : Effets de la Testostérone et de la DHT sur l'expression du gène AP2 $\gamma$ .** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules traitées pendant 24h par le DMSO (NT témoin), la Testostérone ( $10^{-6}$  M) ou la DHT ( $10^{-8}$  M). Les rapports AP2 $\gamma$ /RPLPO sont montrés pour les différents traitements. Le rapport du témoin exposé au DMSO (NT) est ramené à 1. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  s.e.m de 3 expériences indépendantes. \*, significativement différent du témoin (NT) ( $p < 0,01$ ). (Test de Student).

du gène AP2 $\gamma$  ( $t = 14,47$   $p < 0,01$ ) (Figure 57). Ceci est en accord avec le mode d'action proposé pour la testostérone, à savoir une aromatisation et la formation d'E<sub>2</sub>. La DHT, non aromatisable, ne stimule pas significativement son expression ( $t = 2,71$ , NS).

### **3. Conclusion**

Pendant la première partie de ma thèse, j'ai permis une meilleure caractérisation de ces cellules. J'ai montré que les cellules TCam-2 expriment des marqueurs de jonctions cellulaires comme ZO-1 et  $\beta$ -caténine dont l'expression et la localisation ne sont pas affectées par un traitement à la testostérone. Ces résultats préliminaires suggèrent que les capacités de migration des cellules ne sont pas induites par la testostérone.

De plus, j'ai montré qu'une augmentation de la prolifération par traitement à la testostérone était aussi associée à l'augmentation de certains marqueurs de prolifération comme Ki67, cycline D1 ou c-Kit.

Pour déterminer les voies de signalisation impliquées dans la réponse à la testostérone nous avons fait d'abord l'hypothèse que la testostérone agit via le récepteur des androgènes. L'utilisation d'antagonistes et la technique d'interférence à ARN dirigée contre le récepteur des androgènes nous ont permis de rejeter cette hypothèse. En revanche, nous avons montré que la testostérone agit via des voies de signalisation œstrogéniques après aromatisation. Dans la suite de mon travail, je me suis donc focalisé sur des aspects plus appliqués en caractérisant les effets de polluants œstrogéno-mimétiques sur la prolifération et les voies de signalisation associées.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mce](http://www.elsevier.com/locate/mce)

## Estrogens promote proliferation of the seminoma-like TCam-2 cell line through a GPER-dependent ER $\alpha$ 36 induction

Angelina Wallacides, Amand Chesnel, Hussein Ajj, Martine Chillet, Stéphane Flament, H  ne Dumond \*

EA4421, Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie, Nancy-Université, Nancy, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 June 2011

Received in revised form 17 November 2011

Accepted 17 November 2011

Available online 25 November 2011

#### Keywords:

TCam-2

Seminoma

Estrogens

ER $\alpha$ 36

Proliferation

### ABSTRACT

Seminoma, originated from carcinoma in situ cells (CIS), is one of the main causes of cancer in young men. Postpubertal development of these testicular germ cell tumors suggests a hormone-sensitive way of CIS cell proliferation induction.

Using the unique seminoma TCam-2 cell line, we demonstrate that both estradiol and testosterone can stimulate TCam-2 cell proliferation in the absence of the estradiol receptor ER $\alpha$ . We establish that estradiol can activate GPER-cAMP/PKA signalling pathway. TCam-2 cells express ER $\alpha$ 36, a truncated isoform of the canonical ER $\alpha$  receptor, the expression of which is rapidly induced after estrogen treatment in a GPER-dependent manner. ER $\alpha$ 36 knockdown indicates that ER $\alpha$ 36 is (i) a downstream target of E<sub>2</sub>-activated GPER/PKA/CREB pathway, (ii) required for estradiol-dependent EGFR expression, (iii) necessary for cell proliferation. Colocalization of ER $\alpha$ 36 with cytoskeleton microfilaments suggests a role of estrogens in cell motility.

Our results highlight the functional role of ER $\alpha$ 36 in context of seminoma cell proliferation and the importance of testing ER $\alpha$ 36 in vivo as a possible future prognostic marker.

   2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Among malignant tumors of the testis, 95% are type II germ cell tumors (GCT), which incidence has worryingly risen over the last 50 years to become the most common tumors and the leading cause of cancer among young men aged 15–40 years. Based upon histologic traits, type II GCTs are classified into two main categories: seminoma and nonseminoma, both derived from a common precursor cell type called carcinoma in situ (CIS) (Skakkebaek, 1972).

CIS are believed to originate from developmentally arrested primordial germ cells or gonocytes (Almstrup et al., 2005; Rajpert-de Meyts and Hoei-Hansen, 2007; Sonne et al., 2009) that enter a period of dormancy until after puberty when type II GCT emerge. This prepubertal dormancy suggests a hormone-dependent mechanism for type II GCTs development at puberty, or tumor progression (McIntyre et al., 2007, 2008). Additionally, several pathologies related to testis cancer, such as cryptorchidism, hypospadias as well as decreased sperm counts, have been observed mainly after exposure to endocrine disruptors, i.e. environmental molecules having

either estrogenic or anti-androgenic effects (Martin et al., 2008; Main et al., 2010).

The androgen/estrogen balance is essential for reproduction in mammals, especially for gonad development. In the testis, this balance is tightly regulated by endocrine and paracrine factors and the enzyme aromatase that converts androgens to estrogens. *Cyp19* transcripts were detected in Leydig and Sertoli cells as well as differentiated germ cells extending from spermatocyte to spermatozoan stage (Carreau and Hess, 2010; Carreau et al., 2010). The role of estrogens in male gonads and reproductive tract was highlighted by the discovery of patients genetically deficient in aromatase who display variable degrees of fertility disorders up to impaired spermatogenesis (Jones et al., 2006). Depletion of endogenous estrogens in the aromatase deficient mice (ArKO) resulted in an impairment of sexual behaviour and an age-dependent disruption of spermatogenesis. This disruption occurred during early spermiogenesis, possibly due to an increased number of apoptotic round spermatids (Murata et al., 2002).

Once produced, estrogens can act through an interaction with estrogen nuclear receptors (ERs, i.e. ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) which in turn exert their biological effects via both genomic and nongenomic signalling and transcriptional stimulation of estrogen responsive genes. The genomic estrogen signalling is mediated directly by binding to nuclear ER $\alpha$  and ER $\beta$  responsive elements. Through nongenomic ways, estrogen-like molecules can target kinase cascades, and tyrosine kinases or membrane-associated molecules such as

\* Corresponding author. Address: Nancy-Université, Faculté des Sciences, EA4421, Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-l  s-Nancy cedex, France. Tel.: +33 (0)3 83 68 42 59; fax: +33 (0)3 83 68 41 96.

E-mail address: [helene.dumond@scbiol.uhp-nancy.fr](mailto:helene.dumond@scbiol.uhp-nancy.fr) (H. Dumond).

ion channels and G protein-coupled receptors (Simoncini et al., 2002, 2004). ER $\beta$  is expressed in either somatic (Leydig, peritubular, Sertoli) or germ cells (gonocytes to spermatozoans) of human testis whereas ER $\alpha$  is absent from gonocytes, peritubular and Sertoli cells (Pentikäinen et al., 2000; O'Donnell et al., 2001). Studies in rodents, namely the phenotype of single ER $\alpha$ KO or ER $\beta$ KO or of double ER $\alpha$ /ER $\beta$  KO mice have demonstrated that ER $\beta$  triggers a negative signal toward germ cell proliferation (Delbès et al., 2006).

Ten years ago, Filardo (Filardo et al., 2000; Filardo, 2002) described the transmembrane receptor GPR30, an orphan member of the G protein-coupled receptor superfamily that can mediate estrogen responsiveness of ER-negative breast cancer cells. Now renamed GPER, this receptor mediates a wide range of responses to estrogen in a large variety of cell types through cAMP, MAPK and PI3K pathways, some of which being redundant with those of nuclear estrogen receptors (Pandey et al., 2009). Furthermore, several environmental contaminants (bisphenol A, zearalenone, nonylphenol) which were shown to exert estrogenic actions through binding to ERs also bind to GPER with a sufficient affinity to allow the activation of alternative estrogen signalling pathways in ER-negative GPER-positive cell lines (Thomas et al., 2005; Thomas and Dong, 2006; Maggiolini and Picard, 2010; Bouskine et al., 2010).

In 2005, Wang and colleagues described a novel 36 kDa ER $\alpha$  isoform called ER $\alpha$ 36, a truncated form of the canonical human estrogen receptor ER $\alpha$ 66, retaining the DNA-binding, partial dimerisation and ligand-binding domains. Owing to the lack of both transcriptional activation domains (AF-1 and AF-2), this protein was thought to function as a dominant-negative of ERs. The involvement of ER $\alpha$ 36 in nongenomic estrogen signalling, concurrently to GPER, was further demonstrated in various breast cancer cell lines (Wang et al., 2005, 2006; Lee et al., 2008; Lin et al., 2009, 2010). More recently, Zhang et al. (2010) demonstrated that ER $\alpha$ 36 mediates E<sub>2</sub> dependent signalling in ER-negative breast cancer cells suggesting that a subset of ER-negative tumors thus retains responsiveness to mitogenic estrogen signalling.

Although the transcriptional responses mediated by the nuclear ERs have been extensively characterized, the changes in gene expression elicited by signalling through GPER or ER $\alpha$ 36 have not been studied in the context of either germ cell neoplasia or testicular germ cell cancer. Our aim was to decipher the estrogen-dependent transduction pathways in Tcam-2 cells, a unique seminoma cell line isolated by Mizuno from a pure seminoma (Mizuno et al., 1993). First, we show that either estradiol or testosterone can increase the Tcam-2 proliferation rate by triggering the stimulation of ER $\alpha$ 36 expression. Second, we indicate that those effects depend on GPER-PKA pathway activation. Finally, we demonstrate that estrogen signalling pathway can trigger ER $\alpha$ 36-dependent EGFR expression.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Steroids, BSA-conjugated steroids, H89 (cAMP/PKA inhibitor) and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (France). All compounds were solubilized in DMSO for  $1 \times 10^{-2}$  M stock solution and further diluted in RPMI medium without phenol red. Working concentrations were 1 nM for 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) and BSA-conjugated 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>BSA), 1  $\mu$ M for testosterone (T) and BSA-conjugated testosterone (TBSA). Control cells were treated with 0.01% DMSO.

### 2.2. Cell culture

Tcam-2 cells were maintained in RPMI 1640 (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Sigma) and 2 mM L-gluta-

mine (Sigma) in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Briefly, cells were plated in 10% FCS containing RPMI medium for 24 h and then starved for 24 h in 0.5% stripped FCS containing RPMI medium without phenol red. Treatments were performed on FCS deprived cells plated at a density of  $8 \times 10^4$  cells per well in 6-well plates. In case of inhibitor use, the corresponding compound was added to the medium 30 min before steroid treatment.

### 2.3. Cell proliferation assay

Cells were seeded in 6-well plates at a density of  $4 \times 10^4$  cells/well in 2 mL RPMI medium supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Cells were washed with PBS (GIBCO) once they had attached and then incubated in phenol red-free RPMI containing 1% charcoal-stripped FCS for 24 h. Cells were then treated with the indicated treatments; medium was renewed every 2 days (with treatments). At the end of the treatment, cells were washed with PBS, trypsinized and counted with the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières, France) on a VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer). Each treatment was performed in triplicate.

### 2.4. Colony formation assay

Clonogenic assay was performed into 6-well plates coated with 0.5% Agar containing 10% FCS supplemented RPMI. Each well then received  $3 \times 10^2$  Tcam-2 cells dispersed into 1.2% methylcellulose (R&D systems, Lille, France), 20% FCS supplemented RPMI. Plates were then incubated at 37 °C, in a 0.5% CO<sub>2</sub>, humid atmosphere, for 14 days before colony counting. Additionally, cells were treated with 1 nM E<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M T or DMSO as vehicle. Colonies containing more than 100 cells, i.e.  $\geq 0.5$  mm diameter in size, were taken into account and counted by using an inverted microscope.

### 2.5. Real-time PCR analysis

RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using random hexamer primers and mouse Moloney leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed in the Opticon 2 detection system (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), using 0.1  $\mu$ M of each primer, IQ SYBR Green Supermix (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) in a total volume of 15  $\mu$ L. The ribosomal protein RPLPO encoding mRNA was used as a control to obtain normalized values. Primers are listed in Table 1. Assays were performed at least in triplicate, and the mean values were used to calculate expression levels, using the  $\Delta\Delta C(t)$  method. For each gene expression tested, the value indicated on figures was calculated as the ratio gene of interest/reference gene (RPLPO). When steroid treatments were performed, the variation of expression was measured as steroid treated/DMSO treated cells.

### 2.6. Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed using hexamer primers and 100 U M-MLV reverse transcriptase in a total volume of 25  $\mu$ L. A 2  $\mu$ L aliquot of resultant cDNA was used for PCR.

The amplification (40 cycles for *Cyp19* or 24 cycles for *RPLPO*) was performed with a 55 °C hybridization temperature with 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 pmol of each primer in a total volume of 25  $\mu$ L. PCR products (12  $\mu$ L) were run in a 1% agarose gel containing 0.5  $\mu$ g/mL ethidium bromide.

**Table 1**  
Primer list.

Gene	Forward primers (5'–3')	Reverse primers (5'–3')
RPLPO (QPCR)	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	CCATCAGCACCACAGCCTTC
ER $\alpha$ 36 (QPCR)	CCAAGAATGTTCAACCACAACCT	GCACGGTTCATTAACATCTTTCTG
CYP19	CTGGAAGAATGTATGGACTT	GATCAATTCAGCATGTTTT
RPLPO	ACAACCCAGCTCTGGAGAAA	TCGTTTGTACCCGTTGATGA
GPER	TGGTGGTGAACATCAGCTTC	AAGCTCATCCAGGTGAGGAA

### 2.7. RNA interference

The small-interfering RNA (siRNA) duplexes for targeting GPER and scrambled control (negative control) were purchased from Eurogentec (Belgium). The sequences of the human GPER siRNAs were 5'-GCACCUUCAUGUCGUCUU-3' and 5'-AAGACGCAUGAAGGUGC-3' for duplex n°1, 5'-UUGAACACCUCAAUGAGGG-3' and 5'-CCCUCUUGAGGUGUCAA-3' for duplex n°2, 5'-AAGACUCUUGCAGGGAGC-3' and 5'-GCUCCUGCAAGCAGUCUU-3' for duplex n°3. The control duplex was provided by Eurogentec (SR-CL000-005, Angers, France). The day before transfection,  $8 \times 10^4$  cells/well were plated into 6-well plates, in 2 mL of RPMI medium supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Cells were transiently transfected with either GPER (200 nM of the mix duplex 1, duplex 2 and duplex 3) or control siRNAs using the Oligofectamine™ Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, cells were washed with PBS and the medium was replaced with phenol red-free RPMI supplemented with 1% charcoal-stripped FCS and 2 mM L-glutamine. 24 h later, cells were treated in phenol red-free and FCS free RPMI and harvested for further analyses.

### 2.8. Western immunoblotting

Total proteins were separated by 12% SDS–PAGE. Proteins were then transferred onto Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham), where non specific binding sites were blocked in TNT buffer (5 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% non-fat powder milk, and incubated overnight at 4 °C with polyclonal anti-ER $\alpha$ 36 kindly provided by Dr Wang Z.Y. (Creighton University Medical School, Omaha, USA) diluted at 1:500, anti-cyclinD1 (1:500; Cell signalling #2922, Saint Quentin, France), anti-ER $\alpha$  (sc73479, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA), anti-EGFR (1:1000; Cell signalling #2232, Saint Quentin, France), anti-phospho CREB (1:1000; Epitomics #1113-5, Montrouge, France) or anti-alpha tubulin antibody (Santa-Cruz) diluted at 1:5000 as a loading control. Next, the membranes were washed 3 times with TNT and incubated for 1 h with a peroxidase-linked secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>). Western blot signals were detected by the use of ECL Western Blotting Substrate (Pierce) and exposition to Clear Blue X-ray film (CL-Xposure, Thermo Scientific).

### 2.9. Immunocytochemistry (ICC)

After a 30 min pre-treatment with 10  $\mu$ M H89 (cAMP/PKA pathway inhibitor) and a 15 min treatment with 1 nM E<sub>2</sub>, cells were fixed for 15 min in PBS, 4% paraformaldehyde (Merck). Then, samples were permeabilized in 0.25% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 10 min and a 30-min step of saturation was performed in 4% bovine serum albumin (BSA, Sigma) and 0.1% Triton X-100 containing PBS. Primary antibody incubations were carried out for 1 h with anti-EGFR (1:200; Cell signalling #2232, Saint Quentin, France), anti-phospho CREB (1:1000; Epitomics #1113-5, Montrouge, France) or anti-CREB (1:200; Upstate NL904, Euromedex, Mundols-

heim, France) antibodies. Cells were washed three times in 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min. Secondary antibody incubations were performed during 45 min with a fluorescent-conjugated secondary antibody Alexa555-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen). Then, samples were washed three times in 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min, and nuclei were stained with Hoechst (bis-Benzimidazole H 33342 trihydrochloride, Sigma–Aldrich France, 0.1  $\mu$ g/mL in PBS). Slides were mounted with AquaPoly/Mount (Polysciences Inc., Warrington, PA).

### 2.10. Transient transfection and establishment of stable cell line

TCam-2 cells transfected with the empty expression vector or the ER $\alpha$ 36-specific shRNA expression vector kindly provided by Dr Wang Z.Y. (Creighton University Medical School, Omaha, USA) using the ExGen500 in vitro transfection reagent (Euromedex, France). Transfected cells were kept for 6 h, and then the ExGen500-DNA complex was removed. Two days after transfection, cells were incubated in medium containing 400  $\mu$ g/mL of G418 Geneticin (Invitrogen) for 3 weeks; the cells proliferated continuously in the presence of G418 and formed a large number of expanding undifferentiated colonies which named as Neo-TCam-2 and sh36-TCam-2, respectively. The transfected cell lines were not subcloned. Rather, knocked down level of ER $\alpha$ 36 expression was confirmed by western blot and RT-PCR analysis before each experiment.

### 2.11. Transmission electron microscopy

Cells were pelleted and fixed for 4 h in 2.5% glutaraldehyde (Euromedex, Mundolsheim, France) in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 (Euromedex). Cells were then rinsed with sodium cacodylate buffer and postfixed in 1% osmium tetroxide (Euromedex) for 1 h at room temperature. Samples were washed and then dehydrated through a graded series of ethanol solutions followed by propylene oxide, and then infiltrated in 1:1 propylene oxide/poly Bed 812 (Euromedex). Samples were kept overnight embedded in Poly Bed 812, mounted in molds and left to polymerize in an oven at 56 °C for 48 h. Ultrathin sections (70–90 nm) were obtained with a Reichert-Jung Ultracut S microtome (Wien, Austria).

Sections were exposed to anti-ER $\alpha$ 36 antiserum (1:200 dilution in TBS) for 1 h at room temperature. The specimen were subsequently incubated with goat anti-rabbit IgG antibodies conjugated with colloidal gold (particle size of 10 nm) (BioCell, Cardiff, UK) at a 1:10 dilution for 45 min. Finally, sections were stained for 20 min with 2% (w/v) uranyl acetate, viewed, and photographed with a Philips CM12 transmission electron microscope operated at 80 kV.

### 2.12. Statistical analysis

Realtime-PCR results were analyzed as follows: variance analysis of steroid-treated vs. vehicle-treated cells was performed using Dunnett's test for multiple comparisons. Differences in which *P* was less than 0.05 were statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Estradiol and testosterone treatment increase TCam-2 seminoma cell proliferation rate

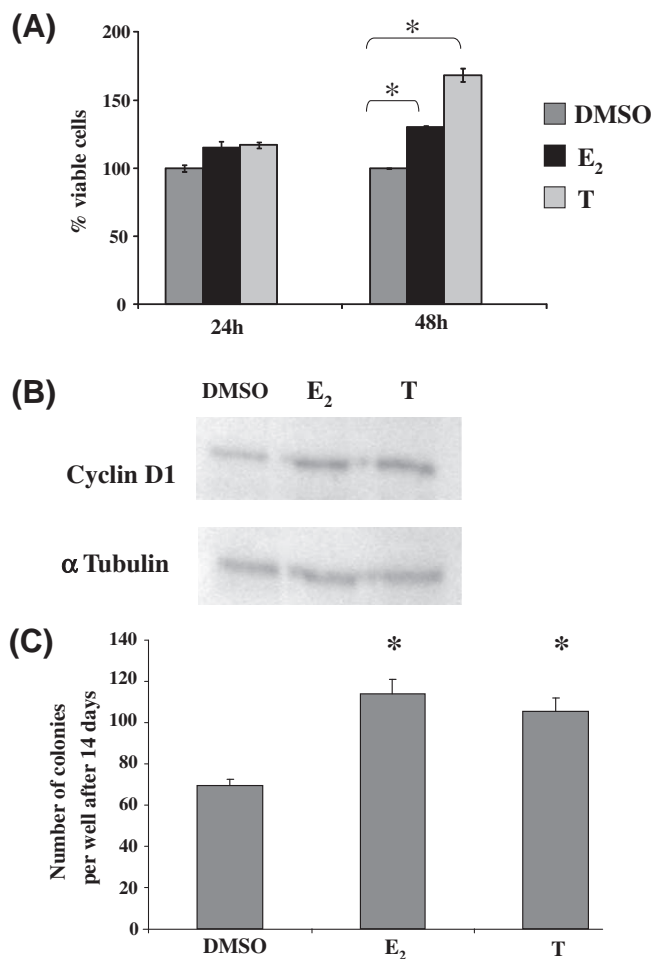
Since both proliferative and antiproliferative effects of estrogens have been demonstrated in various cell lines depending on the dose and the effectors involved, we started this study by measuring TCam-2 cell growth in response to steroids. After 24 h serum deprivation (see Section 2 for details), cells were treated for either 24 h or 48 h with 1 nM estradiol or 1  $\mu$ M testosterone. Those doses were chosen as a result of dose–response experiments (data not shown) and were in the range of those detected in an adult human testis – 600 ng/mL i.e. about 2  $\mu$ M for testosterone and 2.4 ng/mL i.e. about 8 nM for estradiol- (Roth et al., 2010). The relative percentage of viable cells after steroid treatment compared to vehicle-treated ones indicates that both estradiol and testosterone

significantly stimulate cell proliferation after a 48 h treatment (Fig. 1A). This result was confirmed after 24 h treatment with the same hormone doses by using western blotting analysis of cyclin D1 expression level as a marker of cell cycle progression into S-phase (Fig. 1B). Both estradiol and testosterone induced cyclin D1 protein expression.

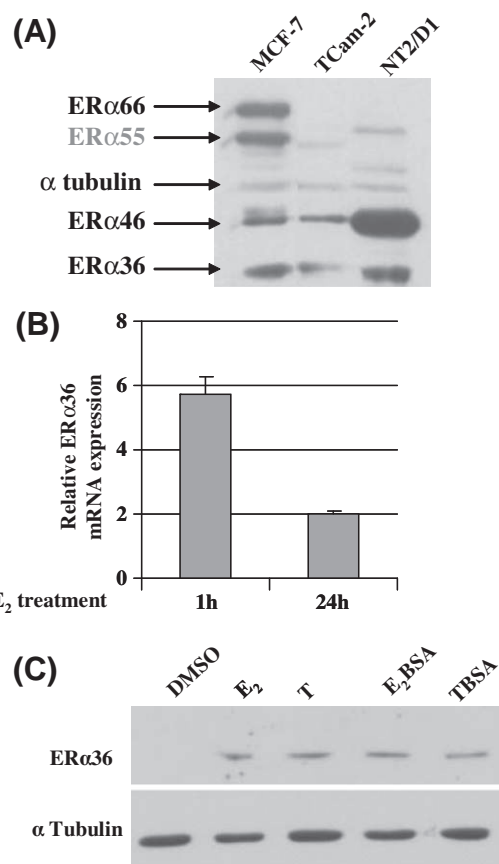
A colony formation assay was also performed by resuspending cells into a steroid complemented medium containing 1.2% methylcellulose. Clones containing more than 100 cells were counted after 14 days (Fig. 1C). Both estradiol and testosterone significantly increased the number of colonies once again demonstrating a proliferative effect.

#### 3.2. Estradiol induces the expression of a 36 kDa ER $\alpha$ isoform

Since ER $\alpha$ 36 expression was recently demonstrated to portray E<sub>2</sub> response in some breast tumors (Kang et al., 2010), we investigated the potential role of ER $\alpha$ 36 in the response to steroid stimulation in two cell lines originating from type II GCT: TCam-2 seminoma cells and NT2/D1 embryonal carcinoma cells. First, we probed both cell lines for ER $\alpha$  isoforms. Fig. 2A indicates that both TCam-2 and NT2/D1 cells namely express the truncated ER $\alpha$ 46 and



**Fig. 1.** Steroids can induce TCam-2 cell proliferation. (A) Proliferation test was performed by TCam-2 cell treatment with 1 nM estradiol (E<sub>2</sub>) or 1  $\mu$ M testosterone (T) in medium containing 1% charcoal-stripped FCS for 24 h or 48 h. Control cells were treated with DMSO (0.01%). Cell number was evaluated using the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay. Control cell growth was considered as 100%. Results are given as mean  $\pm$  s.e.m. of 3 different counts. (B) Western-blot analysis of cyclin D1 expression after 24 h of E<sub>2</sub> or T treatment. Cells were cultured for 24 h in phenol-red free, 0.5% FCS containing medium in the presence of 0.01% DMSO, 1 nM E<sub>2</sub> or 1  $\mu$ M T. Total cell lysates were then subjected to western blot analysis using anti-cyclin D1 or anti-tubulin antibodies. (C) Colony formation assay. For clonogenic growth test, cells were placed into 1.2% methylcellulose 20% FCS and treated with E<sub>2</sub> or T as in (A). Colonies (>100 cells) were counted after 14 days. Results are given as mean  $\pm$  s.e.m. of 3 different counts. \*Significantly different from DMSO treated control ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Estradiol can induce the expression of ER $\alpha$ 36 in a GPER-dependent manner. (A) Western blot analysis of ER $\alpha$  isoform expression in TCam-2 seminoma or NT2/D1 embryonal carcinoma cells compared to MCF-7 breast cancer cells. Cells were cultured for 24 h in 10% FCS containing RPMI medium and harvested in 2x Laemmli buffer. The amount of proteins loaded in each well represents  $1 \times 10^5$  cells. Immunoblotting was performed with an anti-ER $\alpha$ 66 antibody. MCF-7 and NTera2/D1 cell lines were used as a control. (B) Expression levels of ER $\alpha$ 36 after 1 h or 24 h E<sub>2</sub> treatment in TCam-2 cells as measured by realtime-PCR. Control cells received DMSO. The values represent the means  $\pm$  s.e.m. of at least 3 different experiments. (C) Western blot analyses of ER $\alpha$ 36 protein expression level after 24 h treatment with DMSO (0.01%), E<sub>2</sub> (1 nM), E<sub>2</sub>BSA (1 nM), T (1  $\mu$ M), TBSA (1  $\mu$ M) in TCam-2. Expression of alpha-tubulin is given as a control.

ER $\alpha$ 36 isoforms but not the full length ER $\alpha$ 66 estrogen receptor  $\alpha$ . MCF-7 breast carcinoma cells were used as control since those cells are known to express the 3 isoforms cited above (Wang et al., 2005).

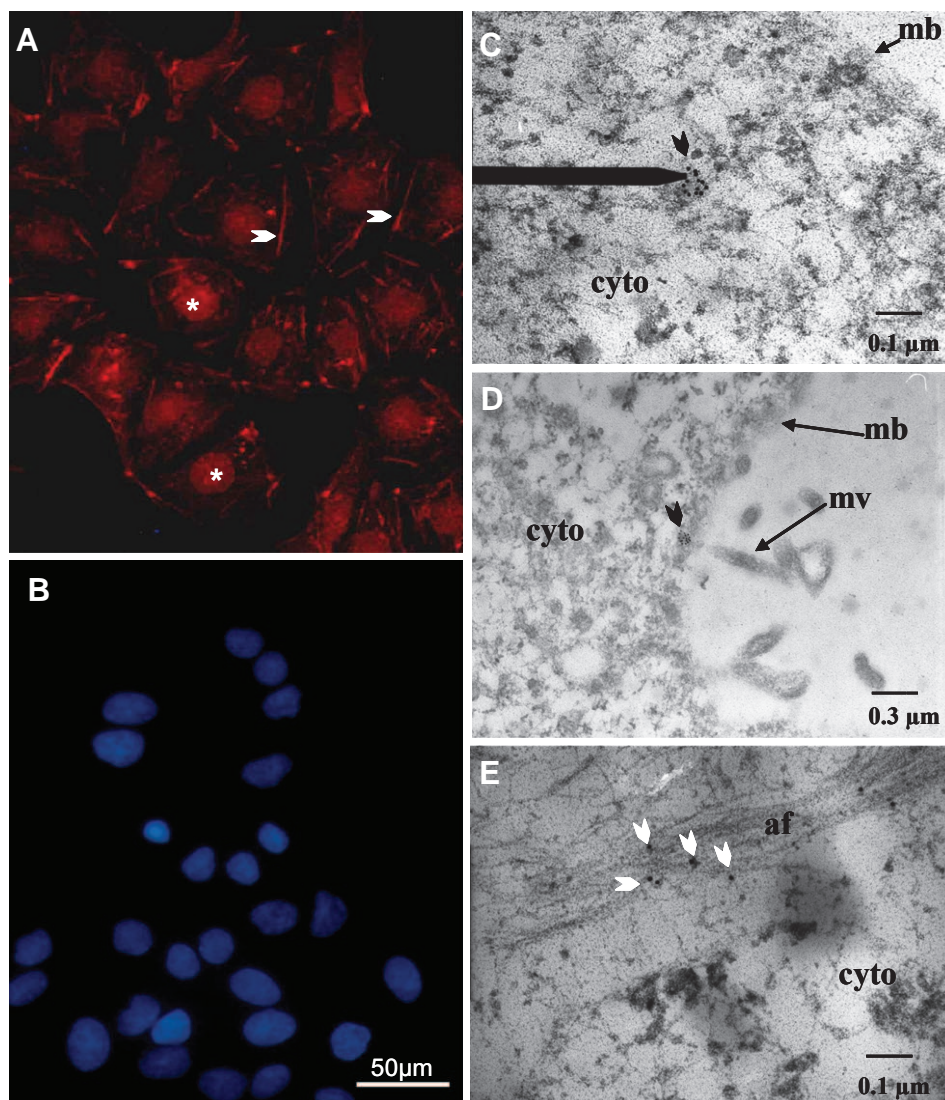
When TCam-2 cells were treated for 1 h or 24 h by 1 nM E<sub>2</sub>, realtime-PCR analysis showed a 6-fold and a 2-fold stimulation of ER $\alpha$ 36 expression, respectively (Fig. 2B). This induction was also detectable by western blotting analysis after a 24 h but not a 1 h estradiol or testosterone treatment (Fig. 2C).

Since (i) ER $\alpha$ 36 has been shown to localize into the plasma membrane in breast cancer cells (Wang et al., 2006) and (ii) TCam-2 cells express the non specific steroid receptor GPER (Franco et al., 2011), we tested the ability of E<sub>2</sub>-coupled BSA and testosterone-coupled BSA, the non permeable form for E<sub>2</sub> and testosterone, to activate ER $\alpha$ 36 expression. Fig. 2C shows that both E<sub>2</sub>BSA and TBSA stimulate ER $\alpha$ 36 protein expression. Similar results were obtained when NT2/D1 cells were treated in the same conditions (data not shown). These results suggest that estradiol

signals mainly through membrane receptor signalling (through GPER or directly through ER $\alpha$ 36 activation) whereas testosterone could also act through intracellular dependent mechanisms (through androgen receptor activation or aromatization into estradiol).

### 3.3. ER $\alpha$ 36 is not located into the plasma membrane in TCam-2 cells

ER $\alpha$ 36 polypeptide chain contains three myristoylation sites which could address the receptor to the plasma membrane in breast cancer cells (Wang et al., 2005, 2006). ICC experiment indicated that all the TCam-2 cells observed were labelled with anti-ER $\alpha$ 36 antibody (Fig. 3A). Staining was observed into the nuclei and in cytoplasmic filamentous structure localized beneath the plasma membrane (Fig. 3A). Therefore, we used transmission electron microscopy to precisely localize ER $\alpha$ 36 in TCam-2 cells (Fig. 3B–D). The results did not differ between vehicle- or E<sub>2</sub>-treated cells (data not shown) since in both cases, ER $\alpha$ 36 gold-labelling



**Fig. 3.** Localization of ER $\alpha$ 36 in TCam-2 cells by immunofluorescence (A and B) and transmission electron microscopy (C–E). (A) ICC was performed with specific anti-ER $\alpha$ 36 antibody provided by Pr Z.Y. Wang. Staining is observed in all cells, into the nucleus (\*) and in filamentous structures below the plasma membrane (arrowhead). (B) ICC performed with secondary antibody alone is shown as a control. Nuclei are stained with Hoechst. (C–E) Gold-labelled ER $\alpha$ 36 is observed (arrowheads) at ecto-endoplasm border (C), at the basis of microvillosity (D) and colocalized with actin cytoskeleton (E). mb: plasma membrane, cyto: cytoplasm, mv: microvillosity, af: actin filament.



was found underneath the membrane (Fig. 3B and C), at the endoplasm/ectoplasm border, and colocalized with actin microfilaments (Fig. 3D). This observation could rule out the possibility that BSA-coupled steroid can trigger an intracellular signal through direct binding or activation of a membrane bound ER $\alpha$ 36.

### 3.4. Testosterone can trigger estrogenic signal after aromatization in TCam-2 cells

After demonstrating the stimulating effect of steroid treatment on TCam-2 cell proliferation, we aimed to decipher the involved signalling pathway. Since testosterone is an aromatizable androgen, we first addressed the question of whether it acts via an estrogen- or androgen-like pathway. First, we detected *Cyp19* gene expression by semi-quantitative RT-PCR in TCam-2 (Fig. 4A). *Tfap2c* gene encodes AP2 $\gamma$  protein, known to be involved in maintenance of the undifferentiated state in carcinoma in situ and embryonic stem cells and to control hormone response in breast cancer cells through multiple estrogen signalling pathways (Bouskine et al., 2010; Weber et al., 2010; Woodfield et al., 2007). Cells were treated for 24 h with E<sub>2</sub>, T, E<sub>2</sub>BSA or TBSA in the presence or absence of an aromatase inhibitor (AI1-10 nM). Expression of *Tfap2c* was measured by realtime-PCR. Indeed, E<sub>2</sub> triggered a 2.5-fold increase in *Tfap2c* expression in TCam-2 cells (Fig. 4B). This stimulation was even higher in the case of co-treatment with AI1 (3.3-fold). Testosterone induced a 2-fold increase of *Tfap2c* mRNA expression, which is not significantly different from that observed in the case of estradiol treatment (Fig. 4B). This up-regulation was partially impaired in the presence of AI1 (a 1.6 fold induction level was observed when comparing testosterone + AI vs. AI treatments). These results suggest that testosterone could act, in part, through an estrogen signalling pathway after aromatization. In contrast, AI1 did block neither TBSA nor E<sub>2</sub>BSA-dependent stimulation of *Tfap2c* expres-

sion (Fig. 4B), suggesting that testosterone could also display an estrogenic-like signalling through a plasma membrane receptor.

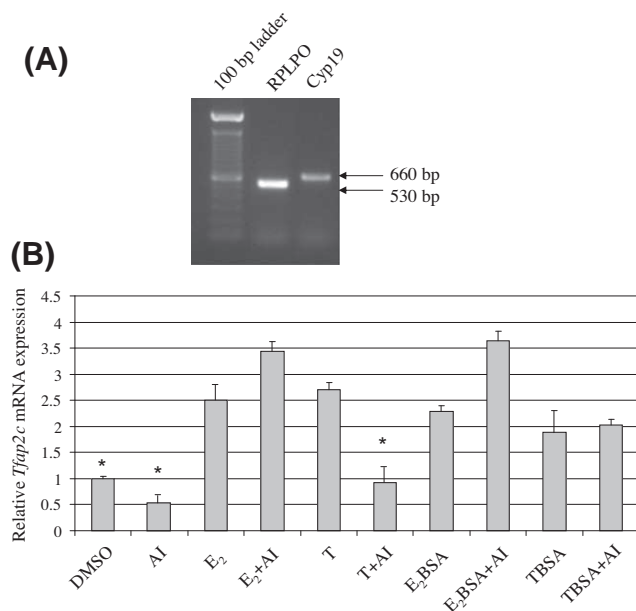
### 3.5. Establishment of a stable TCam-2 cell line knocked down for ER $\alpha$ 36

Thereafter, we focused on estradiol signalling in TCam-2 cells and established a TCam-2 cell line with stable ER $\alpha$ 36 knockdown, as described by Kang et al. (2010). Protein extracts from TCam-2 cells transfected by either the empty vector (Neo-TCam-2 strain) or the ER $\alpha$ 36 shRNA vector (sh36-TCam-2 strain) were subjected to western blot analysis. As shown in Fig. 5A, no expression of ER $\alpha$ 36 was found in the sh36-TCam-2 cell line. To further understand the role of ER $\alpha$ 36 in TCam-2 cell physiology and proliferation, we performed a 5 day long proliferation assay in 2.5% and 10% FCS containing medium with Neo-TCam-2 and sh36-TCam-2 cell lines. We observed that the basal proliferation rate of sh36-TCam-2 strain was significantly reduced compared to Neo-TCam-2, indicating that ER $\alpha$ 36 is necessary for normal cell growth even in rich culture medium (Fig. 5B). We were not able to repeat the same experiment in 1% stripped FCS containing medium because sh36-TCam-2 cells did not survive starvation. This suggests that TCam-2 cells proliferation is hormone-sensitive.

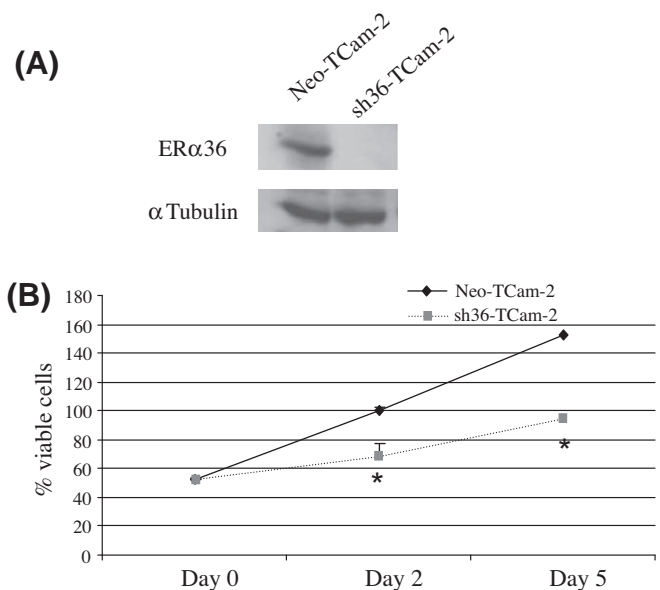
### 3.6. ER $\alpha$ 36 induction depends on GPER activation

Taken together, the above results pointed out the potential role of GPER in estrogen-dependent stimulation of ER $\alpha$ 36 expression. Therefore, we tested the ability of E<sub>2</sub> to induce ER $\alpha$ 36 protein expression in TCam-2 cells transfected by GPER targeted siRNA. In control siRNA transfected cells, a 24 h E<sub>2</sub> treatment stimulated ER $\alpha$ 36 expression whereas this induction was blocked in cells transfected by GPER targeted siRNA (Fig. 6A). This confirmed that GPER is necessary for E<sub>2</sub> to trigger ER $\alpha$ 36 stimulation of expression.

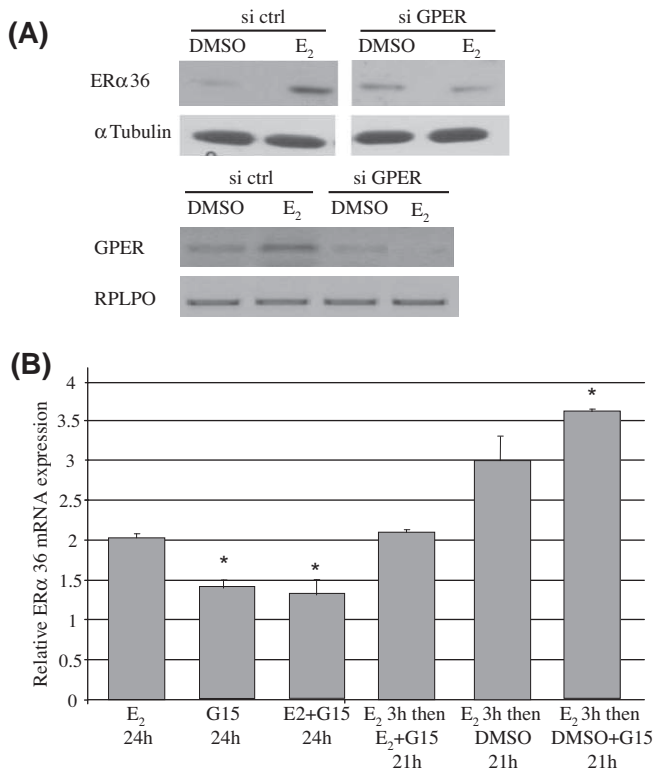
In order to study short to mid-term E<sub>2</sub> effects on ER $\alpha$ 36 expression, we performed a kinetic of GPER blockade after E<sub>2</sub> treatment.



**Fig. 4.** Testosterone acts via an estrogenic pathway, partly through aromatization. (A) Semi-quantitative RT-PCR detection of *Cyp19* transcripts (660 bp) in TCam-2 cells. *RPLPO* amplicon (530 bp) is shown as a control. (B) TCam-2 cells were treated with DMSO (0.01%), E<sub>2</sub> (1 nM), E<sub>2</sub>BSA (1 nM), T (1  $\mu$ M), TBSA (1  $\mu$ M) for 24 h in the presence or absence of 10 nM P450 aromatase inhibitor (AI1). *Tfap2c* mRNA expression was measured by realtime-PCR. Control cells received DMSO. The values represent the means  $\pm$  s.e.m. of 3 different experiments. \*Significantly different from T treated cells ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Establishment and growth phenotype of the sh36-TCam-2 cell line. (A) Western blot analysis of ER $\alpha$ 36 expression in Neo-TCam-2 and sh36-TCam-2 cells. (B) Cell proliferation rate analysis of Neo- and sh36-TCam-2 cells was performed in 2.5% charcoal-stripped FCS containing medium for 2 or 5 days. Cell number was determined by using the CellTiter-Glo<sup>TM</sup> luminescent cell viability assay. Results are given as mean  $\pm$  s.e.m. of 3 different counts. \*Significantly different from Neo-TCam-2 cells ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 6.** Estradiol can induce the expression of ER $\alpha$ 36 in a GPER-dependent manner. (A) Western blot analysis of ER $\alpha$ 36 expression levels, after 24 h E<sub>2</sub> treatment, in TCam-2 cells knocked-down for GPER by small interfering RNA (siGPER) in comparison with a non-targeting control siRNA (siCtrl). Control cells were treated with DMSO (0.01%). Semi-quantitative RT-PCR of GPER mRNA expression is shown as a control for knock-down efficiency. (B) ER $\alpha$ 36 expression analysis as measured by realtime-PCR in TCam-2 cells after 24 h 1 nM E<sub>2</sub> treatment and 1  $\mu$ M G15 treatment added at the same time or 3 h after E<sub>2</sub> addition. Results are given as mean  $\pm$  s.e.m. of 3 different experiments. \*Significantly different from E<sub>2</sub> treated cells ( $P < 0.05$ ).

G15, the specific antagonist of GPER (Dennis et al., 2009) was added either alone, or at the same time as E<sub>2</sub>, or 3 h after E<sub>2</sub> addition. Then, ER $\alpha$ 36 expression was measured by realtime-PCR. As previously described in other cell lines, G15 treatment alone triggered a moderate stimulating effect on ER $\alpha$ 36 expression. Nevertheless, the antagonist did block ER $\alpha$ 36 induction when added concomitantly with E<sub>2</sub> but not when added after 3 h (Fig. 6B). This suggests that GPER is necessary for the early and rapid (3 h) stimulation of ER $\alpha$ 36 but not for the maintenance of its expression at a high level.

### 3.7. Estradiol signals through a GPER-cAMP/PKA pathway

Since many signalling pathways were described downstream GPER in various cell types, we then tested the ability for E<sub>2</sub> to activate the cAMP/PKA, the PI3K or the MAPK pathway in TCam-2 cells. Since ERK phosphorylation seems to be constitutive in TCam-2 cells (De Jong et al. (2008), no more stimulation of either ERK1/2 or AKT phosphorylation was detected following E<sub>2</sub> treatment (data not shown). The activation of cAMP/PKA pathway was studied by measuring CREB phosphorylation by western blotting. E<sub>2</sub> triggered a moderate stimulation CREB phosphorylation level and this effect was impaired in the presence of the PKA inhibitor H89 (10  $\mu$ M) (Fig. 7A).

This result was confirmed by immunofluorescent microscopy analysis using both anti-CREB and anti-phospho-CREB antibodies. CREB protein was observed mainly into the nuclei, but also slightly into the cytoplasm of both DMSO and E<sub>2</sub> treated cells. In contrast,

the phosphorylated and transcriptionally active form was absent in DMSO treated cell nuclei. Following 15 min exposure to 1 nM E<sub>2</sub>, phospho-CREB protein was detected in more than 80% of TCam-2 cells nuclei (Fig. 7). A 30 min incubation in the presence of H89 before E<sub>2</sub> treatment impaired the induction of CREB phosphorylation. Finally, the stimulation of CREB phosphorylation was also observed in sh36-TCam-2 cells, suggesting that ER $\alpha$ 36 could be a downstream target rather than an upstream component of this phosphorylation pathway. Taken together, these results indicate that E<sub>2</sub> signals mainly through GPER-cAMP/PKA-CREB dependent pathway in TCam-2 cells and further suggest that ER $\alpha$ 36 could be the end point target of this rapid signalling pathway.

### 3.8. ER $\alpha$ 36 is necessary for E<sub>2</sub>-mediated EGFR regulation

Since an estrogen-dependent positive feedback loop involving ER $\alpha$ 36 and EGFR was recently described in breast cancer cells (Zhang et al., 2010), we investigated the relationship between both receptors in TCam-2 cells. Western blot analysis shows that E<sub>2</sub> can stimulate EGFR protein expression (Fig. 8A) in TCam-2. Moreover, the basal level of EGFR is greatly diminished in sh36-TCam-2 cells and the stimulation is no more detectable after E<sub>2</sub> treatment (Fig. 8B). This result indicates that ER $\alpha$ 36 could be one of the factors necessary for EGFR expression and for E<sub>2</sub>-mediated EGFR stimulation.

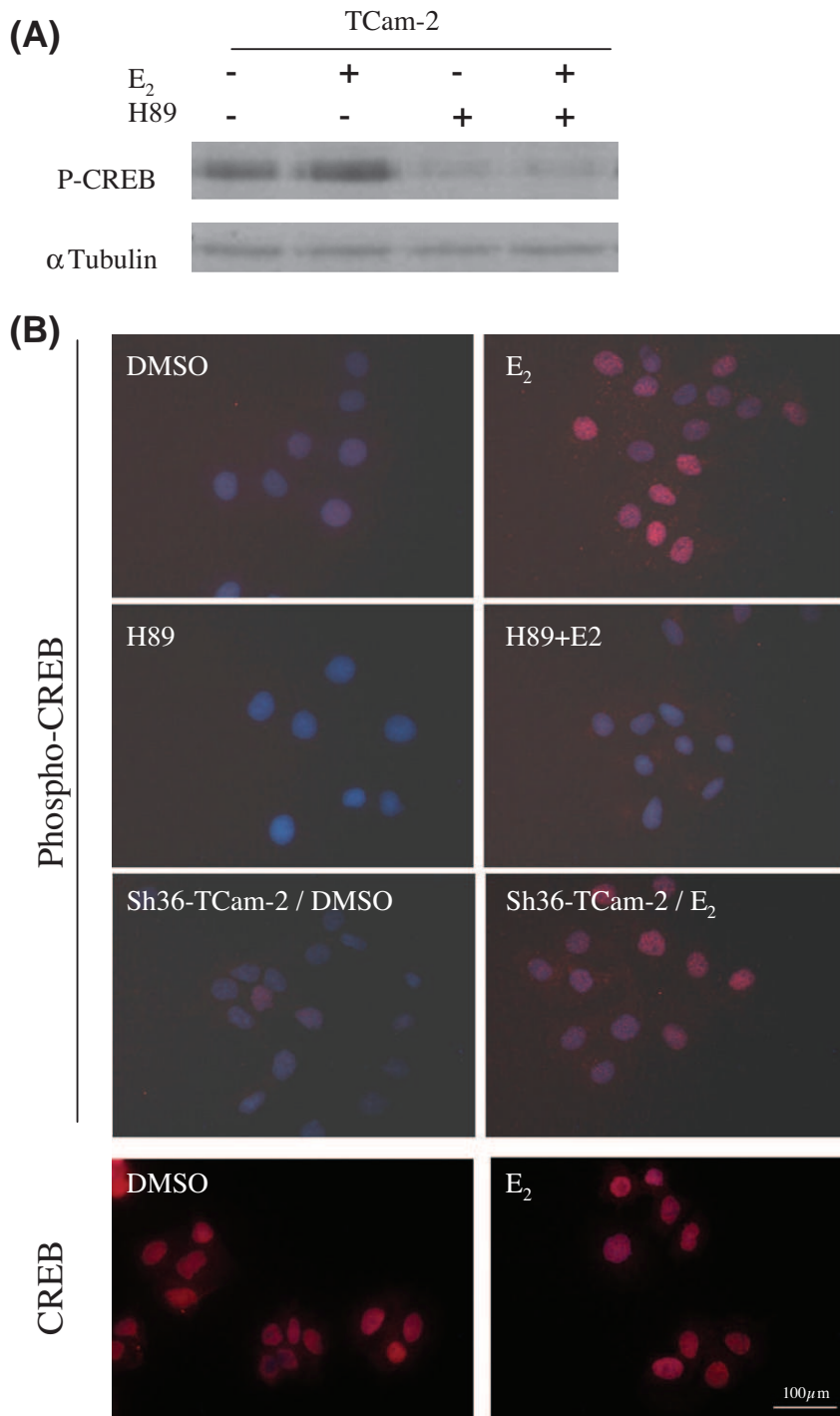
## 4. Discussion

### 4.1. TCam-2 seminoma cells are hormone-sensitive

Several studies demonstrated that CIS, and their invasive type II GCT counterparts are diagnosed with increased frequency in DSD patients, namely those with partial androgen insensitivity, OCT3/4 and TSPY positive germ cells (Pleskacova et al., 2010; Cools et al., 2011). CIS cells derive from arrested gonocytes due to maldifferentiation of the somatic niche during fetal life and genetic adaptation during infancy (Sonne et al., 2008; Kristensen et al., 2008). Dormant CIS remain in the seminiferous tubules and tumors often become detectable in young adults. It has been hypothesized that exposure to androgens during and after puberty stimulates the development of type II GCTs in male DSD patients (Cools et al., 2009; Looijenga et al., 2011). However, the underlying mechanism remains unclear since germ cells do not express the androgen receptor. For the first time, we provide evidences for hormone sensitivity of TCam-2 seminoma cells and demonstrate that proliferation rate is stimulated by either estradiol or testosterone through an estrogen-related ER $\alpha$ 36 dependent pathway. This phenotype as well as underlying signalling mechanisms described in this paper support the hypothesis of an increased risk in type II GCT tumor progression after exposure to endogen estrogen or aromatizable androgen under ER $\alpha$ 36 testicular expression. It remains to be determined if CIS cells and/or normal gonocytes do express ER $\alpha$ 36, and could escape dormancy in response to estrogen related compounds. Additionally, our results would be of interest in order to understand the endocrine disrupting compound (EDC) effects on germ cell pathology.

### 4.2. Estrogens act through a GPER-dependent signalling pathway

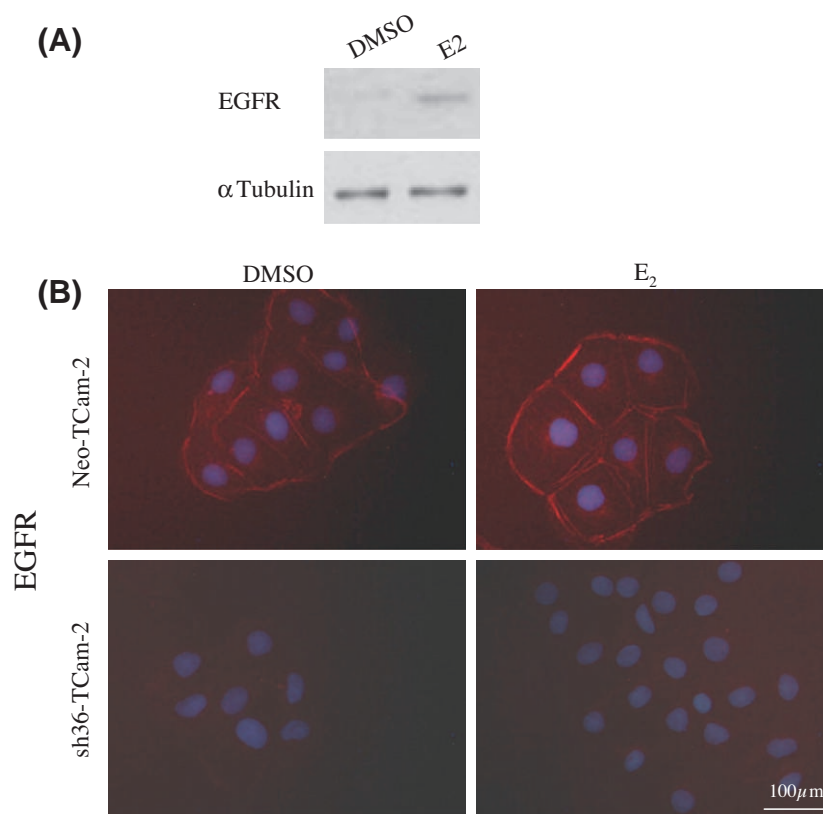
The mechanisms underlying EDC exposure-response trends are still not known. In our study, we evaluated the impact of estrogen treatment and deciphered the signalling pathways involved in the absence of ER $\alpha$ . Thus, we showed that estradiol and BSA-coupled estradiol act via a GPER-cAMP/PKA-CREB dependent pathway. These results extend previous data obtained by Fenichel's group which first demonstrated an opposite effect of E<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>BSA on



**Fig. 7.** E<sub>2</sub> can act through a cAMP/PKA dependent pathway. (A) Phospho-CREB (P-CREB) protein expression analysis in TCam-2 cells. Cells were treated with 1 nM E<sub>2</sub> for 15 min in the presence or absence of 10 μM H89 PKA inhibitor. Expression of alpha-tubulin is given as a control. (B) TCam-2 cell ICC was performed using anti-P-CREB antibody. TCam-2 as well as sh36-TCam-2 cells treated for 15 min with E<sub>2</sub> show an intense staining of CREB phosphorylation into the nucleus. This staining is impaired by pre-treatment with 10 μM H89. TCam-2 stained with an anti-CREB antibody are shown as a control for the presence of CREB in DMSO or E<sub>2</sub> treated cells. The scale bar represents 100 μm.

JKT-1 cell proliferation (Roger et al., 2005; Bouskine et al., 2008; Bouskine et al., 2009). Recently, they addressed the role of bisphenol A in promoting cell growth and showed the involvement of GPER and PKA/PKG pathway (Bouskine et al., 2009; Chevalier et al., 2011a). Therefore, we can hypothesize that JKT-1 and TCam-2 cells, both isolated from type II GCTs and lacking ERα66, do respond to estrogenic signal with similar molecular compo-

nents. Different expression levels of GPER and ERα or the presence/absence of ER cofactors in both cell lines could explain the discrepancy between E<sub>2</sub> mediated proliferation in TCam-2 and E<sub>2</sub> growth inhibition in JKT-1. In fact, Eckert et al. (2008) and De Jong et al. (2008) previously demonstrated that JKT-1 lacks expression for most of the genes detectable in type II GCTs, thus providing evidences for great differences between TCam-2 and JKT-1.



**Fig. 8.** E<sub>2</sub> stimulates EGFR expression in an ER $\alpha$ 36-dependent way. (A) Western blot analysis of EGFR expression was performed in TCam-2 cells treated by E<sub>2</sub> (1 nM) for 24 h. (B) ICC analysis of EGFR expression and localization in Neo-TCam-2 and sh36-TCam-2 cells treated by E<sub>2</sub> (1 nM) for 15 min. In Neo-TCam-2 cells, EGFR is localized at the cell surface. In sh36-TCam-2 cells, EGFR expression was detected neither in DMSO nor in E<sub>2</sub> treated cells. The scale bar represents 100  $\mu$ m.

GPER was also detected at a high level in intratubular germ cell tumors, seminoma and embryonal carcinoma (Franco et al., 2011; Rago et al., 2011). Since we demonstrated that GPER is necessary to induce ER $\alpha$ 36 expression in response to estradiol, leading to an elevated proliferation rate, GPER seems to be a promising therapeutic target in type II GCTs treatment as recently proposed by Chevalier et al. (2011b).

#### 4.3. ER $\alpha$ 36 expression portrays seminoma cell E<sub>2</sub> exposure

Based on the work of Wang and colleagues who analyzed the upstream signals leading to ER $\alpha$ 36 activation in several breast cancer cell lines (Zhang et al., 2010; Wang et al., 2010), we showed that the GPER-dependent E<sub>2</sub> signalling ends to ER $\alpha$ 36 expression induction. Moreover, the growth phenotype of our stably transfected sh36-TCam-2 cell line suggests that a threshold of ER $\alpha$ 36 protein should be reached to respond to estradiol otherwise cell activity is compromised. Therefore, a high level of ER $\alpha$ 36 expression seems to be sufficient to portray estradiol exposure in TCam-2 and might be tested as a marker for EDC exposure.

More recently, Zhang et al. (2010) further demonstrated that ER $\alpha$ 36 mediates nongenomic estrogen signalling through the EGFR/Src/ERK signalling pathway in ER-negative breast cancer cells suggesting that these tumors can retain an estrogen mitogenic signalling in the absence of estrogens. This process is also suspected to be involved during acquired tamoxifen resistance of hormone-treated breast tumors (Lin et al., 2010). Indeed, we show that a minimal ER $\alpha$ 36 expression level is necessary for both EGFR membrane localization and E<sub>2</sub>-mediated stimulation of EGFR expression in TCam-2 cells. Similar data were obtained in 22Rv1 prostate cancer cell line which expresses unreported AR-truncated

forms in the course of hormone resistance acquisition (Marcias et al., 2010). They also demonstrate that the expression of these AR mutants is an essential molecular event leading to androgen independency in prostate tumors that escape androgen deprivation therapy. Therefore, high ER $\alpha$ 36 protein level may also reveal hormone independency in type II GCTs. One can even hypothesize that a transient exposure to EDCs during early life or puberty could trigger a positive feedback loop of ER $\alpha$ 36/EGFR activation which could, in turn, lead to estrogen-independent long term promotion of seminoma cell proliferation and tumor progression in adulthood.

#### 4.4. Is ER $\alpha$ 36 a modulator of cytoskeleton remodeling in seminoma cells?

In most animal cells, dynamic changes of the cytoskeleton are related to the ability of the cell to respond to external signals from the surrounding environment and result in the recruitment of specific intracellular signalling cascades. In these complex processes, a critical role is played by the dynamic remodelling of the actin cytoskeleton. The role of sex steroids in the regulation of cell movement and actin-dependent signalling has been demonstrated in numerous physiological processes and diseases, namely cancer cell migration (Giretti et al., 2008; Flamini et al., 2011). Indeed, three papers from Simoncini's laboratory (Sanchez et al., 2010a,b) recently reported that E<sub>2</sub> can trigger cytoskeleton remodelling and cell motility in several cell lines including breast cancer cells through ER $\alpha$ -dependent recruitment and phosphorylation of Focal Adhesion Kinases (FAK) and N-WASP. This process seems to be necessary for cancer cell migration and invasion. In our study, ER $\alpha$ 36 was found to colocalize with actin microfilaments, suggest-

ing a potential regulatory role for the truncated form of ER $\alpha$  in actin cytoskeleton remodelling and cell migration. Since ER $\alpha$ 36 expression is enhanced by an E<sub>2</sub> treatment, one can hypothesize that a protein critical threshold must be reached to trigger cell motility. However, the precise domain of ER $\alpha$ 36 protein that could be involved in actin regulation remains to be determined. The expression of ER $\alpha$ 36 was not tested in the cell lines used by Sanchez and Flamini so that the involvement of ER $\alpha$ 36 in the processes they describe remains to be elucidated.

## 5. Conclusion

Taken together, our results indicate a positive role of E<sub>2</sub> on TCam-2 seminoma cell line proliferation. The described pathway involves a GPER-dependent signalling that triggers ER $\alpha$ 36 upregulation. Our study also suggests a potential role of the ER $\alpha$ 36 isoform in actin cytoskeleton remodeling. Case control study would be interesting in order to validate ER $\alpha$ 36 expression as a marker of endocrine disruptor exposure and/or as a prognostic marker in type II GCTs.

## Disclosure statement

The authors have nothing to disclose.

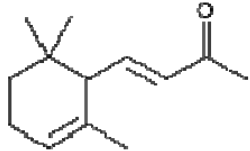
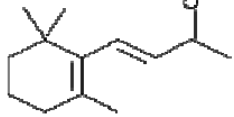
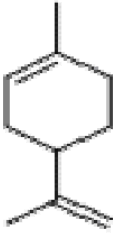
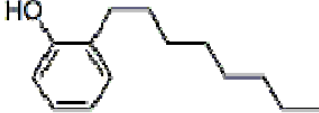
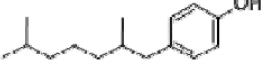
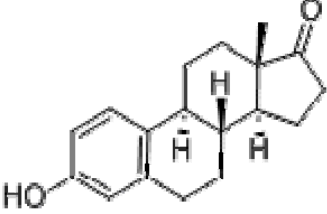
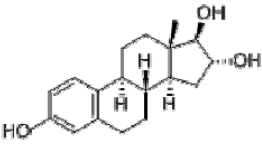
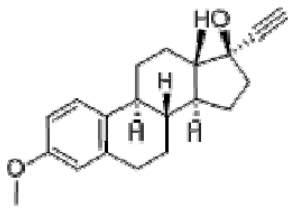
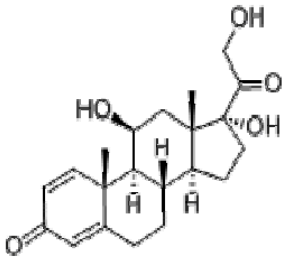
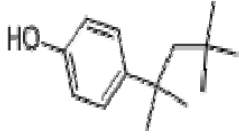

## Acknowledgements

This work was supported by grants of ANSES (APR EST 08-09), the “Université Henri Poincaré (BQR)”, of the “Conseil Régional de Lorraine”. AW and HA are the recipients of a Syrian Government fellowship. We warmly thank Professor Z.Y. Wang for shRNA expressing vectors and anti-ER $\alpha$ 36 antibody, Professor B. Foliguet for great help in electron microscopy and J. Flayac for technical support.

## References

- Almstrup, K., Ottesen, A.M., Sonne, S.B., Hoei-Hansen, C.E., Leffers, H., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N.E., 2005. Genomic and gene expression signature of the pre-invasive testicular carcinoma in situ. *Cell. Tissue. Res.* 322, 159–165.
- Bouskine, A., Nebout, M., Brücker-Davis, F., Benahmed, M., Fenichel, P., 2009. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ. Health. Perspect.* 117, 1053–1058.
- Bouskine, A., Nebout, M., Mograbi, B., Brücker-Davis, F., Roger, C., Fenichel, P., 2008. Estrogens promote human testicular germ cell cancer through a membrane-mediated activation of extracellular regulated kinase and protein kinase A. *Endocrinology* 149, 565–573.
- Bouskine, A., Vega, A., Nebout, M., Benahmed, M., Fenichel, P., 2010. Expression of embryonic stem cell markers in cultured JKT-1, a cell line derived from a human seminoma. *Int. J. Androl.* 33, 54–63.
- Carreau, S., Hess, R.A., 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 365, 1517–1535.
- Carreau, S., Wolczynski, S., Galeraud-Denis, I., 2010. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 365, 1571–1579.
- Chevalier, N., Bouskine, A., Fenichel, P., 2011. Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/GPR30. *Int. J. Cancer.* doi: 10.1002/ijc.25972.
- Chevalier, N., Bouskine, A., Fenichel, P., 2011b. Role of GPER/GPR30 in tumoral testicular germ cells proliferation. *Cancer Biol. Ther.* 12 (1), 2–3.
- Cools, M., Looijenga, L.H., Wolfenbittel, K.P., Drop, S.L., 2009. Disorders of sex development: update on the genetic background, terminology and risk for the development of germ cell tumors. *World J. Pediatr.* 5 (2), 93–102.
- Cools, M., Wolfenbittel, K.P., Drop, S.L., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H., 2011. Gonadal development and tumor formation at the crossroads of male and female sex determination. *Sex Dev.* 5 (4), 167–180.
- de Jong, J., Stoop, H., Gillis, A.J.M., Hersmus, R., van Gurp, R.J.H.L.M., van de Geijn, G.-J.M., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Schneider, D.T., Sherlock, J.K., Baeten, J., Kitazawa, S., van Zoelen, E.J., van Roozendaal, K., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H.J., 2008. Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 185–196.
- Delbès, G., Levacher, C., Habert, R., 2006. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 132, 527–538.
- Dennis, M.K., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W.K., Alcon, S.N., Nayak, T.K., Bologa, C.G., Leitao, A., Brailoiu, E., Deliu, E., Dun, N.J., Sklar, L.A., Hathaway, H.J., Arterburn, J.B., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., 2009. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat. Chem. Biol.* 5, 421–427.
- Eckert, D., Nettersheim, D., Heukamp, L.C., Kitazawa, S., Biermann, K., Schorle, H., 2008. TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture. *Cell. Tissue. Res.* 331, 529–538.
- Filardo, E.J., 2002. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 80, 231–238.
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., Frackelton, A.R., 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* 14, 1649–1660.
- Flamini, M.I., Sanchez, A.M., Genazzani, A.R., Simoncini, T., 2011. Estrogen regulates endometrial cell cytoskeletal remodeling and motility via focal adhesion kinase. *Fertil. Steril.* 95, 722–726.
- Franco, R., Boscia, F., Gigantino, V., Marra, L., Esposito, F., Ferrara, D., Pariante, P., Botti, G., Caraglia, M., Minucci, S., Chieffi, P., 2011. GPR30 is over-expressed in post pubertal testicular germ cell tumors. *Cancer Biol. Ther.* 15, 11(6).
- Giretti, M.S., Fu, X., De Rosa, G., Sarotto, I., Baldacci, C., Garibaldi, S., Mannella, P., Biglia, N., Sismondi, P., Genazzani, A.R., Simoncini, T., 2008. Extra-nuclear signalling of estrogen receptor to breast cancer cytoskeletal remodeling, migration and invasion. *PLoS ONE* 3, e2238. doi:10.1371/journal.pone.0002238.
- Jones, M.E.E., Boon, W.C., Proietto, J., Simpson, E.R., 2006. Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. *Trends. Endocrinol. Metab.* 17, 55–64.
- Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., Wang, Z., 2010. Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol. Endocrinol.* 24, 709–721.
- Kristensen, D.M., Sonne, S.B., Ottesen, A.M., Perrett, R.M., Nielsen, J.E., Almstrup, K., Skakkebaek, N.E., Leffers, H., Rajpert-De Meyts, E., 2008. Testicular dysgenesis syndrome and the origin of carcinoma in situ testis. *Mol. Cell Endocrinol.* 288 (1–2), 111–118.
- Lee, L.M.J., Cao, J., Deng, H., Chen, P., Gatalica, Z., Wang, Z., 2008. ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. *Anticancer. Res.* 28, 479–483.
- Lin, S.L., Yan, L., Liang, X.W., Wang, Z.B., Wang, Z.Y., Qiao, J., Schatten, H., Sun, Q.Y., 2009. A novel variant of ER-alpha, ER-alpha36 mediates testosterone-stimulated ERK and Akt activation in endometrial cancer Hec1A cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 102.
- Lin, S.L., Yan, L.Y., Zhang, X.T., Yuan, J., Li, M., Qiao, J., Wang, Z.Y., Sun, Q.Y., 2010. ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS One*, 2010 February 2, 5(2):e9013. doi:10.1371/journal.pone.0009013.
- Looijenga, L.H., Gillis, A.J., Stoop, H., Biermann, K., Oosterhuis, J.W., 2011. Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumor pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. *Int. J. Androl.* 34(4 Pt. 2), e234–e251.
- Maggiolini, M., Picard, D., 2010. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J. Endocrinol.* 204, 105–114.
- Main, K.M., Skakkebaek, N.E., Virtanen, H.E., Toppari, J., 2010. Genital anomalies in boys and the environment. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 279–289.
- Marcias, G., Erdmann, E., Lapouge, G., Siebert, C., Barthélémy, P., Duclos, B., Bergerat, J., Céraline, J., Kurtz, J., 2010. Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCA) cell. *Line. Hum. Mutat.* 31, 74–80.
- Martin, O.V., Shialis, T., Lester, J.N., Scrimshaw, M.D., Boobis, A.R., Voulvoulis, N., 2008. Testicular dysgenesis syndrome and the estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis. *Environ. Health. Perspect.* 116, 149–157.
- McIntyre, A., Gilbert, D., Goddard, N., Looijenga, L.H., Shipley, J., 2008. Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Genes. Chromosomes. Cancer* 47, 547–557.
- McIntyre, A., Summersgill, B., Lu, Y.J., Momicaglia, E., Kitazawa, S., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H., Shipley, J., 2007. Genomic copy number and expression patterns in testicular germ cell tumors. *Br. J. Cancer* 97, 1707–1712.
- Mizuno, Y., Gotoh, A., Kamidono, S., Kitazawa, S., 1993. Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2). *Nippon. Hinyokika. Gakkai. Zasshi.* 84, 1211–1218.
- Murata, Y., Robertson, K.M., Jones, M.E.E., Simpson, E.R., 2002. Effect of estrogen deficiency in the male: the ArKO mouse model. *Mol. Cell Endocrinol.* 193, 7–12.
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R., 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 22, 289–318.
- 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.
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K., Suomalainen, L., Parvinen, M., Dunkel, L., 2000. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2057–2067.
- Pleskacova, J., Hersmus, R., Oosterhuis, J.W., Setyawati, B.A., Faradz, S.M., Cools, M., Wolfenbittel, K.P., Lebl, J., Drop, S.L., Looijenga, L.H., 2010. Tumor risk in disorders of sex development. *Sex Dev.* 4–5, 259–269.
- Rago, V., Romeo, F., Giordano, F., Maggiolini, M., Carpino, A., 2011. Identification of the estrogen receptor GPER in neoplastic and non-neoplastic human testes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9(1), 135.

- Rajpert-de Meyts, E., Høi-Hansen, C.E., 2007. From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann. NY Acad. Sci.* 1120, 168–180.
- Roger, C., Lambard, S., Bouskine, A., Mograbi, B., Chevallier, D., Nebout, M., Pointis, G., Carreau, S., Fenichel, P., 2005. Estrogen-induced growth inhibition of human seminoma cells expressing estrogen receptor beta and aromatase. *J. Mol. Endocrinol.* 35, 191–199.
- Roth, M.Y., Lin, K., Amory, J.K., Matsumoto, A.M., Anawalt, B.D., Snyder, C.N., Kalhorn, T.F., Bremner, W.J., Page, S.T., 2010. Serum LH correlates highly with intratesticular steroid levels in normal men. *J. Androl.* 31, 138–145.
- Sanchez, A.M., Flamini, M.I., Baldacci, C., Goglia, L., Genazzani, A.R., Simoncini, T., 2010a. Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP. *Mol. Endocrinol.* 24, 2114–2125.
- Sanchez, A.M., Flamini, M.I., Zullino, S., Gopal, S., Genazzani, A.R., Simoncini, T., 2010. Estrogen receptor-alpha promotes endothelial cell motility through focal adhesion kinase. *Mol. Hum. Reprod.* doi: 10.1093/molehr/gaq097.
- Simoncini, T., Fornari, L., Mannella, P., Varone, G., Caruso, A., Liao, J.K., Genazzani, A.R., 2002. Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signalling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase. *Steroids* 67, 935–939.
- Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Caruso, A., Varone, G., Genazzani, A.R., 2004. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69, 537–542.
- Skakkebaek, N.E., 1972. Possible carcinoma in situ of the testis. *Lancet* 2, 516–517.
- Sonne, S.B., Kristensen, D.M., Novotny, G.W., Olesen, I.A., Nielsen, J.E., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Leffers, H., 2008. Testicular dysgenesis syndrome and the origin of carcinoma in situ testis. *Int. J. Androl.* 31 (2), 275–287.
- Sonne, S.B., Almstrup, K., Dalgaard, M., Juncker, A.S., Edsgard, D., Ruban, L., Harrison, N.J., Schwager, C., Abdollahi, A., Huber, P.E., Brunak, S., Gjerdrum, L.M., Moore, H.D., Andrews, P.W., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Leffers, H., 2009. Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer. Res.* 69, 5241–5250.
- 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.
- 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.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., Deuel, T.F., 2005. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1023–1027.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., Deuel, T.F., 2006. A variant of estrogen receptor-{alpha}, hER-{alpha}36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 9063–9068.
- Wang, L., Zhang, X., Wang, Z., 2010. The Wilms' tumor suppressor WT1 regulates expression of members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and estrogen receptor in acquired tamoxifen resistance. *Anticancer. Res.* 30, 3637–3642.
- Weber, S., Eckert, D., Nettersheim, D., Gillis, A.J.M., Schäfer, S., Kuckenberger, P., Ehlermann, J., Werling, U., Biermann, K., Looijenga, L.H.J., Schorle, H., 2010. Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance. *Biol. Reprod.* 82, 214–223.
- Woodfield, G.W., Horan, A.D., Chen, Y., Weigel, R.J., 2007. TFAP2C controls hormone response in breast cancer cells through multiple pathways of estrogen signalling. *Cancer Res.* 67, 8439–8443.
- Zhang, X.T., Kang, L.G., Ding, L., Vranic, S., Gatalica, Z., Wang, Z., 2010. A positive feedback loop of ER- $\alpha$ 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene.* doi:10.1038/onc.2010.458.

Mélange				
M1	<p><math>\alpha</math>-Ionone</p> 	<p><math>\beta</math>-Ionone</p> 	<p>Limonène</p> 	
M2	<p>Octylphénol</p> 	<p>Nonylphénol</p> 		
M3	<p>Estrone</p> 	<p>Estriol</p> 	<p>Mestranol</p> 	<p>Prednisolone</p> 
M4	<p>4-tert-octylphénol</p> 	<p>4-nonylphénol</p> 		

**Tableau 8 : Formules chimiques des composés utilisés dans chaque mélange de l'étude.**

## **Résultats Partie II**

### **Effets des micropolluants sur les cellules de cancer testiculaire**

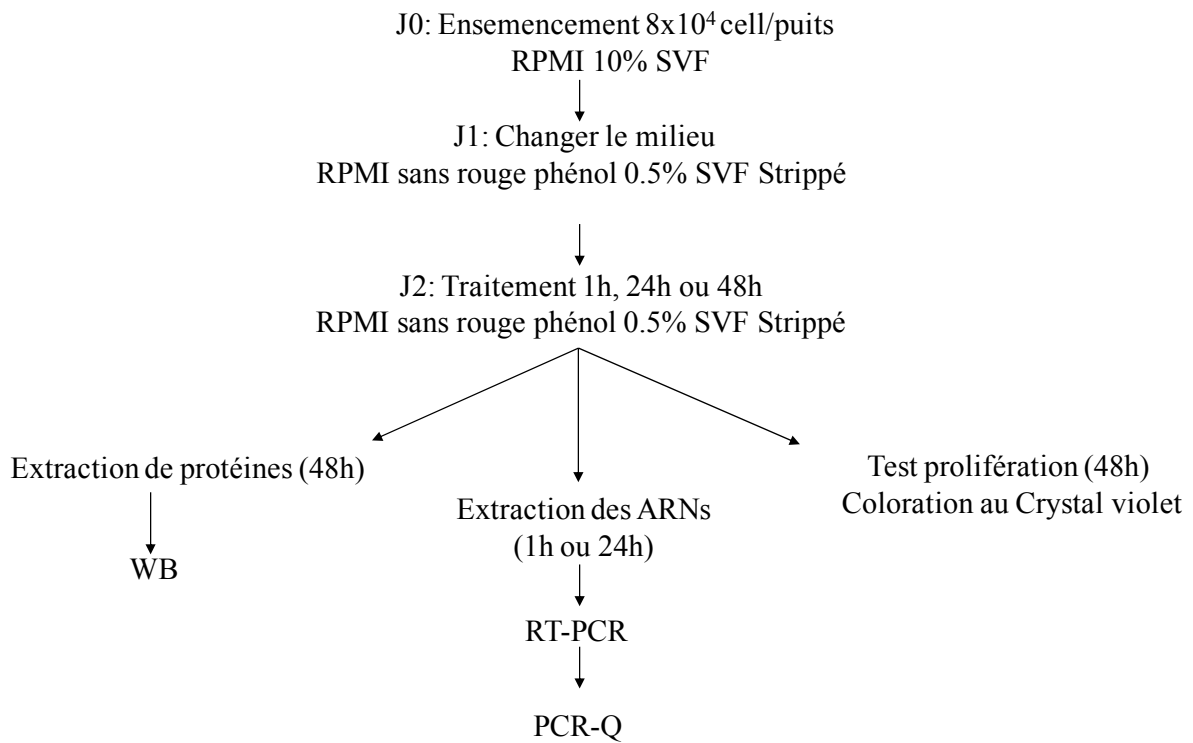
Comme il a été décrit dans l'introduction (paragraphe IV), les perturbateurs endocriniens, qui ont des effets œstrogéno-mimétiques, sont susceptibles de stimuler la croissance des tumeurs testiculaires de la même façon que le 17 $\beta$ -œstradiol. Nous nous sommes donc intéressés à étudier les effets de ces produits sur la prolifération des cellules de cancer testiculaire TCam-2 *in vitro* et NT2/D1 *in vivo*, et l'expression des gènes cibles impliqués dans ces effets et aux voies de signalisation impliquées. Sachant que ces micropolluants coexistent dans l'environnement et que l'homme est exposé en même temps à différents mélanges de perturbateurs endocriniens, nous nous sommes intéressés à étudier les effets de mélanges de ces produits.

#### **1. Caractérisation des micropolluants**

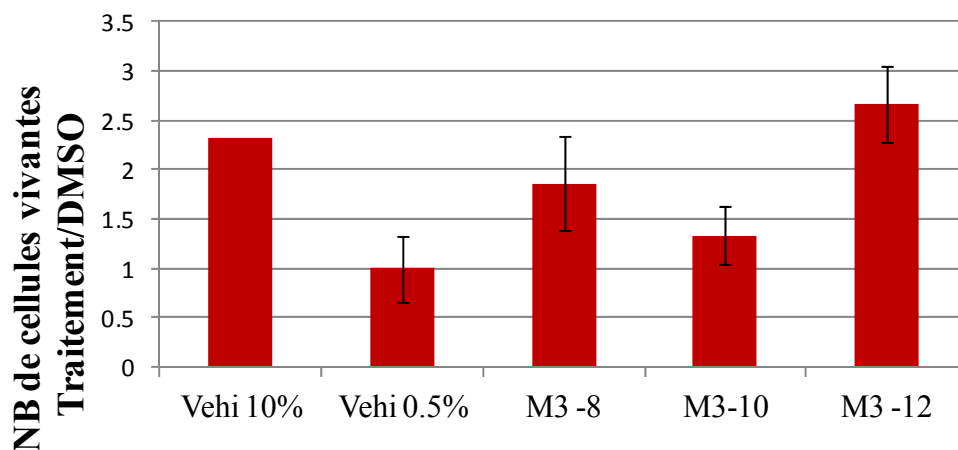
Pour choisir les produits à étudier, nous avons pris en compte différents points. Nous avons choisi des composés qui ont des effets œstrogéno-mimétiques avérés ou suspectés, auxquels des populations sensibles comme les femmes enceintes et les jeunes enfants sont exposés de façon chronique, qui ont des effets perturbateurs sur l'appareil reproducteur au cours du développement fœtal et qui ont un effet prolifératif sur les cellules cancéreuses, qui ont une affinité pour le récepteur GPER. En effet, GPER est fortement exprimé dans les cellules TCam-2 et NT2/D1 (Franco et al., 2011).

Les mélanges étudiés sont appelés (M1, M2, M3, M4) : M1 est composé de  $\alpha$ -Ionone,  $\beta$ -Ionone et Limonène, M2 regroupe des composés œstrogéno-mimétiques utilisés dans la fabrication des détergents qui sont OP et 4-NP, M3 est un mélange équimolaire d'Estriol, Estrone, Mestranol et Prednisolone, et M4 est constitué de 4-NP et 4-tert-OP (Tableau 8).





**Figure 58 : Schéma montrant les différents protocoles utilisés dans l'expérience d'exposition aux mélanges.**



**Figure 59 : Effet de mélange M3 sur la prolifération des cellules TCam-2.** Les cellules sont sevrées pendant 24 h dans un milieu RPMI contenant 0,5 % de SVF strippé (le RPMI 10% SVF a été utilisé comme témoin positif), puis les cellules ont été traitées pendant 48h par M3 à ( $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  et  $10^{-12}$  M). Ensuite, les cellules sont comptées sous microscope. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  s.e.m de 3 expériences indépendantes. (Test de Student).

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture et ensuite exposées à ces mélanges ou leurs composés isolés dans différentes conditions : concentrations, temps de traitement... (Figure 58).

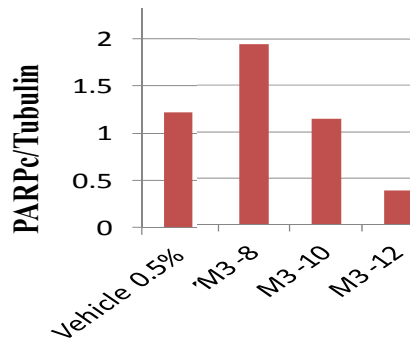
J'ai utilisé plusieurs techniques afin de mesurer l'effet prolifératif de ces produits. L'expression des gènes cibles de ces mélanges a été étudiée. Des analyses immunohistochimiques ont également été réalisées.

### **1.1. Mélange M3**

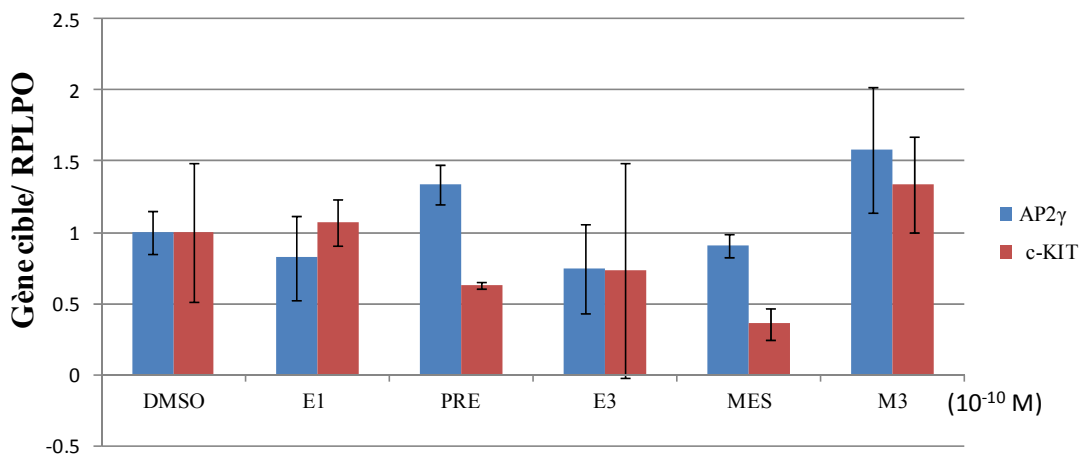
Ce mélange est composé de quatre molécules œstrogéno-mimétiques avérées, estriol+estrone+mestranol+prednisolone (E1+E3+mes+pre, respectivement), en proportions équivalentes (1 :1 :1 :1).

#### **1.1.1. Test de prolifération**

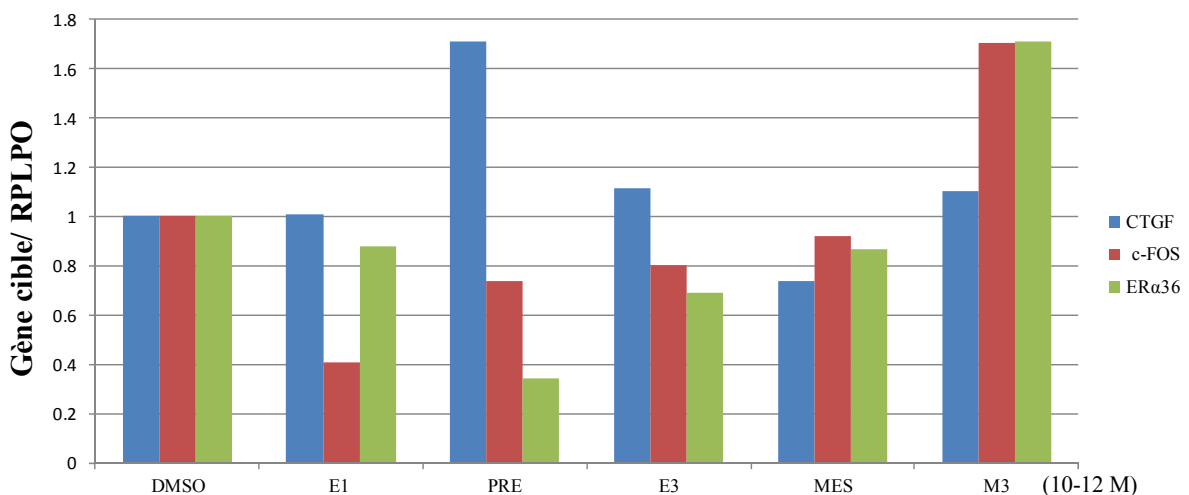
Nous avons testé l'effet de ce mélange sur la prolifération des cellules de cancer testiculaire TCam-2. Les résultats indiquent que ce mélange utilisé à 1pM induit la prolifération de ces cellules après 48 heures de traitement (Figure 59).



**Figure 60 : Effet du mélange M3 sur le clivage de PARP.** Analyse par western blot réalisée après 48 h de traitement des cellules TCam-2 par le mélange M3 ( $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  et  $10^{-12}$  M). Les cellules témoins n'ont été exposées qu'au solvant (vehicle 0.5%). La quantité de protéine PARPc a été mesurée par rapport à la tubuline.



**Figure 61 : Effet du mélange M3 et ses composants sur l'expression des gènes qui sont des marqueurs de la prolifération cellulaire (c-Kit) et de la signalisation des oestrogènes (AP2 $\gamma$ ).** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules TCam-2 traitées par DMSO, le M3 et ses composés isolés à ( $10^{-10}$  M) pendant 24h. Le rapport gène d'intérêt/RPLPO du témoin est ramené à 1. Les valeurs correspondent à la moyenne +/- s.e.m de 3 expériences indépendantes. (Test de Student).



**Figure 62 : Effet de M3 ( $10^{-12}$  M) sur l'expression des gènes précoces cibles pour GPER (CTGF et c-fos) et du gène codant le récepteur ER $\alpha$ 36.** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules TCam-2 traitées par le DMSO, le M3 et ses quatre composés isolés à ( $10^{-12}$  M) pendant 1h. Le rapport gène d'intérêt/RPLPO du témoin est ramené à 1. Les valeurs correspondent à une expérience.

### **1.1.2. Analyse biochimique**

Nous avons réalisé une analyse immunohistochimique pour mesurer le clivage de PARP1 afin de déterminer l'éventuel effet apoptotique du M3 sur les cellules TCam-2. Les résultats obtenus, par rapport à la tubuline, ont montré qu'une exposition de 48h à 1pM de M3 conduit à une diminution du clivage de PARP (Figure 60). Ces résultats suggèrent qu'à cette dose M3 n'a pas un effet délétère sur les cellules séminomateuses TCam-2.

### **1.1.3. Expression génique**

L'expression des gènes comme le marqueur de la prolifération (c-Kit) et le gène cible des œstrogènes AP2 $\gamma$  sont testés : le M3 induit l'expression de ces gènes tardifs après 24h de traitement des cellules TCam-2, plus que ses composés isolés et testés à même concentration efficace ( $10^{-10}$  M) et dans les mêmes conditions (Figure 61), ce qui suggère que les effets de ces composés sont synergiques dans leur mélange.

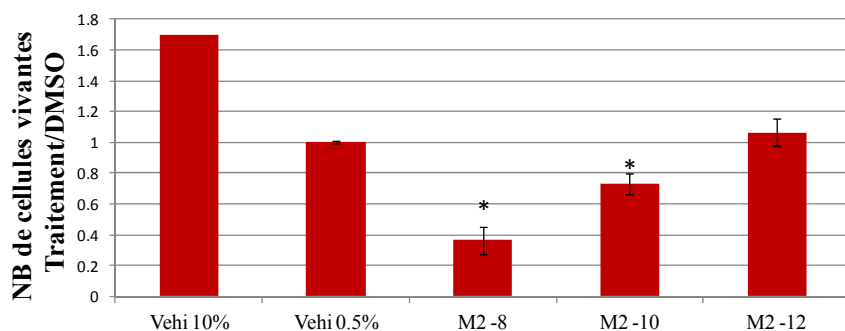
L'expression des gènes précoces (CTGF et c-Fos), induisant après 1h de traitement, ainsi le gène codant le récepteur ER $\alpha$ 36 a été étudié aussi sous l'effet du M3 et de ses composants. Les résultats de l'analyse par PCR en temps réel ont montré une absence d'effet significatif après traitement à ( $10^{-10}$  M) de M3, alors que M3 à ( $10^{-12}$  M) a tendance à induire l'expression de ces trois gènes, plus que ses composants seuls, après 1h de traitement (Figure 62).

## **1.2. Mélange M2**

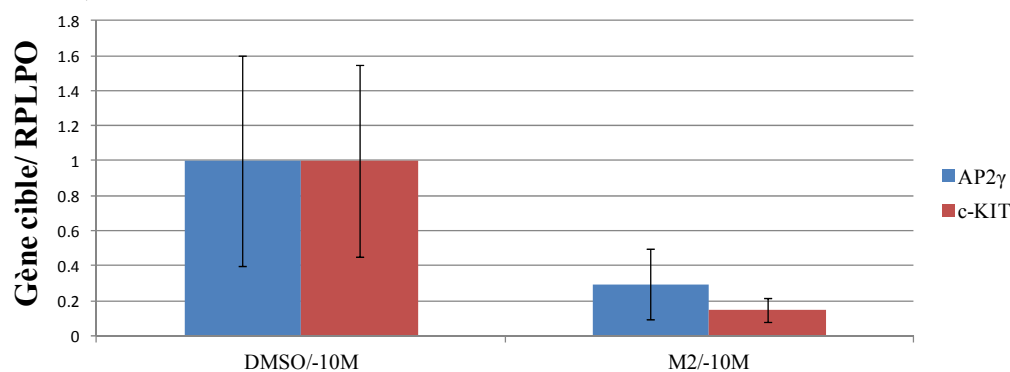
Le mélange M2 est un mélange de produits qui ont des effets œstrogéniques suspectés comme le octylphénol et 4-nonylphénol en proportions équivalentes (1 :1), et sont utilisés dans la fabrication des détergents et des cosmétiques.

### **1.2.1. Test de prolifération**

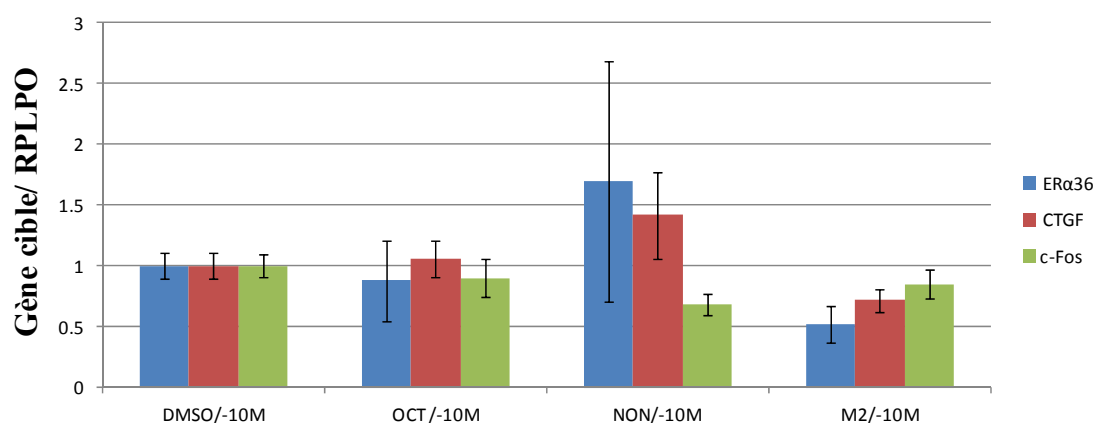
Des tests de viabilité cellulaire ont montrés que la présence de ce mélange dans le milieu de culture des cellules TCam-2, en différentes concentrations ( $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  et  $10^{-12}$  M), a un effet inhibiteur de la prolifération sur les cellules TCam-2.



**Figure 63 : Effet de mélange M2 sur la prolifération des cellules TCam-2.** Les cellules sont sevrées pendant 24 h dans un milieu RPMI contenant 0,5 % de SVF strippé (le RPMI 10% a été utilisé comme témoin positif), puis les cellules ont été traitées pendant 48h par M2 à ( $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  et  $10^{-12}$  M). Ensuite, les cellules sont comptées sous microscope. Les valeurs correspondent à la moyenne +/- s.e.m de 3 expériences indépendantes. \*, significativement différent du témoin (Vehi) ( $p < 0,01$ ). (Test de Student).



**Figure 64 : Effet de M2 ( $10^{-10}$  M) sur l'expression des gènes, c-Kit qui est un marqueur de la prolifération cellulaire et AP2γ qui est un marqueur de la signalisation des oestrogènes.** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules TCam-2 traitées par le DMSO ou le mélange M2 ( $10^{-10}$  M) pendant 24h. Le rapport gène d'intérêt/RPLPO du témoin est ramené à 1. Les valeurs correspondent à la moyenne +/- s.e.m de 3 expériences indépendantes. (Test de Student).



**Figure 65 : Effet de M2 ( $10^{-10}$  M) sur l'expression des gènes précoces qui sont des gènes cibles pour GPER (c-fos et CTGF) et du récepteur ERα36.** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules TCam-2 traitées par le DMSO, le mélange M2 ou ses composants à ( $10^{-10}$  M) pendant 1h. Le rapport gène d'intérêt/RPLPO du témoin est ramené à 1. Les valeurs correspondent à la moyenne +/- s.e.m de 3 expériences indépendantes. (Test de Student).

Le comptage des cellules vivantes sous microscope montre une diminution significative de nombre des cellules vivantes à  $10^{-8}$  et  $10^{-10}$  M de M2 (Figure 63).

### **1.2.2. Analyse biochimique**

Une analyse par western blot a aussi été réalisée pour tester l'expression de PARP clivée et déterminer l'effet apoptotique du M2 sur les cellules TCam-2. Les résultats obtenus n'ont pas montré une augmentation de mort cellulaire significative en présence M2 dans le milieu de culture pendant 48h de traitement.

### **1.2.3. Expression génique**

D'autre part, le traitement de cellules par M2 à  $10^{-10}$  M pendant 24 heures montre une diminution de l'expression des gènes qui sont décrit comme marqueurs de la prolifération comme (c-Kit), ainsi nous avons observé une diminution de l'expression d'AP2 $\gamma$  (gène cible aux œstrogènes) (Figure 64).

Nous avons également étudié l'effet du M2 et ses composées à ( $10^{-10}$  M) sur l'expression des gènes précoces, décrits comme des gènes cibles pour GPER, ainsi le gène ER $\alpha$ 36, le résultat a montré que M2 après 1h de traitement tendance à diminuer l'expression de ces gènes (Figure 65).

## **2. Conclusion pour les mélanges (M1, M2 et M3)**

Pendant la deuxième partie de ma thèse, j'ai permis une meilleure caractérisation de ces PEs. J'ai étudié l'effet de trois mélanges différents de micropolluants sur les cellules de cancer testiculaire TCam-2. Nous avons trouvé que les résultats pour M1 ne sont pas suffisamment clairs puisque ce mélange n'est pas stable dans le milieu de culture cellulaire (résultats non montrés ici). Concernant le mélange M2, nous avons observé une tendance anti-proliférative sur les cellules TCam-2. L'exposition à M3 semble stimuler la prolifération des cellules séminomateuses TCam-2, mais ces résultats étaient attendus puisque les composants de ce mélange ont des effets décrits comme œstrogéno-mimétiques.

## Résultats Partie III

### Publication

#### **An alkylphenol mix promotes seminoma derived cell proliferation through an ERalpha36-mediated mechanism**

Hussein Ajj, Amand Chesnel, Sophie Pinel, François Plénat, Stéphane Flament and Hélène Dumond

CNRS-Université de Lorraine, UMR 7039, Centre de Recherches en Automatique de Nancy, BP239, Vandoeuvre lès Nancy, F-54506, France

Article publié dans PLOS-ONE ; April 2013, Volume 8, Issue 4, e61758.

### 1. Introduction

L'incidence des cancers testiculaire a fortement augmenté au cours des 50 dernières années.

Des études épidémiologiques, réalisées sur des hommes migrants et l'analyse de modèles d'exposition *in vitro* et *in vivo*, ont fortement suggéré la participation des PE dans l'initiation et la progression du cancer du testicule (Beiki et al., 2010). Parmi la grande diversité de composés potentiellement capables de modifier la signalisation hormonale, les plastifiants sont (i) omniprésents et persistants dans l'environnement et la contamination humaine, (ii) utilisés dans la vie quotidienne dans la fabrication des cosmétiques, nourriture, eau potable et nettoyants pour la maison, et (iii) capables de déclencher une signalisation œstrogénique (Thomas et Dong, 2006).

Les PE tels que le bisphénol A (BPA), 4-nonylphénol (4-NP) et 4-tert-octylphénol (4-tert-OP) appartiennent à la famille des APs, et sont utilisés dans des procédés industriels. Quand ces composés sont libérés dans l'environnement, ils sont susceptibles de pénétrer dans le corps où ils sont mal éliminés par des enzymes de détoxification du foie chez les mammifères et ils peuvent entrer dans les cellules, en particulier dans les adipocytes dans lesquels ils peuvent s'accumuler en raison de leurs propriétés lipophiles (Calafat et al., 2005; Müller et al., 1998). Le BPA et le 4-NP sont aussi capables de traverser la membrane basale des tubules séminifères et de perturber la différenciation des cellules germinales en modifiant l'attachement et la communication cellulaire entre les cellules Sertoli et les CGs (McClusky et al., 2007).

Ces APs pourraient emprunter les voies de signalisation mitogéniques dépendantes des œstrogènes bien qu' ils présentent une affinité relative pour ER $\alpha$ 66 1000 fois inférieure de celle du 17 $\beta$ -œstradiol, et de 2 fois inférieure pour le récepteur transmembranaire GPER (G Protein-coupled Estrogen Receptor) (Li et al., 2012; Thomas et Dong, 2006).

Le but de notre travail a été d'étudier l'effet d'un mélange réaliste d'APs (4-tert-OP et 4-NP en rapport 1 :30) sur la prolifération des cellules séminomateuses TCam-2 *in vitro* et de déterminer le rôle du récepteur ER $\alpha$ 36 dans l'action de ce mélange œstrogéno-mimétique (Raecker et al., 2011). Nous avons ensuite étudié l'effet de ce mélange, appelé M4, sur la croissance tumorale *in vivo* en utilisant la lignée cellulaire NT2/D1 qui est une lignée de cellules de carcinome embryonnaire xéno greffées chez la souris Nude. Nous avons aussi cherché, par une analyse par puce à ADN, à déterminer l'effet de ce mélange sur l'expression génique.

## **2. Principaux résultats**

Afin de tester l'effet prolifératif du mélange M4 sur les cellules séminomateuses TCam-2 et sur les cellules de carcinome embryonnaire NT2/D1, nous avons compté, sous le microscope, le nombre des cellules vivantes après exposition aux différentes concentrations du M4 allant de 1  $\mu$ M à 0,01 pM pendant 48h (voir matériels et méthodes).

Nous avons montré que M4 stimule la prolifération des cellules TCam-2 et NT2/D1 avec un effet maximal pour une dose de 1nM. Cet effet n'est plus retrouvé dans une lignée TCam-2 qui n'exprime plus ER $\alpha$ 36, indiquant le rôle clé de ce récepteur dans la réponse au mélange M4.

Chez la souris mâle, un modèle de xéno greffe de cellules NT2/D1 a été établi. Les souris ont ensuite été traitées quotidiennement par M4 à (1  $\mu$ g/kg de poids corporel). Les résultats ont montré que le poids des tumeurs était significativement plus élevé en présence M4 par rapport aux souris injectées par le solvant. Ces résultats ont confirmé que l'exposition à faible dose du M4, correspondant à un apport quotidien humain (Zhang et al., 2011), et stimule la croissance de carcinome embryonnaire *in vivo*. Les cellules NT2/D1 qui n'expriment pas le récepteur ER $\alpha$ 36 ne sont pas viables ; nous n'avons donc pas pu tester le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans la réponse au mélange M4 *in vivo*.



D'autre part, nous avons montré que l'E2 et E2-BSA (E2 couplée à la protéine Sérum Albumine Bovine) stimulent la phosphorylation de la protéine CREB dans les cellules TCam-2 via des mécanismes dépendants des récepteurs GPER et ER $\alpha$ 36 (Wallacides et al., 2011). Nous avons également testé l'effet œstrogénique de M4 en mesurant le niveau de CREB phosphorylé : l'analyse a montré que M4 à 1,0 nM induit la phosphorylation de CREB après 20 minutes de traitement des cellules TCam-2.

Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans l'action de M4, les cellules Neo-TCam-2 et sh36-TCam-2 ont été prétraitées pendant 30 minutes par différents inhibiteurs avant l'exposition à 1,0 nM de M4. Parmi ces inhibiteurs, la Wortmanine semblait être le seul antagoniste capable d'empêcher l'effet spécifique de M4 dans les cellules TCam-2, ce qui suggère que M4 déclenche la phosphorylation de CREB de façon PI3K-dépendante. Cet effet n'est plus observé en absence d'ER $\alpha$ 36 (lignée sh36-TCam-2). De plus, le rôle essentiel de la voie de signalisation PI3K-dépendante a été confirmé dans les deux lignées cellulaires TCam-2 et NT2/D1, les résultats ont montré que le prétraitement par le Wortmanin a été également altéré l'induction de la prolifération des cellules sous l'effet de M4.

Pour déterminer le profil transcriptionnel de cellules TCam-2 exposées à M4, nous avons effectué une analyse par puce à ADN pour des cellules TCam-2 traitées ou non par 1 nM de M4 pendant 1h et 24h. L'analyse a montré que M4 modifie l'expression d'un grand nombre des gènes aux deux temps de traitement (à 1h et 24h, 1124 et 633 transcrits, respectivement). Parmi ces gènes, l'expression de 264 gènes a été modifiée dans les deux conditions de traitement. Ensuite, parmi les classes fonctionnelles de gènes dont l'expression est significativement modifiée, nous nous sommes focalisés sur les gènes impliqués dans les modifications épigénétiques, qui semblaient liées à PI3K/CREB et la signalisation du récepteur des œstrogènes.

L'expression des gènes de la famille Dnmt3 est diminuée de façon reproductible après 1h et 24h de traitement par M4. Cet effet a été détecté dans les cellules TCam-2 et Neo-TCam-2, partiellement pour Dnmt3A et Dnmt3L dans les cellules NT2/D1, alors qu'il n'a pas été observé dans les cellules sh36-TCam-2 ou les cellules qui sont prétraitées par la Wortmanine. Par conséquent, la répression de l'expression au niveau protéique de Dnmt3B et Dnmt3L sous l'effet de M4, ER $\alpha$ 36-PI3K-dépendante, a été observée. Ces résultats indiquent que la signalisation de M4, ER $\alpha$ 36-dépendante se terminant au niveau des gènes cibles

impliqués dans le statut de méthylation de l'ADN, pourrait être une caractéristique commune pour les deux types cellulaires, séminome et carcinome embryonnaire.

### **3. Conclusion**

L'exposition au mélange M4 stimule la prolifération cellulaire (*in vitro* et *in vivo*) et l'expression d'ER $\alpha$ 36. Ces effets sont médiés par la phosphorylation de CREB de façon PI3K-ER $\alpha$ 36-dépendante, et se terminent par la diminution de l'expression des gènes de la famille Dnmt3, qui, à son tour, pourrait, en limitant le niveau de méthylation de l'ADN, stimuler et maintenir un haut niveau l'expression d'ER $\alpha$ 36 et la prolifération rapide des cellules de cancer testiculaire.

# An Alkylphenol Mix Promotes Seminoma Derived Cell Proliferation through an ER $\alpha$ 36-Mediated Mechanism

Hussein Ajj, Amand Chesnel, Sophie Pinel, François Plenat, Stéphane Flament, Helene Dumond\*

CNRS-Université de Lorraine, UMR 7039, Centre de Recherches en Automatique de Nancy, Vandoeuvre lès Nancy, France

## Abstract

Long chain alkylphenols are man-made compounds still present in industrial and agricultural processes. Their main use is domestic and they are widespread in household products, cleansers and cosmetics, leading to a global environmental and human contamination. These molecules are known to exert estrogen-like activities through binding to classical estrogen receptors. *In vitro*, they can also interact with the G-protein coupled estrogen receptor. Testicular germ cell tumor etiology and progression are proposed to be stimulated by lifelong estrogeno-mimetic exposure. We studied the transduction signaling pathways through which an alkylphenol mixture triggers testicular cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. Proliferation assays were monitored after exposure to a realistic mixture of 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenol of either TCam-2 seminoma derived cells, NT2/D1 embryonal carcinoma cells or testis tumor in xenografted nude mice. Specific pharmacological inhibitors and gene-silencing strategies were used in TCam-2 cells in order to demonstrate that the alkylphenol mix triggers CREB-phosphorylation through a rapid, ER $\alpha$ 36-PI3kinase non genomic pathway. Microarray analysis of the mixture target genes revealed that this pathway can modulate the expression of the DNA-methyltransferase-3 (Dnmt3) gene family which is involved in DNA methylation control. Our results highlight a key role for ER $\alpha$ 36 in alkylphenol non genomic signaling in testicular germ cell tumors. Hence, ER $\alpha$ 36-dependent control of the epigenetic status opens the way for the understanding of the link between endocrine disruptor exposure and the burden of hormone sensitive cancers.

**Citation:** Ajj H, Chesnel A, Pinel S, Plenat F, Flament S, et al. (2013) An Alkylphenol Mix Promotes Seminoma Derived Cell Proliferation through an ER $\alpha$ 36-Mediated Mechanism. PLoS ONE 8(4): e61758. doi:10.1371/journal.pone.0061758

**Editor:** Yulia Komarova, University of Illinois at Chicago, United States of America

**Received:** December 20, 2012; **Accepted:** March 11, 2013; **Published:** April 23, 2013

**Copyright:** © 2013 Ajj et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by ANSES (APR EST 08-09). HA is the recipient of a Syrian Government fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: helene.dumond@univ-lorraine.fr

## Introduction

Over the last 50 years, the incidence of male reproductive disorders such as hypospadias, cryptorchidism, hypofertility and testis cancer has dramatically risen. For instance, testicular germ cell tumor (TGCT) has become the leading cause of cancer in men aged 15 to 45 years from industrialized countries. Among malignant tumors of the testis, 95% are testicular germ cell tumors, which are classified into two main categories based upon histologic, molecular and epigenetic traits: seminoma and non-seminoma [1]. Both derive from a common precursor cell type called carcinoma in situ (CIS) [2] which is believed to originate from misdifferentiated primordial germ cells or gonocytes in response to altered hormone signaling [3]. CIS cells appear during fetal life and then enter a period of dormancy in infancy until after puberty when TGCT emerge [4]. This prepubertal dormancy suggests a hormone sensitive mechanism for TGCT development and tumor progression at puberty. A wide range of published data dealing with TGCT geographic incidence variation, epidemiological studies performed on migrant men, and exposure model analyses *in vivo* and *in vitro* strongly suggest the participation of endocrine disrupting compounds (EDCs) in both initiation and progression of testis cancer. In occidentalized countries, this hypothesis also emerge to explain the burden of testis cancer associated pathologies such as cryptorchidism, hypospadias,

hypofertility, as well as increased incidence of other hormone sensitive cancer (breast, prostate, ovary, endometrium) [5–8].

Among the great diversity of compounds potentially able to alter hormone signaling, plasticizers are of great concern because of (i) the ubiquitous and persistent environmental and human contamination, (ii) their presence in everyday life used cosmetics, food, drinking water, home cleansers and (iii) their ability to trigger estrogenic signaling [9].

These molecules such as bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (NP) or 4-tert-octylphenol (OP) belong to the alkylphenol family and are still used in various industrialized processes. Once released in the environment, they become persistent pollutants that are poorly eliminated by liver detoxification enzymes in mammals and can enter cells, especially in body fat due to their lipophilic properties [10,11]. BPA and NP are also able to cross the seminiferous tubules basal lamina, alter the testis-blood barrier and trigger differentiating germ cell sloughing and apoptosis by disrupting Sertoli/germ cell attachment and communication [12]. Moreover, this class of EDCs appears to promote the development and progression of estrogen-dependent cancers [13]. BPA was also reported to promote mitogenic effect in JKT-1 seminoma derived cells [14,15].

Binding experiments indicate that alkylphenols could mimic estrogen mitogenic signaling since BPA, NP and OP display

a relative binding affinity to 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) in the range of 0.1% for the nuclear receptor ER $\alpha$ 66 and 50% for the transmembrane g-protein coupled estrogen receptor (GPER) [9,16]. Besides, nothing is known about alkylphenol binding to ER $\alpha$ 36, a novel 36 kDa NH<sub>2</sub>-term truncated form of the canonical human estrogen receptor ER $\alpha$ 66, retaining the DNA-binding, partial dimerisation and an altered ligand-binding domains [17]. ER $\alpha$ 36 was previously shown by us and others to mediate estrogen non conventional mitogenic signaling in TCam-2 seminoma cells, triple-negative breast cancers cells and endometrial cancer cells [18–20]. Depending on the cell lines tested, ER $\alpha$ 36 acts as a membrane located ER, sometimes collaborates with either GPER or EGFR, and triggers several kinase-dependent pathways, such as MAPK, STAT5 or PKA [20–23].

In an attempt to understand the mechanisms underlying the deleterious effects of EDCs on neoplastic germ cells, we aimed to decipher the alkylphenol-dependent transduction pathways in TCam-2 cells, a unique seminoma cell line [24]. The test compounds, 4-tert-octylphenol (4-t-OP) and 4-nonylphenol (4-NP) were mixed based on their realistic concentration ratio (1:30) in food from Raecker and colleagues [25]. The resulting mix was called M4 and used at concentrations that mimic human environmental exposure. First, we show that M4 increases the TCam-2 seminoma cell proliferation rate *in vitro* by triggering the stimulation of ER $\alpha$ 36 dependent mitogenic pathways. Second, we confirm the M4 stimulates NT2/D1 embryonal carcinoma cell proliferation *in vitro* as well as tumor growth in NT2/D1 xenografted nude mice. Finally, we demonstrate that alkylphenol signaling pathway ends on target genes involved in epigenetic modifications.

## Materials and Methods

### Reagents

The test compounds, 4-nonylphenol (CAS number: 84852-15-3), 4-tert-octylphenol (CAS no: 140-66-9), and 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>, CAS no: 50-28-2) were purchased from Sigma Aldrich (France). 4-tert-octylphenol (4-t-OP) and 4-nonylphenol (4-NP) were mixed based on their realistic concentration ratio (1:30) in infant food [25], thus forming the working mix called M4. Stock solutions of 10 mM for M4 (the concentration refers to 4-NP therein) or E<sub>2</sub> were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and further diluted in RPMI medium without phenol red. All working solutions were freshly made just before the cell treatment assays.

Wortmanin (PI3K inhibitor), G1 (GPER agonist) and G15 (GPER antagonist) were purchased from Sigma-Aldrich (France). Control cells were treated with DMSO, diluted with the same factor as M4 and indicated as “vehicle” in the figures and ranging from 0.01% to 10<sup>-12</sup>%.

### Ethic Statement

Animals used in the present research have been treated humanely according to institutional guidelines (Directive EU/63/2010), with due consideration to the alleviation of distress and discomfort. Protocol for animal handling and experiments was approved by the “Lorraine Regional Committee for Animal Experiments” and carried out by competent and authorized persons (personal authorization number 54–89 issued by the Department of Veterinary Services) in a registered establishment (establishment number C-54-547-03 issued by the Department of Veterinary Services).

Animal experiment was planned in respect to the 3R rule: minimal number of mice necessary and sufficient to reach statistical significance was calculated *a priori*. For each animal,

several organs (testis, liver, tumors, blood,) were harvested at the end of treatment for further analysis. Animals were housed in cages sized and filled with appropriate litter water respectfully to European ethic guidelines, with free access to tap water and food *ad libidum*, in filtered atmosphere to avoid pathogen contamination.

Males were reared in individual cages to avoid fight stress and aggressiveness. Animals were housed for 3 weeks before the beginning of any experiment. Tumor grafts were performed rapidly under sodium pentobarbital anesthesia in a warm separate room. Tumor grafts, radiotherapy and resection were performed under general anesthesia All s.c. injections and animal handling were performed by the same technician in a separate room and all efforts were made to minimize suffering. At the end of treatment, mice were anesthetized with 8 mg/kg xylazine and 90 mg/kg ketamine injection, blood was collected by cardiac puncture and animals sacrificed by cervical dislocation.

### Nude Mouse Xenograft Model

Pathogen-free, 5–7 week-old male athymic NMRI-nu (*nu/nu*) mice were purchased from Janvier Laboratories (Le-Genest-St-Isle, France). Animals were housed in solid-bottomed plastic individual cages with free access to tap water and standard food *ad libidum*.

Primary tumors were obtained after intra-testicular injection of 1 $\times$ 10<sup>7</sup> NT2/D1 cells. Six weeks later, tumors reached the ethic volume (0.5 cm<sup>3</sup>). Primary tumors were harvested and cut into 1 mm<sup>3</sup> pieces in order to be grafted sub-cutaneously in Nude male mice.

Six males bearing bilateral NT2/D1 grafts were daily inoculated s.c. with either vehicle, or M4 (1.0  $\mu$ g/kg bw or 10  $\mu$ g/kg bw), 5 days per week. Nude mice were pre-treated for 2 weeks before graft, tumor pieces were grafted and treatment was applied for 4 additional weeks (Figure S1). The low dose was relevant to daily children intake (0.8  $\mu$ g/kg bw/day) [25]. The tumor-take rate ranged from 95–100%. Mice weight (Figure S1) and tumor volume were monitored twice a week by caliper measurement of the length, width, and height and were calculated using the formula  $V = D \cdot d^2 / 2$ . At the end of treatment, tumors were removed, weighed, and fixed in 4% formalin for histological and immunohistochemical characterization (Figure S1).

### Cell Culture

TCam-2 and NT2/D1 cells were respectively maintained in RPMI1640 (GIBCO) and DMEM/F12 (1:1, GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen) and 2 mM L-glutamine and cultured in a 5% CO<sub>2</sub> containing atmosphere at 37°C. Briefly, cells were plated in 10% FCS containing medium for 24 h and then starved for 24 h in 0.5% charcoal-stripped FCS-containing medium without phenol red. Treatments were performed on 0.5% charcoal-stripped FCS cultured cells, plated at a density of 8 $\times$ 10<sup>4</sup> cells per well in 6-well plates. In case of inhibitor use, the corresponding compound was added to the medium 30 minutes before M4 or E<sub>2</sub> treatment.

### Cell Proliferation Assay

Cells were seeded in 96-well plates at a density of 1 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well, in 0.2 ml medium supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. They were washed with PBS (GIBCO) once they had attached and then incubated in phenol red-free medium containing 0.5% charcoal-stripped FCS for 24 h. Cells were then submitted to the indicated treatments for 48 h. At the end of the treatment, cells were counted by using an inverted microscope. Each treatment was replicated six times. For proliferation assays,

the DMSO dilution retained was similar to the one of M4 having the most important effect (1 nM M4 corresponding to 10<sup>-3</sup>% DMSO). However, none of the DMSO doses tested displayed proliferation stimulation effect compared to non treated cells.

### Real-time PCR Analysis

Reverse transcription and real-time PCR analyses were performed as previously described [19]. Large ribosomal protein (RPLPO) encoding gene was used as a control to obtain normalized values. Primers are listed in Table S1. Assays were performed at least in triplicate, and the mean values were used to calculate expression levels, using the  $\Delta\Delta C(t)$  method referring to RPLPO housekeeping gene expression. When treatments were performed, the variation of expression was measured as treated/DMSO treated cells (control).

### RNA Interference

The small-interfering RNA (siRNA) duplexes for targeting GPER (Table S1) and scrambled control (SR-CL000-005) were purchased from Eurogentec (Angers, France). TCam-2 cells (8 $\times$ 10<sup>4</sup>) were plated into 6-well plates, in 2 ml of medium supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine the day before transfection. Cells were transiently transfected with either GPER (200 nM of the duplex) or scrambled siRNAs by using the Oligofectamine<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, cells were washed with PBS and the medium was replaced with phenol red-free RPMI supplemented with 0.5% charcoal-stripped FCS and 2 mM L-glutamine. 24 h later, cells were treated in phenol red-free and 0.5% stripped FCS RPMI and harvested for further analyses. Efficacy of RNA interference is presented in Figure S2A.

### Western Immunoblotting

Western blot were performed as described previously [19]. The following primary antibodies were used: anti-ER $\alpha$ 36 (diluted 1:5000, Cell Applications, San Diego, USA), anti-DNMT3A (diluted 1:500, Active Motif n<sup>o</sup>39897, La Hulpe, Belgium), anti-DNMT3B (diluted 1:1000, Active Motif n<sup>o</sup>39899), anti-DNMT3L (diluted 1:5000, Active Motif n<sup>o</sup>39907) and anti-phospho CREB (1:1000; Epitomics #11113-5, Montrouge, France). The anti-alpha tubulin antibody (1:5000, sc2004, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) was used as a control. The membranes were developed with ECL detection reagent using chemiluminescence (Amersham, Orsay, France). Protein quantification was performed using the Quantity One Geldoc software (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

### Transient Transfection and Establishment of Stable Cell Line

TCam-2 cells were transfected with the empty expression vector or the ER $\alpha$ 36-specific shRNA expression vector kindly provided by Dr Wang ZY (Creighton University medical school, Omaha, USA) using the ExGen500 *in vitro* transfection reagent (Euro-medex, France) as described previously [19]. Efficacy of shRNA knock-down is shown in Figure S2B.

### Statistical Analysis

Data were summarized as the mean  $\pm$  s.e.m. Proliferation analysis data from each dose group were compared by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Bonferroni multiple procedure with SPSS software (SPSS Inc., Chicago, USA). Real-time PCR and western blot experiments results were analyzed as follows: variance analysis of treated *versus* control cells was

performed using Dunnett's test for multiple comparisons. Differences in which *P* was less than 0.05 were considered as statistically significant.

## Results

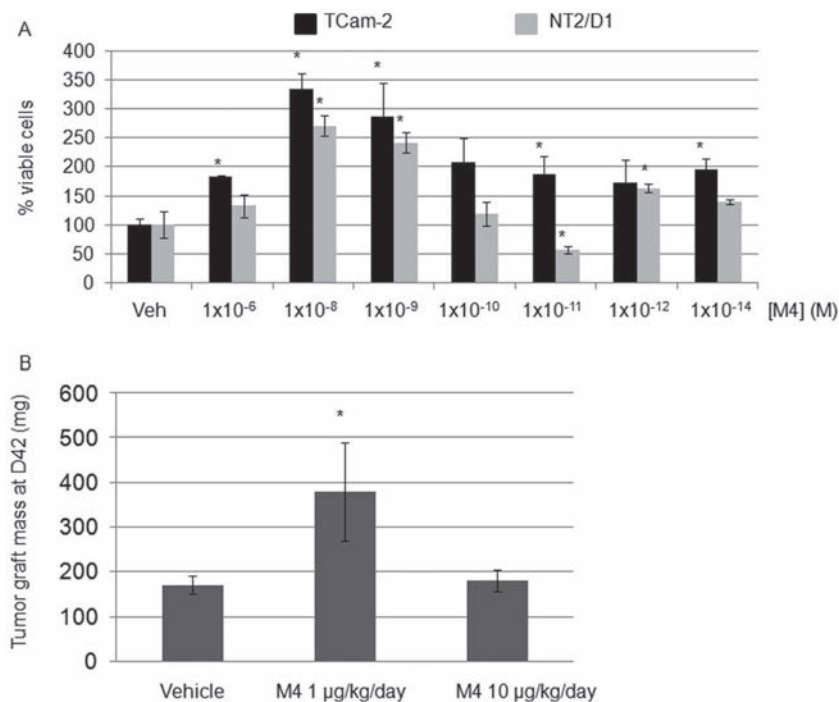
### The M4 Alkylphenol Mix Stimulates Testicular Germ Cell Tumor Growth *in vitro* and *in vivo*

To test if an alkylphenol mix such as M4 could act as a proliferation inducer in seminoma-derived (TCam-2) and embryonal carcinoma (NT2/D1) cell lines, the growth rate of TCam-2 and NT2/D1 cells was determined by counting the number of cells exposed to different concentrations of M4. After a 24 h serum deprivation, cells were treated for 48 h with M4 decimal dilutions starting from 1.0  $\mu$ M to 0.01 pM and counted by using an inverted microscope. M4 stimulated TCam-2 and NT2/D1 proliferation whatever the dose tested (Figure 1A). The dose-response curves of these cells to M4 exhibited non-monotonic or biphasic pattern. When compared to vehicle exposure, a maximum proliferation increase was observed for cells treated in the nanomolar range, which corresponds to environmental doses. Therefore, the dose of 1.0 nM was retained for further analyses.

To assess the effect of *in vivo* M4 exposure in male (androgenic; low estrogenic) hormonal context, a NT2/D1 derived germ cell tumor xenograft model was established (see material and methods section for details). Figure 1B shows that, at the end of treatment, tumor weight was significantly higher in M4 (1  $\mu$ g/kg bw) *versus* vehicle injected mice. These data confirmed that an exposure to a low dose of M4, which corresponds to human daily intake [25] stimulates embryonal carcinoma growth *in vivo*. Notably, It is noteworthy that NT2/D1 cells knocked down for ER $\alpha$ 36 are not viable. They can be selected and isolated after shRNA transfection but do not divide and therefore cannot be amplified for *in vivo* injection or used *in vitro* for proliferation assays. We also tried twice to obtain sh36-TCam-2 derived tumors after intra testicular injection of 1 $\times$ 10<sup>6</sup>, 5 $\times$ 10<sup>6</sup>, 1 $\times$ 10<sup>7</sup> or 2 $\times$ 10<sup>7</sup> cells but we never observed any tumor take, even 10 weeks after injection.

### M4 Triggers CREB Phosphorylation Through an ER $\alpha$ 36 Dependent Pathway

Since we previously demonstrated that E<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>BSA both trigger CREB phosphorylation and in TCam-2 cells through GPER-ER $\alpha$ 36 dependent mechanisms [19], we tested the potential estrogenicity of M4 by assessing phosphorylated CREB level. Western blot analysis clearly indicated an increase of CREB phosphorylation level (Figure 2A) after a 20 minute exposure to 1.0 nM M4. Several membrane receptors such as EGFR or GPER have been previously described to trigger estrogen-like signaling in various cancer cell lines [19,26]. However, CREB phosphorylation induction was still observed in scrambled siRNA, EGFR-targeted transfected cells, suggesting that EGFR is not required for M4 signaling in TCam-2 seminoma-derived cells (data not shown). In order to check GPER involvement in M4 signaling, we used GPER agonists or antagonists in several contexts: scrambled siRNA transfected cells and their GPER-targeted counterparts were exposed to vehicle, 1.0 nM M4, 1.0 nM E<sub>2</sub>, 100 nM G1 (a GPER agonist) or 100 nM G15 (a GPER antagonist) for 20 minutes. M4, G1 and G15 appeared to be powerful inducers of CREB phosphorylation whereas E<sub>2</sub> displayed lower efficiency in control cells (Figure 2B). In GPER-knocked down cells, M4, G1 and G15 could still stimulate CREB phosphorylation, even if this effect was milder, demonstrating that GPER activity was not fully required. As previously demonstrated, GPER knockdown pre-



**Figure 1. Alkylphenols stimulates TCam-2 and NT2/D1 cell proliferation *in vitro* and *in vivo*.** (A) Cells were treated by M4 concentrations ranging from  $1 \times 10^{-6}$  to  $1 \times 10^{-14}$  M or vehicle for 48 h and counted under inverted microscope (see text for details). The DMSO dilution retained and indicated as "vehicle" was similar to the one of M4 having the most important effect: 1 nM M4 corresponding to 0.00001% DMSO. Notably, none of the DMSO doses tested (ranging from 0.01% to  $10^{-12}$ %) displayed proliferation modulating effect compared to non treated cells. Values indicated are the mean of 6 counts  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs vehicle treated. (B) Exposure to M4 alkylphenol mix stimulates tumor growth in nude male mice, injected 5 times a week with a M4 dose corresponding to human exposure or with a ten-fold higher dose. Tumors were weighed after a 6-week long treatment duration. Indicated values are the mean of at least 10 tumor weights  $\pm$  SEM. doi:10.1371/journal.pone.0061758.g001

vented E<sub>2</sub>-dependent CREB phosphorylation, which suggests that the mechanisms involved in M4 signaling do not fully mimic those of estrogens [19]. Since G1 and G15 can act as ER $\alpha$ 36 agonists and stimulate non genomic signaling pathways [21,27] the results presented in Figure 2B also suggest that ER $\alpha$ 36 in addition to GPER could trigger M4 dependent CREB phosphorylation.

#### ER $\alpha$ 36 Mediates M4 Induced Cell Proliferation and CREB Phosphorylation in TCam-2 Cells

Normal human germ cells from the testis, malignant germ cells and their derived cell lines TCam-2 or NT2/D1 do not express the long form of ER $\alpha$ , ER $\alpha$ 66. Nevertheless, they express the ER $\alpha$ 36 isoform, which is necessary for mitogenic response to estrogens [19]. To address the hypothesis of ER $\alpha$ 36 involvement in M4 proliferative effects, we performed dose-response experiments in the neo-TCam-2 and sh36-TCam-2 stable cell lines, which contain respectively, an empty plasmid or the corresponding vector expressing ER $\alpha$ 36 targeted shRNA [19]. Figure 3A shows that a 48 h exposure to 1.0 nM M4 could stimulate neo-TCam-2 cell proliferation whereas this mitogenic effect was not observed in sh36-TCam-2 cells. Besides, CREB phosphorylation level did not increase in M4-treated ER $\alpha$ 36-knocked down TCam-2 cells (Figure 3B). Both results strongly suggest that ER $\alpha$ 36 is required for M4 signaling in seminoma-derived cells.

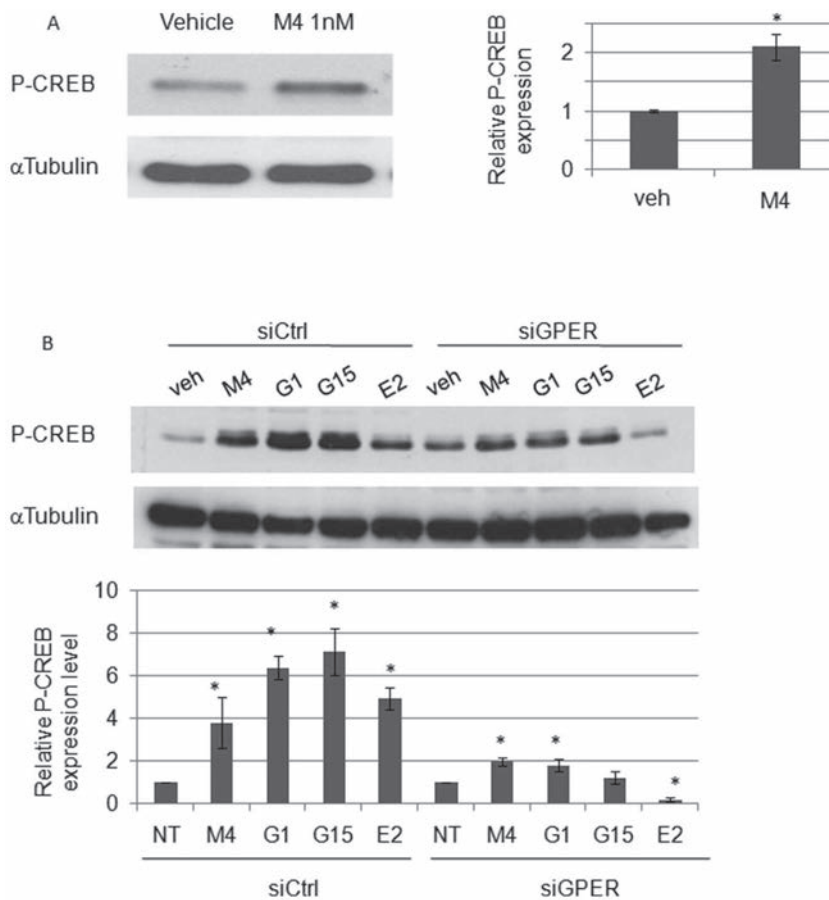
Neo-TCam-2 and sh36-TCam-2 cells were pre-treated with antagonists for several signaling pathways for 30 minutes before M4 exposure: a PKC inhibitor (BIM), the PKA inhibitor H89 and the PI3K inhibitor wortmanin. BIM did not prevent M4 induced CREB phosphorylation whereas H89 totally blocked it as well as

its basal level, even in the non-M4 treated cells (data not shown). Wortmanin seemed to be the only antagonist able to prevent an M4 specific effect in neo-TCam-2, suggesting that M4 triggers ER $\alpha$ 36-PI3kinase-dependent CREB phosphorylation in TCam-2 cells (Figure 3B).

The key role of PI3K-dependent signaling was further confirmed in both TCam-2 and NT2/D1 cells since wortmanin pre-treatment also impaired M4-enhanced cell proliferation (Figure 3C). Noteworthy, wortmanin, by itself, seemed to trigger a mild stimulation of NT2/D1 proliferation at high doses (1  $\mu$ M to 10  $\mu$ M; data not shown). Such an effect was not observed in TCam-2 cell line.

#### M4 Represses DNA-methyltransferase Expression Through ER $\alpha$ 36 Dependent Mechanisms in TCam-2 Cells

In order to determine the transcriptional profile of TCam-2 cells exposed to M4, we performed a microarray analysis of gene expression after a 60 minutes or a 24 h treatment. TCam-2 cells were cultured for 24 h in 0.5% FCS containing medium in the presence of vehicle or 1.0 nM M4. Total RNA was extracted for global analysis of gene expression on Nimblegen microarray. Venn diagram presented in Figure 4 indicates that 1124 transcripts and 633 transcripts were up or down regulated (absolute variation factor  $\geq 2$  in duplicate RNA samples,  $P < 0.05$ ) after 1 hour or 24 hours M4 exposure, respectively. Among them, 264 genes were similarly regulated in both conditions and the corresponding list was analyzed for functional classes and networks with the Ingenuity software (Tables S2, S3, S4, [28]). As expected, main networks and biological functions associated to the list of M4



**Figure 2. M4 induces CREB phosphorylation in TCam-2 cells through a GPER-independent pathway.** (A) Cells were treated for 20 minutes with 1.0 nM of M4 and the level of phosphorylated CREB (P-CREB) was assessed by western-blot analyses compared to vehicle treated cells. (B) Western blot analyses of CREB phosphorylation upon exposure to 1.0 nM M4, 10 nM G1, 10 nM G15, or 1.0 nM E<sub>2</sub> for 20 minutes in TCam-2 cells transfected by scrambled siRNA (siCtrl), or GPER-targeted siRNA (siGPER). Alpha tubulin stands for a loading control. Quantification means  $\pm$  SEM and corresponding statistical analyses from at least three similar experiments are indicated. \* $P < 0.05$  vs vehicle treated. doi:10.1371/journal.pone.0061758.g002

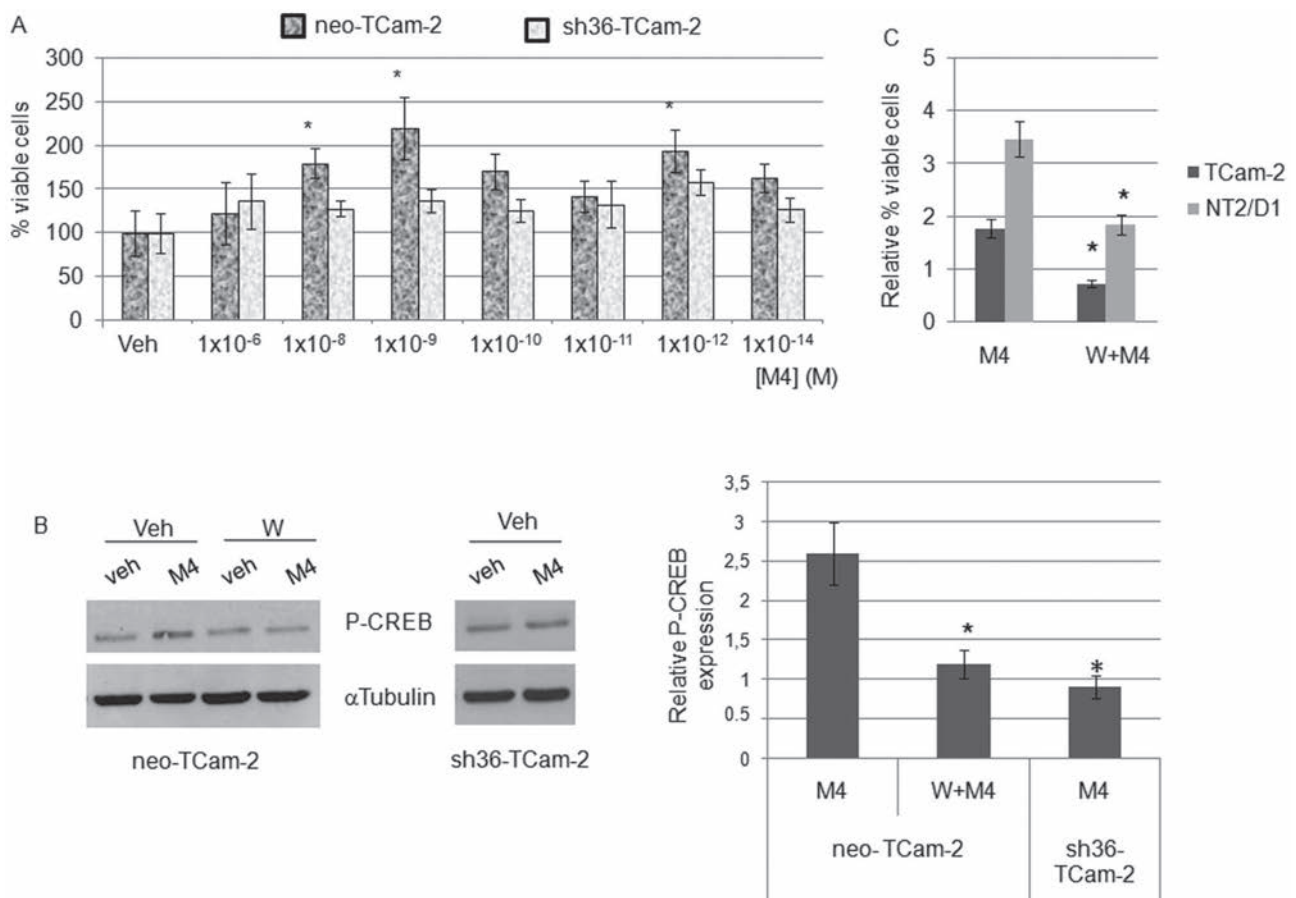
regulated genes referred to cancer, developmental disorder, cell growth and proliferation (Tables S2 and S3). Moreover, the predicted upstream regulators were all related to estrogens (Table S4).

Among the functional classes of genes whose expression is significantly up- or down-regulated (top list provided in Table S5), we focused on those involved in epigenetic modifications which seemed related to PI3K/CREB and estrogen receptor signaling in Ingenuity sorting (Figure S3). Indeed, two of the three Dnmt3 genes display predicted CREB response elements half-sites (TGACG/CGTCA) in their promoter region (Dnmt3A: -684; -783; -1468; -2644; -3605; Dnmt3L: -2297; -2884 from the transcription start site) and therefore are good candidates for CREB-dependent expression control. Namely, the Dnmt3 gene family displayed a mild but reproducible down regulation after both 60 minutes and 24 h M4 exposures (Table 1). The results from microarray analysis were confirmed by quantitative RT-PCR (Figure 5A) and western-blot (Figure 5B) analyses. Indeed, M4 triggered a downregulation of DNMT3 expression in TCam-2 and neo-TCam-2 cells whereas such a repression was not observed in sh36-TCam-2 cells or after a 30 minute wortmanin pre-treatment (Figure 5C). Similar downregulation of Dnmt3A and Dnmt3L gene expression was observed in NT2/D1 cells (Figure 6A). Hence, M4- and PI3K-dependent repression of DNMT3B and

DNMT3L was further observed at the protein level (Figure 6B). This suggests that the ER $\alpha$ 36-dependent M4 signaling ending at target genes involved in DNA-methylation status could be a common feature of both seminoma and embryonal carcinoma cells.

## Discussion

Although numerous chemicals are now known or suspected to have endocrine disruption effects, a relevant classification based on comprehensive understanding of their mode of action and targets is still failing. More confusing is the wide variety of cocktails detected in the environment, when trying to decipher dose-response consequences for lifelong human exposure. In the present study, we chose to focus on a well defined mix of alkylphenols - M4 -composed of 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenol (1:30 ratio). Despite the burden of recent research on BPA which belongs to the same chemical family and exert various estrogenic effects, 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenol are still neglected. High doses of tert-octylphenol or nonylphenol ranging from 25 to 200 mg/kg bw were previously shown to significantly decreased sperm count and quality in male mice, and affect uterine weight, vaginal opening and reproductive ability in female rats [29,30]. However, both molecules have never been associated in a realistic mixture



**Figure 3. ER $\alpha$ 36 mediates M4-induced PI3K-dependent proliferation and CREB-phosphorylation.** (A) neo-TCam-2 or sh36-TCam-2 were previously described [-]: briefly, the neo-TCam-2 cell line was transfected with a control vector whereas sh36-TCam-2 stably expresses ER $\alpha$ 36 targeted shRNA. Both cell lines were treated by M4 concentrations ranging from  $1 \times 10^{-6}$  to  $1 \times 10^{-14}$  M or vehicle for 48 h and cells were counted by using an inverted microscope. Values indicated are the mean of 6 counts  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs vehicle treated. (B) neo-TCam-2 or sh36-TCam-2 cell lines were treated for 20 minutes with 1.0 nM of M4 alone or after a 30 minute pre-treatment with 0.2  $\mu$ M wortmanin. The level of phosphorylated CREB was then assessed by western-blot analysis and compared to vehicle treated cells. Quantification means  $\pm$  SEM and corresponding statistical analyses from at least three similar experiments are indicated. \* $P < 0.05$  vs vehicle treated. (C) TCam-2 and NT2/D1 cells were pre-treated with 0.2  $\mu$ M wortmanin for 1 hour before a 48 hour exposure to 1 nM M4. Cells were then counted by using an inverted microscope. Quantification means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs M4 treated.  
doi:10.1371/journal.pone.0061758.g003

mimicking daily human contamination from household products, cosmetics and food. Here, estrogen-like mechanisms of action were addressed in a model of TGCT lacking the long form of ER $\alpha$  receptor (ER $\alpha$ 66). As in the case of 17 $\beta$ -estradiol or its BSA-coupled counterpart, M4 doses ranging from 10 nM to 0.1 nM stimulated both seminoma and embryonal carcinoma cell pro-

liferation in a non monotonic dose-response manner. Moreover, we observed a positive impact of M4 exposure on tumor growth in a TGCT xenograft nude mouse model after a treatment corresponding to human intake (1  $\mu$ g/kg bw) [25]. No stimulating effect was detected after exposure to the higher dose (10  $\mu$ g/kg bw), suggesting (i) that tumor growth in xenografted mice could



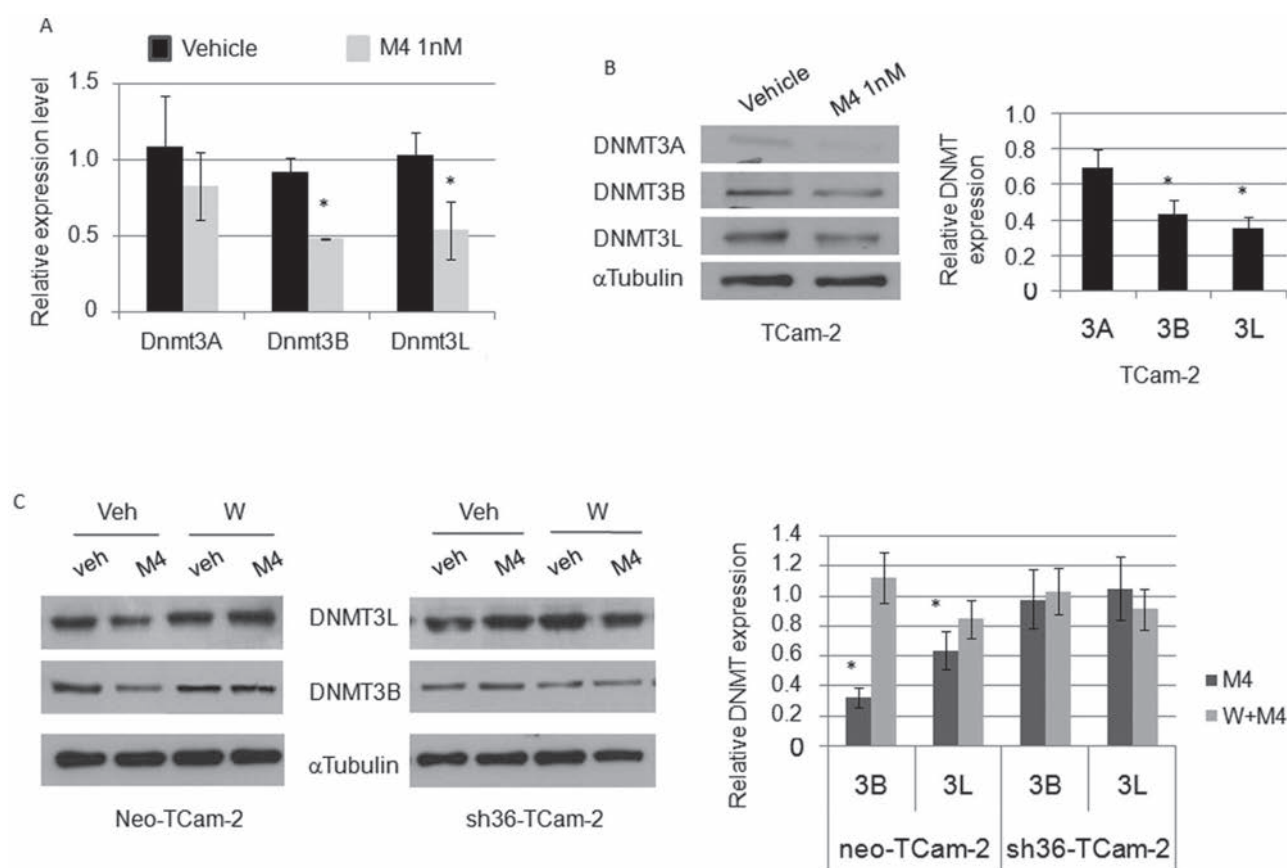
**Figure 4. Venn diagram of M4 regulated genes as revealed by microarray analysis in TCam-2 cells.** 860 genes and 369 genes were regulated by at least two-fold ( $p < 0.05$ ) after 1 hour or 24 hour 1 nM M4 treatment, respectively. 264 genes were commonly regulated at both exposure times.  
doi:10.1371/journal.pone.0061758.g004

**Table 1. DNMT3 gene expression level variation after either 1 hour or 24 h M4 exposure as observed in microarray analysis in TCam-2 cells.**

Sequence ID	Gene name	1 h M4 exposure		24 h M4 exposure	
		Fold	<i>p</i> value	Fold	<i>p</i> value
NM_175630	DNMT3A	-2.25	0.03	-2.16	0.01
NM_006892	DNMT3B	-2.65	0.01	-3.19	0.01
NM_013369	DNMT3L	-2.70	0.001	-2.96	0.001

doi:10.1371/journal.pone.0061758.t001





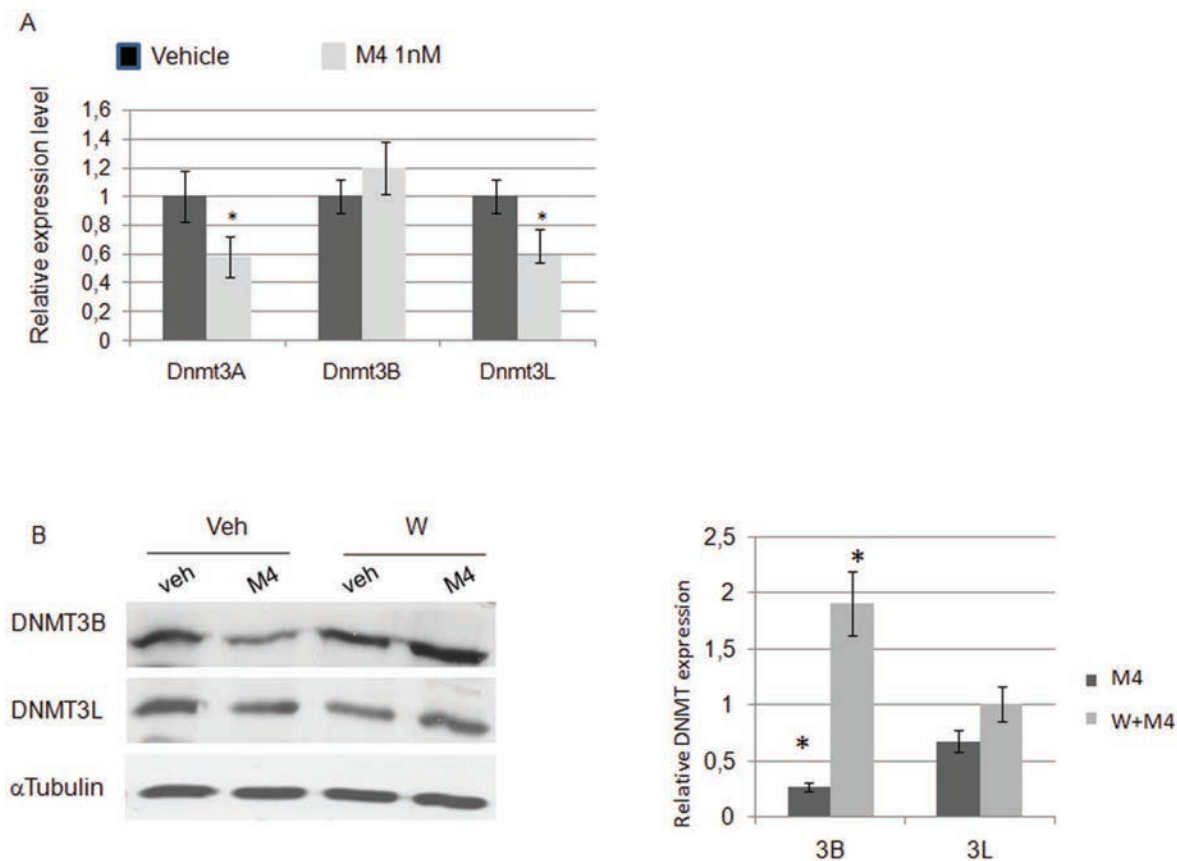
**Figure 5. M4 represses the expression of Dnmt3A, Dnmt3B and Dnmt3L. (A–B).** TCam-2 cells were treated for 24 hours with 1.0 nM of M4 and Dnmt3A, 3B or 3L expression was assessed by real-time PCR (A) or western-blot analysis (B). (C) M4-dependent Dnmt3B and Dnmt3L down-regulation was also observed in neo-TCam-2 cells but was impaired after a 30 minute pre-treatment with 0.2  $\mu$ M wortmanin or in sh36-TCam-2 cells. Quantification means  $\pm$  SEM and corresponding statistical analyses from at least three similar experiments are indicated. \* $P$ <0.05 vs vehicle treated. doi:10.1371/journal.pone.0061758.g005

respond to M4 in a non-monotonic way, as observed for in vitro cell proliferation or (ii) that a mild toxicity could appear after exposure to high doses of the mix. Taken together, these results suggest that alkylphenol exposure may on the one hand, alter normal germ cell multiplication and differentiation during development [12,31] through mutagenic or clastogenic mechanisms at high doses [32,33] as described by others and on the other hand, elicit neoplastic germ cell proliferation at low doses, as shown in this study.

Therefore we investigated the rapid non-genomic transduction pathways potentially involved. Whereas estradiol and BPA were previously shown to bind and exert such mitogenic effects through GPER in both SKBR3 breast cancer cells and JKT-1 seminoma derived cells [15,34], we demonstrated that M4 acts mainly via an ER $\alpha$ 36-dependent pathway. Indeed, we evidence here that M4 triggers PI3K activity and CREB phosphorylation. Nevertheless, preliminary data indicate that both GPER and ER $\alpha$ 36 may activate downstream signaling such as src phosphorylation and thus modulate the expression of M4 target gene subclasses as well as cell proliferation (A. Chesnel, personal communication). Since GPER was shown to partially govern ER $\alpha$ 36 expression in our TCam-2 model [19] and may collaborate with ER $\alpha$ 36 for estrogenic activities in other cancer cell lines [26,35], it would be relevant to test the participation of ER $\alpha$ 36 in alkylphenol

response in hormone-sensitive cancers such breast or prostate cancers.

The microarray analysis performed in order to describe the gene expression pattern of M4-treated TCam-2 cells, indicated that several epigenetic modification enzymes encoding genes are affected. We focused on M4-dependent down-regulation of DNMT3 expression because (i) other estrogeno-mimetic such as genistein and resveratrol or anti-androgenic compounds such as vinclozolin that are present in food have been previously demonstrated to modulate tumor suppressor gene expression through epigenetic mechanisms [36,37], (ii) DNMT3 proteins have been shown to be involved in germ cell proliferation and differentiation control during a developmental window when neoplastic germ cells (CIS) are believed to emerge [38], (iii) polymorphism of these genes is clearly associated with gastric and breast cancer, as well as ovarian endometriosis susceptibility [39–41]. Indeed, “Ingenuity sorting” clearly classifies DNMT3 down-regulation into functional networks involved in cancer progression and cell proliferation downstream estrogen receptors and estrogens (Tables S2, S3, S4). Moreover, several studies point out the key role of DNA methylation in testicular tumor initiation, progression and resistance to chemotherapy [42–46], highlighting the importance for examining carefully which upstream compounds or regulation factors are able to modulate DNMT expression and activity.



**Figure 6. M4 modulates the expression of Dnmt3A, Dnmt3B and Dnmt3L through PI3K-dependent signaling. (A–B).** NT2/D1 cells were treated with 1.0 nM of M4 and Dnmt3A, 3B or 3L expression was assessed by real-time PCR (A) or western-blot analysis without or after a 30 minute pre-treatment with 0.2  $\mu$ M wortmanin (B). Quantification means  $\pm$  SEM and corresponding statistical analyses from at least three similar experiments are indicated. \* $P$ <0.05 vs vehicle treated. doi:10.1371/journal.pone.0061758.g006

Hence, our results indicate that either wortmanin treatment or ERalpha36 knockdown can impair M4-dependent Dnmt3 repression while ERalpha36 expression appears to be necessary for M4-dependent enhanced proliferation.

CREB target gene database detects CREB response elements half-sites in Dnmt3A and Dnmt3L promoters and further suggest that both gene could be a target for the PI3K/CREB dependent pathway [47]. Moreover, Hervouet and coworkers [48] demonstrated that DNMT3B and 3A can physically interact with several transcription factors involved in proliferation control, such as CREB, FOSB, KLF12, EGR1 or JUN, which were proposed to direct methylation on specific gene promoter sequences. DNMT3 can also regulate each other expression through promoter methylation [38].

Finally, since ERalpha36 promoter is located into the first intron of ESR1 gene, balanced expression of either ERalpha66 or ERalpha36 could be regulated by differential methylation. This point was already addressed by others who demonstrated that downregulation of DNMT3A and DNMT3B led to regulation of ESR1 or ESR2 via promoter DNA aberrant methylation in acute myeloid leukemia, endometriosis, prostate and ovarian cancer [49–52].

Endocrine disruptors such as alkylphenols are also suspected to alter germ cell epigenetic reprogramming during fetal and perinatal development, thus triggering long-term disruption of gene expression which, in turn, could be a main risk factor for

hormone-dependent cancers. Anway and colleagues [37] also found DNMT3A and DNMT3L isoforms to be repressed in the testis after embryonic exposure to the endocrine disruptor vinclozolin. This commonly used fungicide suspected to have antiandrogenic effects triggered transgenerational epigenetic reprogramming associated with increased adult onset diseases, namely prostate disease, testis abnormalities, and tumor development [53]. Therefore, it could be relevant to address the effects of delayed consequences of a M4 exposure.

Surprisingly, DNMT3L expression was clearly detected at both mRNA and protein level in TCam-2 seminoma-derived cells by using commercially available antibody contrary to previous work on human biopsies using homemade polyclonal antibody and indicating that DNMT3L expression was restricted to embryonal carcinoma [54]. In the germ cell lineage, DNMT3L is involved in *de novo* retrotransposon methylation and appears to be a signature of prospermatogonia stage [55]. Therefore, the expression of DNMT3L could be a hallmark of undifferentiated stage.

DNMT3A and DNMT3B are usually described as enzymes responsible for the establishment of specific CpG dinucleotides methylation essential for embryonic development and gene repression at the time of implantation [56]. However, a growing number of evidences support the hypothesis for their contribution in the maintenance of DNA methylation [57]. DNMT3L also participates in a complex coupling H3K4 methylation and DNMT3A-dependent DNA methylation, thus modifying chroma-

tin accessibility [58]. Therefore, M4-dependent downregulation of these enzymes could trigger DNA hypomethylation and chromatin opening, thus leading to aberrant gene expression pattern, which can be maintained transgenerationally. These observations are of particular interest in the field of testicular germ cell carcinogenesis since CIS are proposed to originate in non-differentiated primordial germ cells displaying a gene expression pattern of pluripotency. This could be also relevant in the context of testis tumor growth since lifelong M4 exposure may maintain a population of non-differentiated/highly proliferative cancer cells in the tumor.

Taken together, these data suggest that M4 exposure may elicit a positive feedback loop beginning at ER $\alpha$ 36 activation, triggering PI3K-dependent CREB phosphorylation, ending on Dnmt3 repression which, in turn, could stimulate and maintain a high level of ER $\alpha$ 36 expression and rapid proliferation. Epigenetic regulation of ESR1 locus remains to be carefully examined in various cell contexts in order to address such a hypothesis.

## Supporting Information

**Figure S1** Characterization of testis tumor xenograft model in nude mice. Germ cell tumor xenograft models were first established after intra testicular injection of  $1 \times 10^7$  TCam-2 or NT2/D1 cells in 0,9% NaCl in nude mice. Tumors developed to approximately 0.5 cm<sup>3</sup> in 6 weeks. MRI imaging was used (Spectro-imageur Bruker Biospec Avance 24/40; 2.4 teslas magnetic field) to confirm the presence of tumors into the scrotum. Tumors were harvested and seminoma or embryonal carcinoma identity was attested by histological and immunohistochemical analyses. The slices presented are hematoxylin/eosin/safran colorations of TCam-2 derived or NT2/D1 derived tumors. Tumor tissue was harvested and subcutaneously (s.c.) grafted in the inguinal pit of male nude mice. Because NT2/D1, but not TCam-2 derived tumors developed, we focused on the NT2/D1 model to examine the effects of M4 on tumor growth. Nude mice were s.c. implanted with 1–2 mm<sup>3</sup> tumor pieces harvested from previously grown (0.5 cm<sup>3</sup>) NT2/D1 tumor (third passage). For alkylphenol assay, M4 or vehicle treatment was injected five days per week subcutaneously in male nude mice 2 weeks before, and 4

weeks after tumor graft in order to mimic everyday life contamination (see text for details). Bars are 100  $\mu$ m long. (TIF)

**Figure S2** Real time PCR analysis (A) and western blot (B) showing the efficacy of GPER- or ER $\alpha$ 36 -silencing in TCam-2 cells, respectively. (TIF)

**Figure S3** General scheme of Ingenuity software analysis showing the regulation network which involves DNMT3 gene family. (TIF)

**Table S1** Primer and siRNA sequences. (DOCX)

**Table S2** Main results from Ingenuity analysis: top five networks in which M4 regulated genes are involved. (DOCX)

**Table S3** Main results from Ingenuity analysis: biological functions in which M4 regulated genes are involved. (DOCX)

**Table S4** Main results from Ingenuity analysis: Top five predicted upstream regulators of M4 regulated genes. (DOCX)

**Table S5** Top list of the 20 genes deregulated by M4 after 1 hour or 24 hour exposure. (DOCX)

## Acknowledgments

We thank Partnerchip Inc. for microarray analysis, Professor Z.Y. Wang for the gift of shRNA expressing vectors, J. Flayac and M. Chillet for great technical support. This work was funded by the « Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail » (partnerships EST-08-09; EST-2012/2/014).

## Author Contributions

Corrected the manuscript: SP SF. Conceived and designed the experiments: HD AC SP. Performed the experiments: HA AC SP FP HD. Analyzed the data: AC SP FP HD. Wrote the paper: AC HD.

## References

- Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnon F, Lobaccaro JM, et al. (2012) Epigenetic, a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 150. doi: 10.3389/fendo.2012.00150.
- Skakkebaek NE (1975) Atypical germ cells in the adjacent "normal" tissue of testicular tumours. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 83: 127–130.
- Sonne SB, Almstrup K, Dalgaard M, Juncker AS, Edsgard D, et al. (2009) Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res* 69: 5241–5250.
- Rajpert-De Meys E, Hoci-Hansen CE (2007) From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann NY Acad Sci* 1120: 168–180.
- Beiki O, Granath F, Allebeck P, Akre O, Moradi T (2010) Subtype-specific risk of testicular tumors among immigrants and their descendants in Sweden, 1960 to 2007. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 1053–1065.
- Cyriac S, Rajendranath R, Louis AR, Sagar TG (2012) Familial germ cell tumor. *Indian J Hum Genet* 18: 119–121.
- Main KM, Skakkebaek NE, Virtanen HE, Toppari J (2010) Genital anomalies in boys and the environment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 279–289.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meys E, Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16: 972–978.
- 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.
- Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, et al. (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113: 391–395.
- Müller S, Schmid P, Schlatter C (1998) Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environ Toxicol Pharmacol* 5: 257–265.
- McClusky LM, de Jager C, Bornman MS (2007) Stage-related increase in the proportion of apoptotic germ cells and altered frequencies of stages in the spermatogenic cycle following gestational, lactational, and direct exposure of male rats to p-nonylphenol. *Toxicol Sci* 95: 249–256.
- Fucic A, Gamulin M, Ferencic Z, Katic J, Kraye von Krauss M, et al. (2012) Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain. *Environ Health* 11 Suppl 1:S8.
- Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P (2009) Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 117: 1053–1058.
- Chevalier N, Vega A, Bouskine A, Siddeek B, Michiels JF, et al. (2012) GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is over-expressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation. *PLoS One* 7: e34672.
- Li Z, Zhang H, Gibson M, Li J (2012) An evaluation on combination effects of phenolic endocrine disruptors by estrogen receptor binding assay. *Toxicol In Vitro* 26: 769–774.
- Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, et al. (2005) Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$  36, a novel variant of

- human estrogen receptor-alpha 36. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 1023–1027.
18. Tong JS, Zhang QH, Wang ZB, Li S, Yang CR, et al. (2010) ER- $\alpha$ 36, a novel variant of ER- $\alpha$ , mediates estrogen-stimulated proliferation of endometrial carcinoma cells via the PKC $\delta$ /ERK pathway. *PLoS One* 5: e15408.
  19. Wallacides A, Chesnel A, Ajj H, Chillet M, Flament S, et al. (2012) Estrogens promote proliferation of the seminoma-like TCam-2 cell line through a GPER-dependent ERalpha induction. *Mol Cell Endocrinol* 350: 61–71.
  20. Zhang XT, Ding L, Kang LG, Wang ZY (2012) Involvement of ER- $\alpha$ 36, Src, EGFR and STAT5 in the biphasic estrogen signaling of ER-negative breast cancer cells. *Oncol Rep* 27: 2057–2065.
  21. Kang L, Zhang X, Xie Y, Tu Y, Wang D, et al. (2010) Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol Endocrinol* 24: 709–721.
  22. Wang L, Wang ZY (2010) The Wilms' tumor suppressor WT1 induces estrogen-independent growth and anti-estrogen insensitivity in ER-positive breast cancer MCF7 cells. *Oncol Rep* 23: 1109–1117.
  23. Zhang XT, Kang LG, Ding L, Vranic S, Gatalica Z, et al. (2011) A positive feedback loop of ER- $\alpha$ 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* 30: 770–780.
  24. Mizuno Y, Gotoh A, Kamidono S, Kitazawa S (1993). Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2). *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 84: 1211–1218.
  25. Raecker T, Thiele B, Boehme RM, Guenther K (2011) Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere* 82: 1533–1540.
  26. Prossnitz ER, Barton M (2011) The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 7: 715–726.
  27. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, et al. (2006) A variant of estrogen receptor- $\alpha$ 36, hER- $\alpha$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9063–9068.
  28. Long F, Liu H, Hahn C, Sumazin P, Zhang MQ, et al. (2004) Genome-wide prediction and analysis of function-specific transcription factor binding sites. *In Silico Biol* 4: 395–410.
  29. Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL (2000) Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci* 54: 154–167.
  30. Willoughby KN, Sarkar AJ, Boyadjieva NI, Sarkar DK (2005) Neonatally administered tert-octylphenol affects onset of puberty and reproductive development in female rats. *Endocrine* 26: 161–168.
  31. Kilian E, Delpont R, Bornman MS, de Jager C (2007) Simultaneous exposure to low concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane, deltamethrin, nonylphenol and phytoestrogens has negative effects on the reproductive parameters in male Sprague-Dawley rats. *Andrologia* 39: 128–135.
  32. Dobrzyńska MM (2012) Male-mediated F1 effects in mice exposed to nonylphenol or to a combination of X-rays and nonylphenol. *Drug Chem Toxicol* 35: 36–42.
  33. Frassinetti S, Barberio C, Caltavuturo L, Fava F, Di Gioia D (2011) Genotoxicity of 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate mixtures by the use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 mutation assay and use of this text to evaluate the efficiency of biodegradation treatments. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 253–258.
  34. Pupo M, Pisano A, Lappano R, Santolla MF, De Francesco EM, et al. (2012) Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environ Health Perspect* 120: 1177–1182.
  35. Barton M (2012) The membrane estrogen receptor GPER - Clues and questions. *Steroids* 77: 935–942.
  36. Berner C, Aumüller E, Gnauck A, Nestelberger M, Just A, et al. (2010) Epigenetic control of estrogen receptor expression and tumor suppressor genes is modulated by bioactive food compounds. *Ann Nutr Metab* 57: 183–189.
  37. Anway MD, Rekow SS, Skinner MK (2008) Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome. *Genomics* 91: 30–40.
  38. Liao HF, Tai KY, Chen WS, Cheng LC, Ho HN, et al. (2012) Functions of DNA methyltransferase 3-like in germ cells and beyond. *Biol Cell* 104: 571–587.
  39. Sun MY, Yang XX, Xu WW, Yao GY, Pan HZ, et al. (2012) Association of DNMT1 and DNMT3B polymorphisms with breast cancer risk in Han Chinese women from South China. *Genet Mol Res* 11: 4330–4341.
  40. Yang XX, He XQ, Li FX, Wu YS, Gao Y, et al. (2012) Risk-association of DNA methyltransferases polymorphisms with gastric cancer in the southern Chinese population. *Int J Mol Sci* 13: 8364–8378.
  41. Borghese B, Santulli P, Héquet D, Pierre G, de Ziegler D, et al. (2012) Genetic polymorphisms of DNMT3L involved in hypermethylation of chromosomal ends are associated with greater risk of developing ovarian endometriosis. *Am J Pathol* 180: 1781–1786.
  42. Kristensen DG, Mlynarska O, Nielsen JE, Jacobsen GK, Rajpert-De Meys E, et al. (2012) Heterogeneity of chromatin modifications in testicular spermatocytic seminoma point toward an epigenetically unstable phenotype. *Cancer Genet* 205: 425–431.
  43. Okamoto K (2012) Epigenetics: a way to understand the origin and biology of testicular germ cell tumors. *Int J Urol* 19: 504–511.
  44. Ushida H, Kawakami T, Minami K, Chano T, Okabe H, et al. (2012) Methylation profile of DNA repetitive elements in human testicular germ cell tumor. *Mol Carcinog* 51: 711–722.
  45. Beyrouthy MJ, Garner KM, Hever MP, Freemantle SJ, Eastman A, et al. (2009) High DNA methyltransferase 3B expression mediates 5-aza-deoxycytidine hypersensitivity in testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 69: 9360–9366.
  46. Biswal BK, Beyrouthy MJ, Hever-Jardine MP, Armstrong D, Tomlinson CR, et al. (2012) Acute hypersensitivity of pluripotent testicular cancer-derived embryonal carcinoma to low-dose 5-aza deoxycytidine is associated with global DNA Damage-associated p53 activation, anti-pluripotency and DNA demethylation. *PLoS One* 7: e35003.
  47. Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canetti G, et al. (2005) Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4459–4464.
  48. Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF (2009) Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics* 4: 487–499.
  49. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, et al. (2009) MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* 113: 6411–6418.
  50. Xue Q, Lin Z, Cheng YH, Huang CC, Marsh E, et al. (2007) Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod* 77: 681–687.
  51. Wang Y, Yu Q, Cho AH, Rondeau G, Welsh J, et al. (2005) Survey of differentially methylated promoters in prostate cancer cell lines. *Neoplasia* 7: 748–760.
  52. Imura M, Yamashita S, Cai LY, Furuta J, Wakabayashi M, et al. (2006) Methylation and expression analysis of 15 genes and three normally-methylated genes in 13 Ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett* 241: 213–220.
  53. Anway MD, Leathers C, Skinner MK (2006) Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 147: 5515–5523.
  54. Minami K, Chano T, Kawakami T, Ushida H, Kushima R, et al. (2010) DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma. *Clin Cancer Res* 16: 2751–2759.
  55. Bourc'his D, Bestor TH (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431: 96–99.
  56. Chédin F (2011) The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 101: 255–285.
  57. Walton EL, Francastel C, Velasco G (2011) Maintenance of DNA methylation: Dnmt3b joins the dance. *Epigenetics* 6: 1373–1377.
  58. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X (2010) Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics* 2: 657–669.

Figure S1

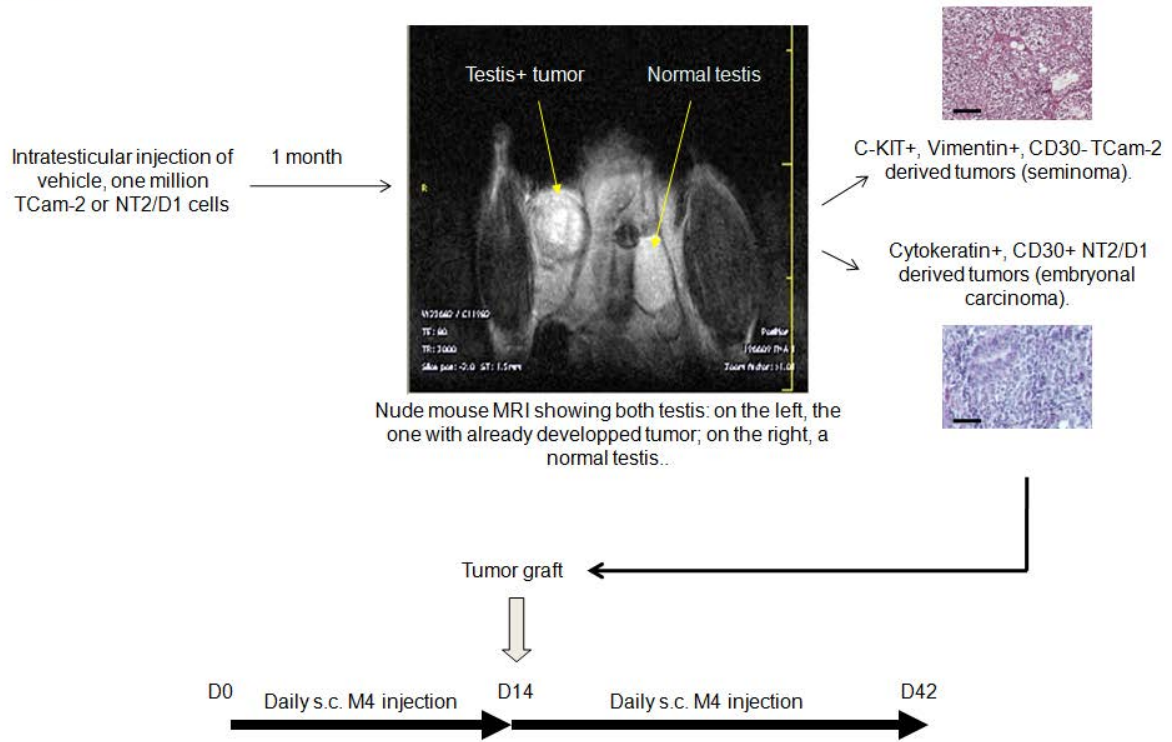


Figure S2

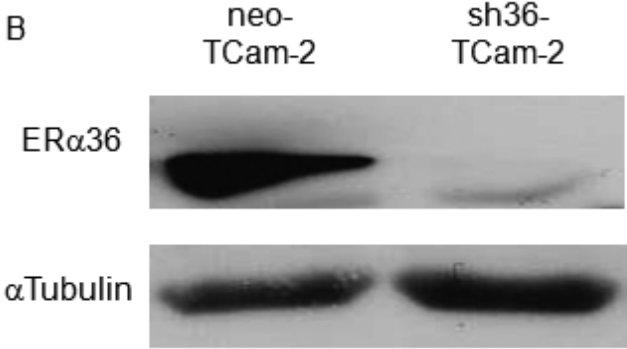
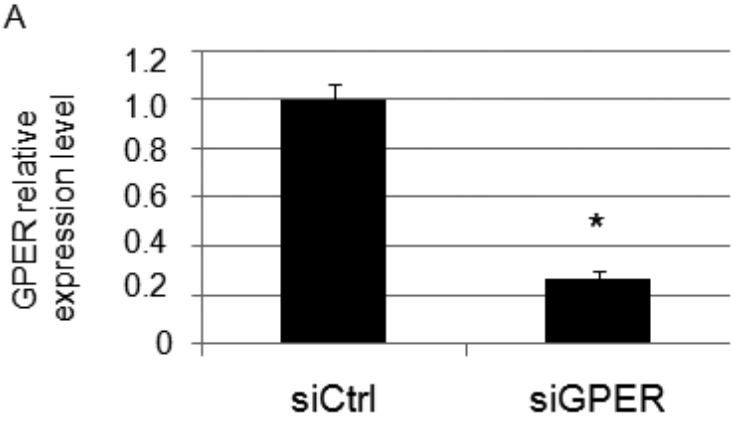
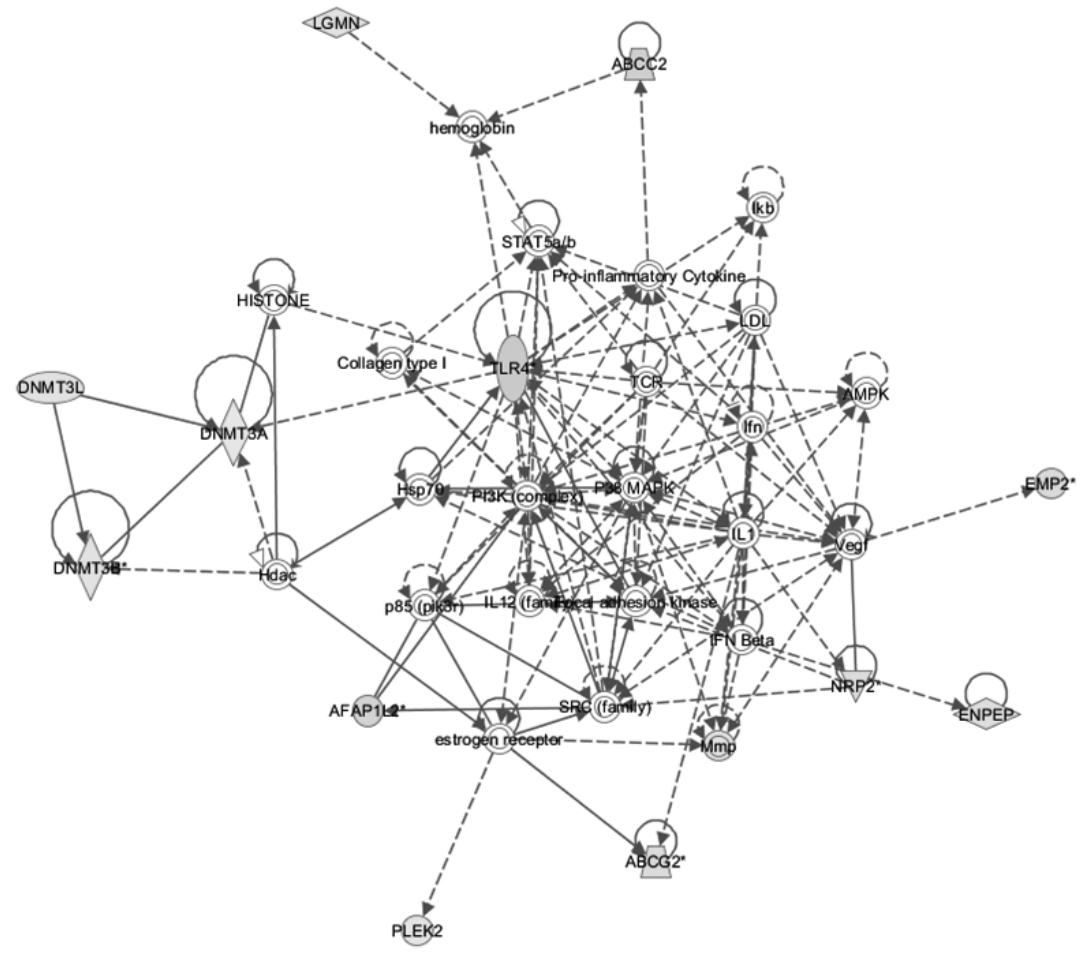


Figure S3



**Table S1:** Primer and siRNA sequences

	Gene	Sequence
PCR primers	RPLPO	Fw 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3'
		Rev 5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3'
	DNMT3A	Fw 5'-CTGGGAGGAAGCGCAAGCAC-3'
		Rev 5'-CTGGGCCATGGATGGGGACT-3'
	DNMT3B	Fw 5'-CCAACAACACGCAACCAGTGG-3'
		Rev 5'-GCTGAGTCGTCAGCTGTGCG-3'
	DNMT3L	Fw 5'-CCATCCCAGATGTCCACGGC-3'
		Rev 5'-CAGAGCCCAGTGCCTGCTG-3'
siRNA duplexes	GPER	Dup.1 5'-GCACCUUCAUGUCGUCUU-3'
		Dup.2 5'-UUGAACACCUCAAUGAGGG-3'
		Dup.3 5'-AAGACUGCUUGCAGGGAGC-3'



**Table S2** : Main results from Ingenuity analysis : top five networks in which M4 regulated genes are involved.

<b>Top networks</b>	<b>Score</b>
	[28]
Cancer , Cellular movement, Tumor morphology	35
Developmental disorder	31
Cellular growth and proliferation	38
Cancer, Tumor morphology, Connective tissue disorders	27
Cell death and survival, Hereditary disorder	27

**Table S3** : Main results from Ingenuity analysis : biological functions in which M4 regulated genes are involved.

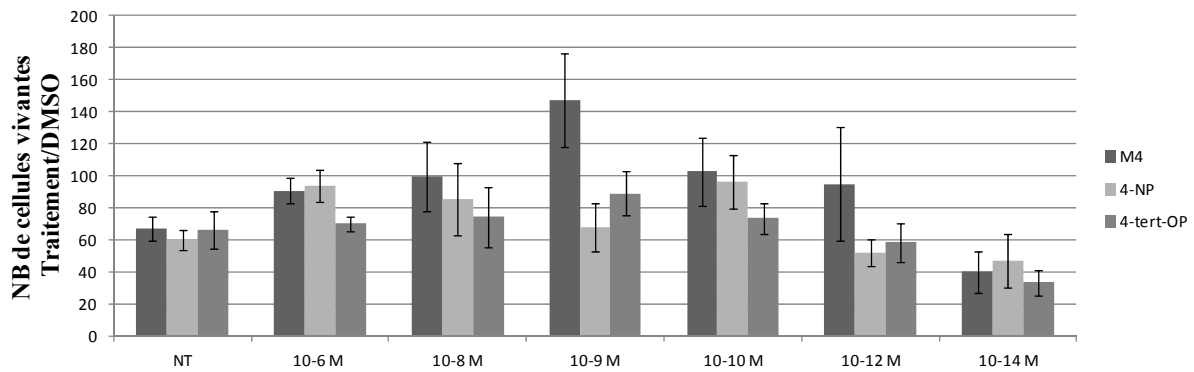
<b>Biological functions</b> (classified by p-value: $6.56E-09 < p\text{-value} < 8.95E-03$ )		<b>Number of genes</b>
<b>Diseases and disorders</b>	Cancer (invasion and development)	79
	Endocrine system disorders	21
	Reproductive system disease	40
<b>Molecular and cellular functions</b>	Cellular growth and proliferation	66
	DNA replication, Recombination and Repair	4
	Gene expression	4
	Cellular movement	28
	Cellular development	30
<b>Physiological System Development and Function</b>	Tumor morphology	26
	Endocrine system development and function	19
	Organ development	51
	Renal and urological system development and function	18

**Table S4** : Main results from Ingenuity analysis: Top five predicted upstream regulators of M4 regulated genes.

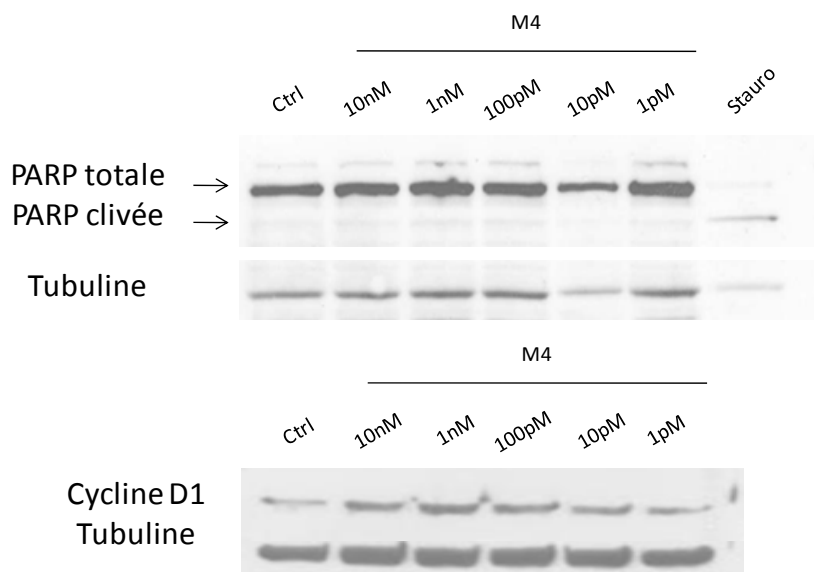
<b>Predicted upstream regulator</b>	<b>P-value of overlap</b>
beta-estradiol	6.01E-08
ERBB2	1.13E-07
ESR1	4.11E-07
dexamethasone	1.20E-06
diethylstilbestrol	1.43E-06

**Table S5:** Top list of the 20 genes deregulated by M4 after 1 hour or 24 hour exposure.

		1h						24h	
Transcript	Gene	p -value	Variation	Transcript	Gene	p -value	Variation		
NM_013940	OR10H1	0,02	10,29	NM_020844	KIAA1456	0,00	6,87		
NM_000569	FCGR3A	0,01	6,85	NM_013940	OR10H1	0,00	5,99		
XM_931923	EBF2	0,00	5,70	BC036192	COL14A1	0,02	5,56		
BC017865	FCGR3A	0,02	4,90	NM_016591	GCNT4	0,03	4,69		
XM_933727	LOC440345	0,01	4,87	BC017865	FCGR3A	0,02	4,06		
XM_931500	LOC643359	0,03	4,54	NM_173663	NY-REN-7	0,01	3,78		
AK125579	N/A	0,01	4,51	BC015413	ROPN1B	0,00	3,77		
BC093880	SERF1A	0,01	4,50	NM_001004693	OR2T10	0,02	3,62		
NM_001004693	OR2T10	0,01	4,41	NM_004770	KCNB2	0,01	3,60		
BC067423	B3GNT3	0,01	4,17	NM_138969	RDHE2	0,02	3,52		
NM_001012966	KLK6	0,04	0,21	BC063118	DIO2	0,01	0,21		
NM_015053	PPFIA4	0,01	0,21	NM_001012966	KLK6	0,00	0,21		
BC063118	DIO2	0,01	0,21	NM_014379	KCNV1	0,01	0,21		
NM_001001936	KIAA1914	0,04	0,20	BC069353	HAS2	0,00	0,20		
BC028739	KCNV1	0,04	0,18	BC109071	HAS2	0,00	0,19		
NM_014379	KCNV1	0,01	0,18	NM_005328	HAS2	0,01	0,18		
BC069353	HAS2	0,00	0,17	NM_153225	RPESP	0,00	0,18		
BC099646	NAALAD2	0,03	0,17	X75299	VIPR1	0,01	0,16		
NM_005328	HAS2	0,01	0,17	BC045606	NID1	0,01	0,15		
BC109071	HAS2	0,00	0,16	NM_004624	VIPR1	0,00	0,15		
BC046645	CCBE1	0,03	0,15	NM_005211	CSF1R	0,03	0,15		
BC045606	NID1	0,00	0,14	NM_003982	SLC7A7	0,03	0,14		
BC038840	NAALAD2	0,05	0,14	BC064424	VIPR1	0,00	0,11		



**Figure 66 : Effet du M4 et de ses composants sur la prolifération des cellules TCam-2 *in vitro*.** Les cellules sont traitées pendant 48h par différentes concentrations du M4 et ses deux composés par rapport aux cellules non traitées utilisées comme témoin. Les cellules sont ensemencées dans une plaque 96 puits et sont sevrées pendant 24 h dans un milieu RPMI 0,5 %. Ensuite, ces cellules sont colorées par le Crystal violet et comptées sous microscope. Les valeurs correspondent à la moyenne +/- s.e.m de 6 expériences indépendantes. (Test de Student).



**Figure 67 : Analyse par Western Blot de l'effet du M4 sur l'expression de la PARP clivée et de la cycline D1.** Les résultats sont obtenus à partir d'échantillons de protéines extraites à partir des cellules TCam-2 traitées pendant 48h par Ctrl (témoin) et M4 à des concentrations différentes. Le tubuline a été utilisée comme protéine de référence, la Staurosporine (Stauro) utilisée comme un témoin positif pour le clivage de PARP.

## **Partie IV : Résultats complémentaires**

### **Etude des effets du mélange M4**

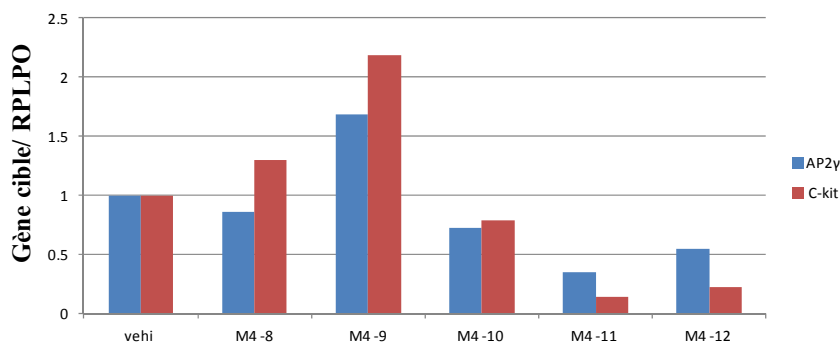
#### **1. Mélange M4**

##### **1.1. Test de prolifération**

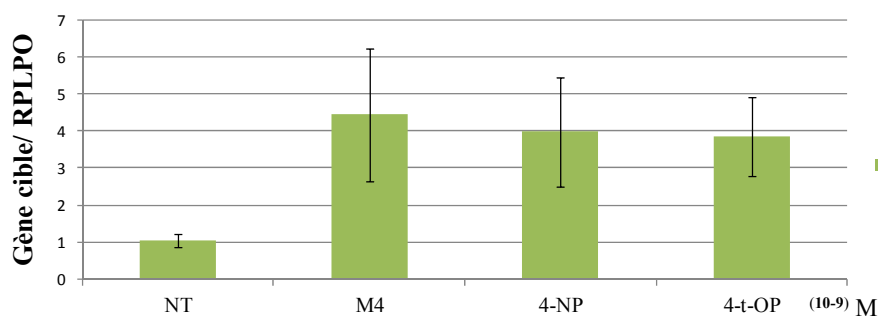
Nous avons mesuré l'effet prolifératif de ce mélange et de ses composés individuels en utilisant plusieurs techniques de mesure de la prolifération *in vitro* parmi lesquelles la coloration au Crystal violet. Les résultats de ce test ont montré que les deux composés du M4 semblent avoir un effet synergique dans leur mélange (Figure 66).

##### **1.2. Analyse biochimique**

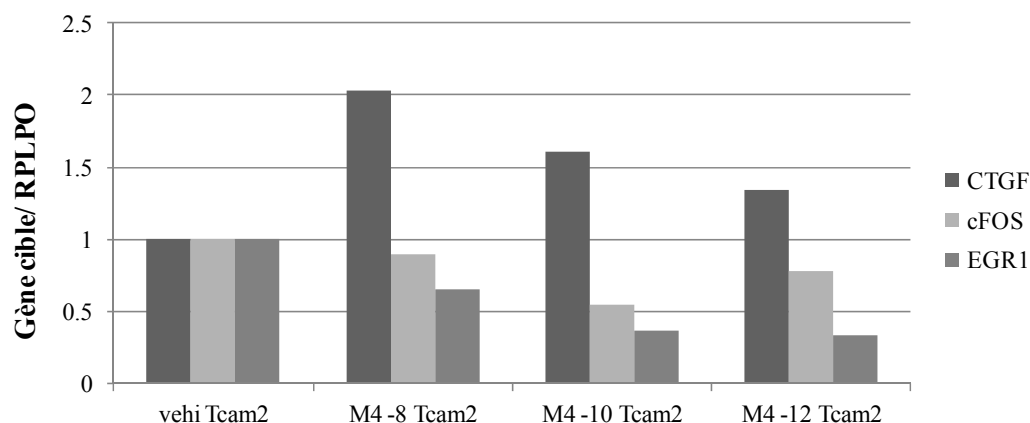
Nous avons également mesuré l'effet du M4 à différentes doses sur l'expression protéique d'un marqueur de l'apoptose (PARP clivée) et d'un marqueur de la prolifération (Cycline D1). Les cellules sont sevrées pendant 24 heures dans le milieu RPMI 0,5 %. Le résultat a montré que M4 n'induit pas le clivage de PARP dans les cellules TCam-2 après 48 heures de traitement. Par contre, M4 induit l'expression de Cycline D1 par rapport au contrôle. Ces résultats suggèrent que M4 a un effet prolifératif/anti-apoptotique dans les cellules séminomateuses TCam-2 (Figure 67).



**Figure 68 : Effet du M4 en dose-réponse sur l'expression de c-Kit et AP2γ.** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules Tcam-2 pendant 24h, cellules non traitées (véhicule), et cellules traitées par M4 à ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  et  $10^{-12}$  M). Les rapports gène d'intérêt/RPLPO sont montrés pour les différentes concentrations de traitements. Le rapport du témoin (Vehi) est amené à 1. Les valeurs correspondent à une expérience.



**Figure 69 : Effet du mélange M4 ( $10^{-9}$  M) et ses composés sur l'expression du gène codant le récepteur ERα36.** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules Tcam-2 non traitées (témoin) ou traitées par le M4 ( $10^{-9}$  M) pendant 24h. Le rapport gène d'intérêt/RPLPO du témoin est ramené à 1. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  s.e.m de 3 expériences indépendantes. (Test de Student).



**Figure 70 : Effet du mélange M4 sur l'expression des gènes précoces qui sont des gènes cibles pour GPER (CTGF, c-fos et EGR1).** Analyses réalisées en PCR en temps réel pour des cellules Tcam-2 traitées par véhicule (non traitée) ou le M4 ( $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  et  $10^{-12}$  M) pendant 1h. Le rapport gène d'intérêt/RPLPO du témoin est ramené à 1. Les valeurs correspondent à une expérience.

### **1.3. Expression génique**

Nous avons également testé l'effet du M4 en dose-réponse sur l'expression des gènes (AP2 $\gamma$  et c-Kit) par PCR en temps réel. Les résultats ont montré que M4 à ( $10^{-9}$  M) induit l'expression de ces gènes dans les cellules TCam-2, par rapport aux cellules non traitées utilisées comme un témoin (Vehicle) (Figure 68).

Nous avons testé l'effet de M4 et ses composés sur l'expression du gène ER $\alpha$ 36, nous avons trouvé que M4 et ses composés ont induit l'expression du gène codant le récepteur ER $\alpha$ 36 à ( $10^{-9}$  M) dans les cellules TCam-2, après 24h de traitement, par rapport aux cellules non traitées (Figure 69).

Nous avons également étudié l'effet du M4 sur l'expression des gènes précoces, décrits comme des gènes cibles pour GPER, les résultats ont montré que M4 après 1h de traitement induit l'expression de CTGF (Figure 70).



## **Discussion**

L'objectif général de notre étude consistait à déterminer le rôle des perturbateurs endocriniens sur la prolifération des cellules séminomateuses TCam-2 et à identifier les voies de signalisation impliquées dans la réponse à ces produits qui ont des effets œstrogénomimétiques. Sur la base de travaux, *in vitro* et *in vivo*, montrant le rôle du récepteur ER $\alpha$ 36 dans l'induction de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, nous avons essayé dans notre étude de déterminer le rôle de ce récepteur dans la progression des tumeurs testiculaires d'origine germinale.

## **1. Les alkyl-phénols (APs) sont-ils impliqués dans l'initiation et/ou la progression des cancers testiculaires ?**

### **1.1. Initiation**

Les xénobiotiques à effet perturbateurs endocriniens peuvent perturber la différenciation sexuelle mâle en interférant avec l'action physiologique des androgènes ou des œstrogènes pendant la vie fœtale et postnatale précoce, par suppression de la synthèse des androgènes fœtaux, en bloquant le récepteur des androgènes, ou en activant le récepteur des œstrogènes (Christiansen et al., 2012).

En créant un déséquilibre de la balance hormonale œstrogène/androgène, en jouant sur la quantité, la production et/ou l'action de ces hormones chez le mâle, ces perturbateurs endocriniens altèrent en effet le programme de développement testiculaire et pourraient conduire à une transformation maligne des CGs (Rouiller-Fabre et al., 2008; Sharpe et Skakkebaek, 1993).

Ainsi, l'exposition prénatale aux PE peut modifier le développement et les fonctions cellulaires en modifiant la programmation cellulaire, l'expression génique, la transcription. Les PE peuvent aussi engendrer des modifications épigénétiques modulant la méthylation de l'ADN et la modification des histones, entraînant des anomalies qui n'apparaîtront qu'aux générations suivantes (effets transgénérationnels) (Nassouri et al., 2012).

Des études épidémiologiques ont suggéré que l'exposition excessive aux xéno-œstrogènes pendant la vie fœtale et/ou néonatale pouvait conduire aux désordres des fonctions de reproduction observées à la naissance et chez l'adulte, y compris le cancer testiculaire (Habert et al., 2006).

En 1993, Sharpe et Skakkebaek ont émis l'hypothèse selon laquelle différentes altérations de la fonction reproductive mâle (y compris le cancer du testicule) pourraient représenter différentes manifestations pathologiques, résultant d'une même exposition aux perturbateurs endocriniens. Cette hypothèse a été confortée par des observations et des études expérimentales.

En effet, les cellules pré-invasives appelées (carcinome in situ, CIS) sont considérées comme les précurseurs des tumeurs testiculaires (TGCTs) excepté pour le séminome spermatocytaire. Ces cellules (CIS) ont pour origine des gonocytes ou cellules germinales primordiales qui ne seraient pas différenciées de façon normale en spermatogonies *in utero* (Skakkebaek et al., 1987).

L'apparition des cellules tumorales du testicule pourrait être dépendante du microenvironnement des cellules somatiques constitué par les cellules de Sertoli, les cellules périvitubulaires et les cellules de Leydig (Jouannet, 2012).

Dans les tubules séminifères testiculaires, la barrière hémato-testiculaire est créée par des cellules de Sertoli adjacentes au compartiment germinal, et les cellules germinales sont en contact avec les cellules de Sertoli qui exercent une variété de fonctions cruciales pour la différenciation des cellules germinales. Le BPA est un composé chimique qui a une activité œstrogénique pouvant notamment induire la réduction de la fonction des cellules de Sertoli dans des modèles *in vivo* (Tabuchi et al., 2002).

Des rapports ont démontré que l'exposition de rats mâles au BPA, *in utero* et pendant la période néonatale, entraîne des effets négatifs sur leurs fonctions de reproduction, en particulier en ce qui concerne à la diminution de la spermatogenèse et de la spermiogenèse. Les observations suggèrent que l'exposition prénatale au BPA chez le rat entraîne des effets néfastes à long terme sur la fertilité à l'âge adulte et que ces effets sont transgénérationnels (Salian et al., 2009).

Il est possible que cette exposition prénatale au BPA dans la génération F0 des parents puisse influencer directement la marque épigénétique de la lignée germinale de F1 qui est mise en place principalement au cours la période embryonnaire 11-15 jpc (Salian et al., 2009).

Chez le rat, l'exposition aux fortes doses de BPA pendant la gestation réduit le niveau de la testostérone plasmatique à la naissance et induit l'expression d'un gène (Raf1), un oncogène

dont la surexpression a été observée fréquemment dans les tumeurs solides (Callans et al., 1995; Thuillier et al., 2009), et qui est prédominant dans les cellules de Leydig au jour 3 postnatal (N'Tumba-Byn et al., 2012).

Le NP a également des propriétés œstrogéniques *in vitro* et *in vivo*, et des effets négatifs sur le développement de l'appareil reproducteur mâle lorsque les animaux sont exposés au NP pendant une période prénatale: réduction de la taille du testicule, diminution la production de sperme, cryptorchidie et réduction de poids des organes reproducteurs (Lee et al., 2003).

Chez le rat, Wu et son équipe ont étudié les effets d'une exposition au NP sur la sécrétion de la testostérone dans les cellules de Leydig. Leurs résultats suggèrent que le NP réduit la libération de testostérone par un effet inhibiteur sur l'activité des enzymes impliquées dans sa synthèse, comme P450scc et StAR (Wu et al., 2010). L'administration du 4-NP à des rats (250 mg/j) pendant 50 jours diminue aussi le niveau de testostérone en inhibant l'activité de l'enzyme P-450c17 (Mathur et D'Cruz, 2011).

De plus, le NP induit l'apoptose de cellules de Sertoli et les cellules germinales, ce qui peut conduire à la réduction de la production de spermatozoïdes (Han et al., 2004). L'hydrophobicité des APs inhiberait le fonctionnement de la pompe calcique (spécifique du réticulum sarcoplasmique), ce qui induit la mort cellulaire des cellules de Sertoli (Chen et al., 2013).

Chez le rat, la consommation de 4-tert-OP dans l'eau peut influencer négativement la fertilité mâle. Des études *in vivo* ont montré que l'administration de l'OP à des femelles gestantes ou à des rats nouveau-nés affecte le système reproducteur chez les deux sexes. Ces effets chez le mâle sont limités mais significatifs quant à la diminution du poids des testicules, et la production quotidienne de spermatozoïdes (Blake et al., 2004).

Cependant, aucun lien direct n'a été fait entre ces anomalies développementales et la transformation néoplasique des cellules germinales *in vitro* ou l'apparition de cellules CIS dans les tubes séminifères des animaux exposés.

En revanche, certains polymorphismes touchant notamment des gènes intervenant dans la régulation de la différenciation des CGs fœtales, du métabolisme hormonal et des xénobiotiques pourraient constituer des facteurs de susceptibilité pour le cancer testiculaire (Jouannet, 2012).

De plus, il a été proposé qu'il y existe une relation entre l'action hormonale et l'établissement du profil de méthylation de l'ADN chez des embryons de mammifères. Les effets maternels de certains xénobiotiques tératogènes pourraient être de perturber la distribution normale de la méthylation de l'ADN dans un embryon en développement, ce qui conduit à des anomalies ou des défauts de développement qui apparaissent dans les générations successives (Skinner et al., 2010).

Suite à l'analyse par *ChIP* à l'ADN dans les cellules cancéreuses TCam-2, nous avons trouvé que le mélange M4 régule négativement l'expression des gènes de la famille DNMT3 qui sont impliqués dans la méthylation de l'ADN.

Les protéines DNMT3 sont impliquées dans le contrôle de la différenciation et la prolifération des CGs néoplasiques (CIS). DNMT3L est nécessaire pour maintenir l'état de repos des cellules progénitrices spermatogonies, qui est cruciale pour le maintien du pool des cellules souches de la lignée germinale. Les conséquences de l'invalidation du DNMT3L (*Dnmt3l-Ko*), suggèrent que ce gène est impliqué dans la répression des rétrotransposons et la création des marques de l'empreinte parentale dans les cellules germinale mâles (Liao et al., 2012, 2014).

Ceci suggère que l'exposition aux APs, dont le mélange M4, pendant la vie fœtale/prénatale peut avoir un rôle dans l'initiation du cancer testiculaire en perturbant le statut épigénétique et donc en favorisant le développement des cellules du testicule.

Etant donné que la lignée germinale est nécessaire pour la transmission de l'information génétique entre les générations, une modification épigénétique permanente sur cette lignée peut entraîner des phénomènes transgénérationnels (Skinner et al., 2010).

Par exemple, les travaux de Salian et son équipe chez le rat ont montré que l'exposition prénatale à des doses environnementales de BPA affecte la lignée germinale mâle, conduisant à des troubles de la fertilité de la descendance F1 et leur effet persiste dans les générations ultérieures F2 et F3 où ces effets sont très significatifs. Ces observations suggèrent que l'exposition prénatale au BPA chez le rat entraîne des effets néfastes à long terme sur la fertilité à l'âge adulte et que ces effets sont transgénérationnels (Salian et al., 2009).

De même, l'étude d'Anway et son équipe *in vivo* sur le rat (sur 4 générations, F0-F4) a montré que l'exposition à la vinclozoline (un PE anti-androgène) peut provoquer une augmentation de l'incidence de cancers, probablement due à des anomalies du statut épigénétique des cellules germinales, et observée de façon transgénérationnelle (Anway et al., 2006).

Nous avons utilisé le mélange M4 constitué de deux composés 4-tert-OP et 4-NP qui ont été mélangés sur la base de leur rapport de concentration réaliste (1 :30) dans la nourriture de Raecker et collègues (Raecker et al., 2011).

Les rongeurs (rat et souris) sont des modèles utilisés dans plusieurs travaux *in vivo*, donc ils pourraient être des modèles intéressants à utiliser pour valider l'hypothèse sur le rôle des alkylphénols en mélange sur l'initiation des cancers testiculaires.

Pour valider cette hypothèse, nous pourrions exposer des femelles gestantes (F0) aux APs tel que M4, et ensuite mesurer leurs effets sur les générations suivantes (F1, F2, F3..), en se focalisant notamment sur l'apparition de cellules germinales néoplasiques en fin de gestation et l'apparition de cancers testiculaires chez l'adulte.

## 1.2. Progression

### 1.2.1. Cancers testiculaires

Dans nos premiers résultats, nous avons montré que l'E2 induit la prolifération des cellules TCam2 *in vitro*, ainsi que la testostérone, qui est un androgène aromatisable. La testostérone agit, en partie, via une voie de signalisation œstrogénique suite à une aromatisation. Donc, les cellules séminomateuses de cancer testiculaire TCam-2, sont considérées comme des cellules hormono-sensibles (Wallacides et al., 2011).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet d'un mélange d'alkylphénols, qui ont des effets œstrogéno-mimétiques, sur la progression tumorale de cancer testiculaire. Nous avons étudié l'effet d'un mélange d'APs (M4) sur la progression tumorale.

Nous avons montré dans nos résultats que le mélange d'alkylphénols œstrogéno-mimétique, (4-tert-OP + 4-NP, M4 à faible dose de  $10^{-9}$  M), induit la prolifération des cellules du cancer testiculaire *in vitro* (TCam-2) et la croissance tumorale chez la souris Nude *in vivo* (NT2/D1).

Le BPA à faible dose induit également la prolifération des cellules du cancer testiculaire humaine. Bouskine et son équipe, ont montré que le BPA à très faibles doses de ( $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  M) stimule la prolifération des cellules séminomateuses JKT-1, via GPER et l'activation de les voies de signalisation non génomiques (PKA et PKG) qui sont associées à la phosphorylation de la protéine CREB (Bouskine et al., 2009).

Dans le testicule humain, le récepteur GPER est faiblement exprimé dans les CGs humaines normales et surexprimé dans les TGCTs. Chez le rat, il est prouvé que les œstrogènes induisent la prolifération des cellules de Sertoli via ER $\alpha$  et ER $\beta$  ainsi que via GPER. Ces trois récepteurs sont exprimés dans le testicule humain (Fietz et al., 2014).

Dans les cellules du cancer testiculaire, TCam2 et NT2/D1, le récepteur non génomique GPER est fortement exprimé (Franco et al., 2011). Nous avons montré que les cellules cancéreuses testiculaires d'origine germinale n'expriment pas le récepteur ER $\alpha$ 66, mais une isoforme tronquée de ce récepteur, ER $\alpha$ 36 (revue dans Wallacides et al., 2011).

### 1.2.2. Autres cancers de l'appareil reproducteur

Plusieurs études ont montré que les alkylphénols jouent plus généralement un rôle dans la progression des tumeurs hormono-dépendantes.

Le BPS (Bisphénol S) a montré des effets œstrogéniques et agit via des voies de signalisation non génomiques dans la lignée GH3/B6/F10 (cellules de l'hypophyse) chez le rat, et conduit à des altérations de réponses (la prolifération cellulaire et la sécrétion de la prolactine PRL) (Viñas et Watson, 2013).

Le BPA agit comme un agent chimique œstrogénique provoquant de nombreuses pathologies, comme le cancer de prostate à faible dose (Skinner et al., 2010).

Des études chez les rongeurs ont montré que l'exposition au BPA pré- ou périnatale est associée avec un poids corporel élevé, une augmentation de cancer du sein et de la prostate, une modification de la fonction de reproduction et des autres effets chroniques sur la santé (Dolinoy et al., 2007).

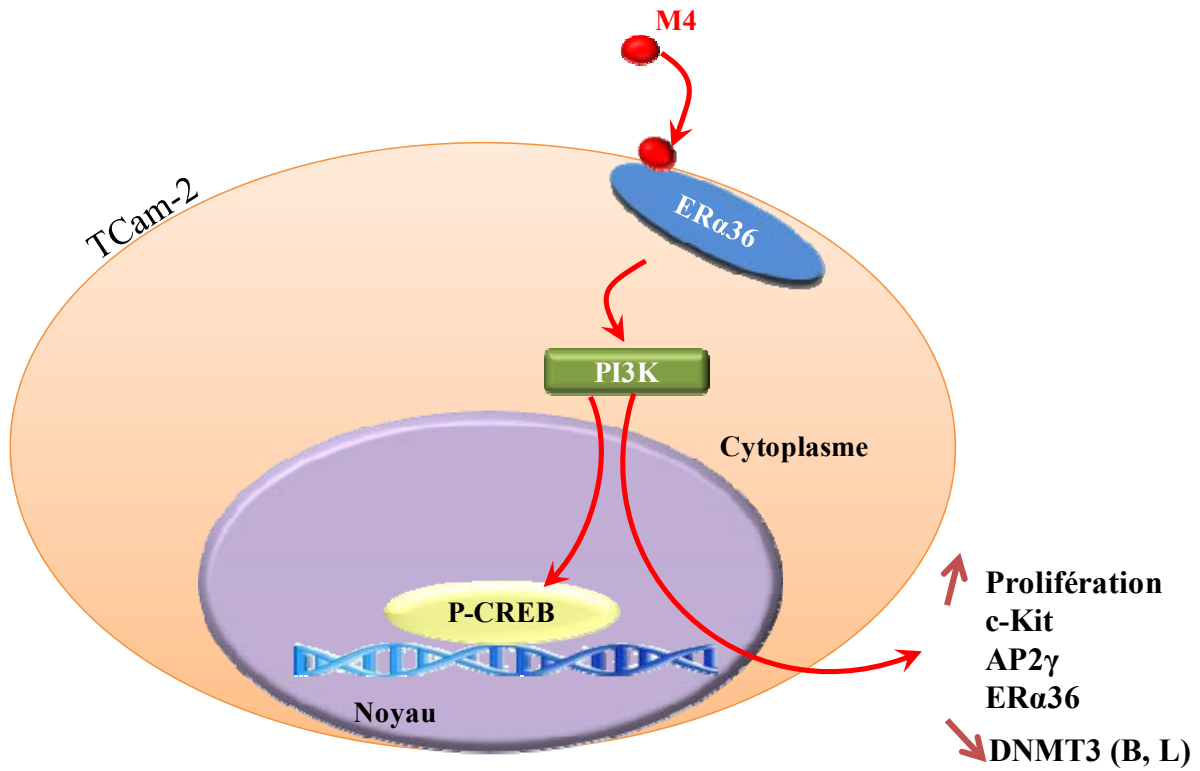
L'exposition au BPA induit l'expression des gènes cibles impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la migration via le récepteur GPER, dans les cellules de cancer du sein SKBR3 et les cellules CAFs (Cancer-Associated Fibroblasts) (Pupo et al., 2012).

Pour les cellules du cancer ovarien chez l'homme (BG-1), l'E2 à ( $10^{-9}$  M), le 4-NP et 4-tert-OP à ( $10^{-6}$  M) peuvent médier la prolifération de cellules cancéreuses (Park et al., 2011a).

Chez la souris, l'administration par la voie orale du 4-NP augmente significativement le taux de cancer mammaire. Les souris traitées par 4-NP pendant 32 semaines ont montrée une augmentation dans les incidences de cancer du sein et des métastases, et une diminution de la latence (Acevedo et al., 2005).

Lee et Choi ont montré dans des modèles cellulaires ou des souris xéno greffées, que l'exposition au 4-tert-OP entraîne une croissance importante des tumeurs mammaires par rapport au contrôle négatif. Le 4-tert-OP à ( $10^{-6}$  M) induit la prolifération des cellules du cancer de sein MCF-7 (Lee et Choi, 2013).





**Figure 70 : Représentation schématique de la voie de signalisation impliquée dans la réponse au mélange d'AP (M4), œstrogéno-mimétique, dans les cellules de cancer du testicule, TCam-2.**

Les données épidémiologiques, sur les PE, sont difficiles d'interprétation à cause des différences de sensibilité hétérogénéités interindividuelles aux PE et leur action non monotonique, des multiples interactions entre les différents agents environnementaux (effets additifs et/ou synergiques et/ou antagonistes), du rôle de la fenêtre d'exposition et un temps de latence pouvant conduire à des effets transgénérationnels (Nassouri et al., 2012).

## **2. Quel est le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans la sensibilité aux œstrogènes et aux œstrogénomimétiques ?**

A.Wallacides a montré dans sa thèse que le récepteur ER $\alpha$ 36 est impliqué dans la réponse à l'E2 dans les cellules TCam-2. Des voies de signalisation œstrogéniques non génomiques sont déclenchées via un récepteur membranaire GPER et médiées par ER $\alpha$ 36 provoquant la prolifération cellulaire.

Nous avons ensuite cherché à déterminer le rôle d'ER $\alpha$ 36 dans l'effet d'un mélange d'APs, qui a un effet œstrogénomimétique sur les cellules du cancer testiculaire.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence l'implication d'ER $\alpha$ 36 dans la réponse au mélange d'AP (M4). L'exposition au M4 déclenche la voie de signalisation PI3K-dépendante, et en aval la phosphorylation de la protéine CREB. L'effet du M4 conduit à la répression de l'expression des DNMT3 et induit la prolifération des cellules du cancer testiculaire.

Nous avons trouvé que, dans les cellules du cancer de testicule sh36-TCam2 qui n'expriment pas le récepteur ER $\alpha$ 36, que M4 n'induit plus la prolifération cellules ni la phosphorylation de CREB, ainsi ni la répression de l'expression des gènes DNMT3, ce qui suggère un rôle d'ER $\alpha$ 36 dans l'effet du M4.

En utilisant la Wortmanine (un inhibiteur de PI3K) nous avons trouvé que la phosphorylation de CREB n'est plus induite et que l'expression de DNMT3 n'est plus réprimée après une exposition au M4. De plus, dans les cellules NT2/D1, le M4 diminue l'expression des gènes DNMT3, alors qu'en présence le Wortmanin cette diminution n'est plus observée (Figure 71).

Les DNMTs sont importantes pour la régulation de la méthylation de l'ADN, et plusieurs études ont montré que cette méthylation de l'ADN a un rôle clé dans l'initiation de la tumeur testiculaire, la progression et la résistance à la chimiothérapie. Ces effets pourraient conduire à une expression génique aberrante qui peut être maintenue transgénérationnellement.

Donc, le mélange d'AP pourrait altérer la reprogrammation épigénétique des cellules germinale au cours leur développement fœtal et périnatal, pourrait aussi déclencher des perturbations à long terme de l'expression des gènes, ce qui pourrait être un facteur de risque pour les cancers hormono-dépendants en général.

Le récepteur ER $\alpha$ 36 est aussi exprimé dans les deux types cellulaires de cancer du sein, les cellules ER-positive qui expriment le récepteur ER $\alpha$ 66 comme les cellules MCF-7 ainsi que les cellules ER-négative qui n'expriment pas l'ER $\alpha$ 66 comme les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 (Li et al., 2013b; Rao et al., 2011).

Zhang et son équipe ont montré que l'E2 stimule *in vitro* la prolifération des lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MDA-MB-436 qui expriment le récepteur ER $\alpha$ 36, mais n'expriment pas le récepteur ER $\alpha$ 66, en activant la voie MAPK/ERK via un rétrocontrôle positif entre EGFR et ER $\alpha$ 36 (Zhang et al., 2011).

Les travaux de Li et al. ont montré que la surexpression d'ER $\alpha$ 36 dans les cellules MCF-7 diminue la sensibilité de ces cellules au TAM. La surexpression stimule aussi la prolifération cellulaire, ainsi que la capacité de migration et d'invasion de ces cellules *in vitro*, propriétés associées aux tumeurs malignes (Li et al., 2013a).

En revanche, la diminution de l'expression d'ER $\alpha$ 36 dans les cellules MCF-7/TAM *in vitro* conduit à une réduction du niveau de la prolifération cellulaire avec une diminution de la capacité de migration et d'invasion, ainsi qu'une diminution de l'expression d'EGFR. ER $\alpha$ 36 médie l'activité agoniste pour les molécules anti-œstrogènes, TAM et ICI 182,780 (Zhang et al., 2012b).

Ces données indiquent qu'ER $\alpha$ 36 peut être utilisé comme un facteur de pronostic chez les patients atteints de cancer du sein sous traitement par le TAM. Il peut être également considéré comme une cible thérapeutique potentielle dans les tumeurs qui ont acquis une résistance au TAM (Li et al., 2013a).

L'ensemble de ces données pourrait fournir un rationnel pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les patientes qui présentent une résistance aux anti-œstrogènes en ciblant ER $\alpha$ 36 (Zhang et Wang, 2013).

D'autre part, l'utilisation du TAM à long terme est associée à une incidence accrue de cancer de l'endomètre. L'étude de Lin et son équipe a montré que le TAM et l'E2 induisent la prolifération des cellules de cancer de l'endomètre (Hec1A) via ER $\alpha$ 36 qui induit, à son tour, l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/Akt (Lin et al., 2010).

L'expression d'ER $\alpha$ 36 dans les tissus de cancer de l'endomètre est significativement plus faible que dans les tissus endométriaux normaux, et son profil d'expression diffère de celui d'ER classique, ce qui montre qu'ER $\alpha$ 36 peut être aussi une cible moléculaire dans le cancer de l'endomètre. Ceci indique qu'ER $\alpha$ 36 peut être un biomarqueur important pour le diagnostic, le pronostic et le choix de traitement de cancer de l'endomètre (Sun et al., 2013).

Donc dans les différents types de cancer hormono-sensibles comme le cancer du sein, de l'endomètre et le cancer testiculaire, le récepteur ER $\alpha$ 36 peut déclencher des signalisations, en association avec d'autres récepteurs comme EGFR et GPER, pour finalement contrôler la prolifération et la migration des cellules cancéreuses.

Ces données bibliographiques ainsi que celles obtenues dans le cadre de cette thèse montrent que le récepteur ER $\alpha$ 36 peut jouer un rôle dans la pathologie cancéreuse, dont le cancer testiculaire, en déclenchant des signalisations mitogéniques et pro-métastatiques, et conduire à une résistance aux traitements par les anti-œstrogènes. Le criblage d'antagoniste/s spécifique/s pour ce récepteur serait nécessaire pour le traitement des tumeurs hormono-sensibles exprimant ER $\alpha$ 36.

## **Bibliographie**

## A

---

- Acevedo, R., Parnell, P.G., Villanueva, H., Chapman, L.M., Gimenez, T., Gray, S.L., and Baldwin, W.S. (2005). The contribution of hepatic steroid metabolism to serum estradiol and estriol concentrations in nonylphenol treated MMTVneu mice and its potential effects on breast cancer incidence and latency. *J. Appl. Toxicol. JAT* 25, 339–353.
- Ademollo, N., Ferrara, F., Delise, M., Fabietti, F., and Funari, E. (2008). Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environ. Int.* 34, 984–987.
- Ahel, M. (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res.* 28, 1143–1152.
- Aikawa, H., Koyama, S., Matsuda, M., Nakahashi, K., Akazome, Y., and Mori, T. (2004). Relief effect of vitamin A on the decreased motility of sperm and the increased incidence of malformed sperm in mice exposed neonatally to bisphenol A. *Cell Tissue Res.* 315, 119–124.
- Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Musti, A.M., Andò, S., et al. (2007). G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 67, 1859–1866.
- Almstrup, K., Nielsen, J.E., Hansen, M.A., Tanaka, M., Skakkebaek, N.E., and Leffers, H. (2004). Analysis of cell-type-specific gene expression during mouse spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 70, 1751–1761.
- Almstrup, K., Ottesen, A.M., Sonne, S.B., Hoei-Hansen, C.E., Leffers, H., Rajpert-De Meyts, E., and Skakkebaek, N.E. (2005). Genomic and gene expression signature of the pre-invasive testicular carcinoma in situ. *Cell Tissue Res.* 322, 159–165.
- Almstrup, K., Nielsen, J.E., Mlynarska, O., Jansen, M.T., Jørgensen, A., Skakkebaek, N.E., and Rajpert-De Meyts, E. (2010). Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Br. J. Cancer* 103, 1269–1276.
- Alves, M.G., Rato, L., Carvalho, R.A., Moreira, P.I., Socorro, S., and Oliveira, P.F. (2013). Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 777–793.
- Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M.M., and Page, D.C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14976–14980.
- Anway, M.D., Leathers, C., and Skinner, M.K. (2006). Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 147, 5515–5523.
- Arai, E., Nakagawa, T., Wakai-Ushijima, S., Fujimoto, H., and Kanai, Y. (2012). DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. *Histopathology* 60, E12–E18.

Arnal, J.-F., Fontaine, C., Abot, A., Valera, M.-C., Laurell, H., Gourdy, P., and Lenfant, F. (2013). Lessons from the dissection of the activation functions (AF-1 and AF-2) of the estrogen receptor alpha in vivo. *Steroids* 78, 576–582.

Arnold, S.J., Maretto, S., Islam, A., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2006). Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 296, 104–118.

Ascenzi, P., Bocedi, A., and Marino, M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol. Aspects Med.* 27, 299–402.

Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S., and Koupparis, M.A. (2012). Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Toxicol. Lett.* 210, 141–154.

Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F., and Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.* 332, 281–285.

## **B**

---

Baltus, A.E., Menke, D.B., Hu, Y.-C., Goodheart, M.L., Carpenter, A.E., de Rooij, D.G., and Page, D.C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat. Genet.* 38, 1430–1434.

Barton, M. (2012). Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions. *Steroids* 77, 935–942.

Baudat, F., and de Massy, B. (2004). [SPO11: an activity that promotes DNA breaks required for meiosis]. *Médecine Sci. MS* 20, 213–218.

Becue, A., and Nguyen, R. (2005). Etude de l'analyse des Alkylphénols (INERIS).

Beiki, O., Granath, F., Allebeck, P., Akre, O., and Moradi, T. (2010). Subtype-specific risk of testicular tumors among immigrants and their descendants in Sweden, 1960 to 2007. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 19, 1053–1065.

Best, D., Sahlender, D.A., Walther, N., Peden, A.A., and Adams, I.R. (2008). Sdmgl1 is a conserved transmembrane protein associated with germ cell sex determination and germline-soma interactions in mice. *Dev. Camb. Engl.* 135, 1415–1425.

Binder-Foucard, F., Belot, A., Delafosse, P., Remontet, L., Woronoff, A.-S., and Bossard, N. (2013). Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012.

Blake, C.A., Boockfor, F.R., Nair-Menon, J.U., Millette, C.F., Raychoudhury, S.S., and McCoy, G.L. (2004). Effects of 4-tert-octylphenol given in drinking water for 4 months on the male reproductive system of Fischer 344 rats. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 18, 43–51.

Boisen, K.A., Kaleva, M., Main, K.M., Virtanen, H.E., Haavisto, A.-M., Schmidt, I.M., Chellakooty, M., Damgaard, I.N., Mau, C., Reunanen, M., et al. (2004). Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* 363, 1264–1269.

Bologa, C.G., Revankar, C.M., Young, S.M., Edwards, B.S., Arterburn, J.B., Kiselyov, A.S., Parker, M.A., Tkachenko, S.E., Savchuck, N.P., Sklar, L.A., et al. (2006). Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat. Chem. Biol.* *2*, 207–212.

Bonefeld-Jørgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M.V., and Vinggaard, A.M. (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ. Health Perspect.* *115 Suppl 1*, 69–76.

Boockfor, F.R., and Blake, C.A. (1997). Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. *Biol. Reprod.* *57*, 267–277.

Bosetti, C., Bertuccio, P., Chatenoud, L., Negri, E., La Vecchia, C., and Levi, F. (2011). Trends in mortality from urologic cancers in Europe, 1970-2008. *Eur. Urol.* *60*, 1–15.

Bouskine, A., Nebout, M., Brücker-Davis, F., Benahmed, M., and Fenichel, P. (2009). Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ. Health Perspect.* *117*, 1053–1058.

Bowles, J., and Koopman, P. (2012). Precious Cargo: Regulation of Sex-Specific Germ Cell Development in Mice. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.*

Bowles, J., Feng, C.-W., Spiller, C., Davidson, T.-L., Jackson, A., and Koopman, P. (2010). FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. *Dev. Cell* *19*, 440–449.

Braun, J.M., Yolton, K., Dietrich, K.N., Hornung, R., Ye, X., Calafat, A.M., and Lanphear, B.P. (2009). Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ. Health Perspect.* *117*, 1945–1952.

Bromer, J.G., Zhou, Y., Taylor, M.B., Doherty, L., and Taylor, H.S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *24*, 2273–2280.

## C

---

Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J., and Needham, L.L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* *113*, 391–395.

Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J.A., and Needham, L.L. (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* *116*, 39–44.

Callans, L.S., Naama, H., Khandelwal, M., Plotkin, R., and Jardines, L. (1995). Raf-1 protein expression in human breast cancer cells. *Ann. Surg. Oncol.* *2*, 38–42.



- Camparo, P. (2011). Tumeurs germinales: données histo-pathologiques. *Corresp. En Onco-Urol.* 2, 70–77.
- Camparo, P., and Houlgatte, A. (2008). Classification des tumeurs testiculaires. *EMC - Urol.* 1, 1–9.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., and Skakkebaek, N.E. (1995). Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 7, 137–139.
- Carmeci, C., Thompson, D.A., Ring, H.Z., Francke, U., and 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.
- Carreau, S., Silandre, D., Bourguiba, S., Hamden, K., Said, L., Lambard, S., Galeraud-Denis, I., and Delalande, C. (2007). Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 40, 761–768.
- Carreau, S., Wolczynski, S., and Galeraud-Denis, I. (2010). Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 1571–1579.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., and Delalande, C. (2012). Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Adv. Med. Sci.* 1–6.
- Cenni, null, and Picard, null (1999). Ligand-independent Activation of Steroid Receptors: New Roles for Old Players. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 10, 41–46.
- Chaudhri, R.A., Olivares-Navarrete, R., Cuenca, N., Hadadi, A., Boyan, B.D., and Schwartz, Z. (2012). Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor- $\alpha$ 36 (ER $\alpha$ 36). *J. Biol. Chem.* 287, 7169–7181.
- Chen, M., Tang, R., Fu, G., Xu, B., Zhu, P., Qiao, S., Chen, X., Xu, B., Qin, Y., Lu, C., et al. (2013). Association of exposure to phenols and idiopathic male infertility. *J. Hazard. Mater.* 250-251, 115–121.
- Cheville, J.C. (1999). Classification and pathology of testicular germ cell and sex cord-stromal tumors. *Urol. Clin. North Am.* 26, 595–609.
- Chia, V.M., Quraishi, S.M., Devesa, S.S., Purdue, M.P., Cook, M.B., and McGlynn, K.A. (2010). International trends in the incidence of testicular cancer, 1973-2002. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 19, 1151–1159.
- Chieffi, P., and Chieffi, S. (2013). Molecular biomarkers as potential targets for therapeutic strategies in human testicular germ cell tumors: An overview. *J. Cell. Physiol.* 228, 1641–1646.
- Christiansen, S., Scholze, M., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M., Axelstad, M., Kortenkamp, A., and Hass, U. (2009). Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environ. Health Perspect.* 117, 1839–1846.

Christiansen, S., Kortenkamp, A., Axelstad, M., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P.R., Faust, M., Lichtensteiger, W., Schlumpf, M., Burdorf, A., et al. (2012). Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int. J. Androl.* *35*, 303–316.

Colin, A., Bach, C., Rosin, C., Munoz, J.-F., and Dauchy, X. (2014). Is drinking water a major route of human exposure to alkylphenol and bisphenol contaminants in France? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *66*, 86–99.

De Coster, S., and van Larebeke, N. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J. Environ. Public Health* *2012*, 713696.

Czene, K., Lichtenstein, P., and Hemminki, K. (2002). Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int. J. Cancer* *99*, 260–266.

## D

---

Daidoji, T., Inoue, H., Kato, S., and Yokota, H. (2003). Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *31*, 993–998.

Dalgaard, M.D., Weinhold, N., Edsgård, D., Silver, J.D., Pers, T.H., Nielsen, J.E., Jørgensen, N., Juul, A., Gerds, T.A., Giwercman, A., et al. (2012). A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *J. Med. Genet.* *49*, 58–65.

Dang, V.H., Nguyen, T.H., Lee, G.-S., Choi, K.-C., and Jeung, E.-B. (2009). In vitro exposure to xenoestrogens induces growth hormone transcription and release via estrogen receptor-dependent pathways in rat pituitary GH3 cells. *Steroids* *74*, 707–714.

Davis-Dao, C.A., Siegmund, K.D., Vandenberg, D.J., Skinner, E.C., Coetzee, G.A., Thomas, D.C., Pike, M.C., and Cortessis, V.K. (2011). Heterogenous effect of androgen receptor CAG tract length on testicular germ cell tumor risk: shorter repeats associated with seminoma but not other histologic types. *Carcinogenesis* *32*, 1238–1243.

Deegan, B.J., Bhat, V., Seldeen, K.L., McDonald, C.B., and Farooq, A. (2011). Genetic variations within the ERE motif modulate plasticity and energetics of binding of DNA to the ER $\alpha$  nuclear receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* *507*, 262–270.

Dennis, M.K., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W.K., Alcon, S.N., Nayak, T.K., Bologna, C.G., Leitao, A., Brailoiu, E., Deliu, E., et al. (2009). In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 421–427.

Dolinoy, D.C., Huang, D., and Jirtle, R.L. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13056–13061.

Dudley, B., Palumbo, C., Nalepka, J., and Molyneaux, K. (2010). BMP signaling controls formation of a primordial germ cell niche within the early genital ridges. *Dev. Biol.* *343*, 84–93.

Durand, X., Rigaud, J., Avances, C., Camparo, P., Culine, S., Iborra, F., Mottet, N., Sèbe, P., and Soulié, M. (2010). [Recommendations Onco-Urology 2010: Germ cell testicular tumors.]. *Prog. En Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol. 20 Suppl 4*, S297–S309.

## E

---

Eckert, D., Nettersheim, D., Heukamp, L.C., Kitazawa, S., Biermann, K., and Schorle, H. (2008). TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture. *Cell Tissue Res. 331*, 529–538.

Etique, N., Flament, S., Lecomte, J., and Grillier-Vuissoz, I. (2007). Ethanol-induced ligand-independent activation of ER $\alpha$  mediated by cyclic AMP/PKA signaling pathway: an in vitro study on MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Oncol. 31*, 1509–1518.

Ewen, K.A., and Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol. Cell. Endocrinol. 323*, 76–93.

## F

---

Ferguson, L., and Agoulnik, A.I. (2013). Testicular cancer and cryptorchidism. *Front. Endocrinol. 4*, 32.

Ferlin, A., Pengo, M., Pizzol, D., Carraro, U., Frigo, A.C., and Foresta, C. (2012). Variants in KITLG predispose to testicular germ cell cancer independently from spermatogenic function. *Endocr. Relat. Cancer 19*, 101–108.

Fietz, D., Ratzenböck, C., Hartmann, K., Raabe, O., Kliesch, S., Weidner, W., Klug, J., and Bergmann, M. (2014). Expression pattern of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. *Histochem. Cell Biol.*

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., and Frackelton, A.R. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md 14*, 1649–1660.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton, A.R., Jr, and 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. Baltim. Md 16*, 70–84.

Franco, R., Boscia, F., Gigantino, V., Marra, L., Esposito, F., Ferrara, D., Pariante, P., Botti, G., Caraglia, M., Minucci, S., et al. (2011). GPR30 is overexpressed in post-puberal testicular germ cell tumors. *Cancer Biol. Ther. 11*, 609–613.

Fu, Z., Deng, H., Wang, X., Yang, X., Wang, Z., and Liu, L. (2013). Involvement of ER- $\alpha$ 36 in the malignant growth of gastric carcinoma cells is associated with GRP94 overexpression. *Histopathology 63*, 325–333.

Fucic, A., Gamulin, M., Ferencic, Z., Katic, J., Kraymer von Krauss, M., Bartonova, A., and Merlo, D.F. (2012). Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain. *Environ. Health* 11, S8.

## G

---

Gao, F., Ma, X., Ostmann, A.B., and Das, S.K. (2011). GPR30 activation opposes estrogen-dependent uterine growth via inhibition of stromal ERK1/2 and estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) phosphorylation signals. *Endocrinology* 152, 1434–1447.

Garolla, A., Ferlin, A., Vinanzi, C., Roverato, A., Sotti, G., Artibani, W., and Foresta, C. (2005). Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 645–655.

Van de Geijn, G.-J.M., Hersmus, R., and Looijenga, L.H.J. (2009). Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 87, 96–113.

Gibson, D.A., and Saunders, P.T.K. (2012). Estrogen dependent signaling in reproductive tissues - a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348, 361–372.

Glaze, G.M. (1984). Diethylstilbestrol exposure in utero: review of literature. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 83, 435–438.

Goda, Y., Kobayashi, A., Fujimoto, S., Toyoda, Y., Miyagawa, K.-I., Ike, M., and Fujita, M. (2004). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of alkylphenol polyethoxylates and their biodegradation products. *Water Res.* 38, 4323–4330.

Godmann, M., Lambrot, R., and Kimmins, S. (2009). The dynamic epigenetic program in male germ cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. *Microsc. Res. Tech.* 72, 603–619.

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134–139.

Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., and Raecker, T. (2002). Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1676–1680.

Guerquin, M.-J., Duquenne, C., Lahaye, J.-B., Tourpin, S., Habert, R., and Livera, G. (2010). New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Dev. Biol.* 346, 320–330.

## H

---

Habert, R., Delbes, G., Duquenne, C., Livera, G., and Levacher, C. (2006). [Effects of estrogens on the development of the testis during fetal and neonatal life]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 34, 970–977.

Han, X.D., Tu, Z.G., Gong, Y., Shen, S.N., Wang, X.Y., Kang, L.N., Hou, Y.Y., and Chen, J.X. (2004). The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 19, 215–221.

Hassan, H.C., Cullen, I.M., Casey, R.G., and Rogers, E. (2008). Gynaecomastia: an endocrine manifestation of testicular cancer. *Andrologia* 40, 152–157.

Hauschild, M., and Theintz, G. (2008). Le développement de la fonction testiculaire. *Paediatrica* 19, 51–55.

Heaney, J.D., Lam, M.-Y.J., Michelson, M.V., and Nadeau, J.H. (2008). Loss of the transmembrane but not the soluble kit ligand isoform increases testicular germ cell tumor susceptibility in mice. *Cancer Res.* 68, 5193–5197.

Hernández, A.F., Parrón, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcón, R., and López-Guarnido, O. (2012). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology*.

Hoei-Hansen, C.E., Nielsen, J.E., Almstrup, K., Hansen, M.A., Skakkebaek, N.E., Rajpert-DeMeyts, E., and Leffers, H. (2004). Identification of genes differentially expressed in testes containing carcinoma in situ. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 423–431.

Houlgatte, A., and Bauduceau, O. (2005). [Testicular germ-cell tumour: diagnosis and treatment]. *Ann. Urol.* 39, 159–169.

Hunter, D., Anand-Ivell, R., Danner, S., and Ivell, R. (2012). Models of in vitro spermatogenesis. *Spermatogenesis* 2, 32–43.

## I

---

Ichiyanagi, T., Ichiyanagi, K., Miyake, M., and Sasaki, H. (2013). Accumulation and loss of asymmetric non-CpG methylation during male germ-cell development. *Nucleic Acids Res.* 41, 738–745.

## J

---

Jameson, S.A., Lin, Y.-T., and Capel, B. (2012). Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Dev. Biol.* 370, 24–32.

Jean, K., Benmarhnia, T., Lefevre, J., Roche, H., Cicolella, A., and Deshayes, C. (2012). Endocrine disruptors and biodiversity - WWF France (WWF France).

Joffe, M. (2001). Are problems with male reproductive health caused by endocrine disruption? *Occup. Environ. Med.* 58, 281–287; quiz 287–288, 260.

De Jong, J., Stoop, H., Gillis, A.J.M., Hersmus, R., van Gurp, R.J.H.L.M., van de Geijn, G.-J.M., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Schneider, D.T., Sherlock, J.K., et al. (2008). Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes. Chromosomes Cancer* 47, 185–196.

Jouannet, P. (2012). Le cancer du testicule : facteurs de risque génétiques et environnementaux. *Andrologie* 22, 10–19.

## K

---

- Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., and Saitou, M. (2013). Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J.* *32*, 340–353.
- Kanetsky, P.A., Mitra, N., Vardhanabhuti, S., Li, M., Vaughn, D.J., Letrero, R., Ciosek, S.L., Doody, D.R., Smith, L.M., Weaver, J., et al. (2009). Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nat. Genet.* *41*, 811–815.
- Kanetsky, P.A., Mitra, N., Vardhanabhuti, S., Vaughn, D.J., Li, M., Ciosek, S.L., Letrero, R., D'Andrea, K., Vaddi, M., Doody, D.R., et al. (2011). A second independent locus within DMRT1 is associated with testicular germ cell tumor susceptibility. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 3109–3117.
- Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., and Wang, Z.-Y. (2010). Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *24*, 709–721.
- Kierszenbaum, A.L., and Tres, L.L. (2001). Primordial germ cell-somatic cell partnership: a balancing cell signaling act. *Mol. Reprod. Dev.* *60*, 277–280.
- Kochukov, M.Y., Jeng, Y.-J., and Watson, C.S. (2009). Alkylphenol xenoestrogens with varying carbon chain lengths differentially and potently activate signaling and functional responses in GH3/B6/F10 somatomammatropes. *Environ. Health Perspect.* *117*, 723–730.
- Kos, M., Reid, G., Denger, S., and Gannon, F. (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *15*, 2057–2063.
- Kos, M., Denger, S., Reid, G., and Gannon, F. (2002). Upstream open reading frames regulate the translation of the multiple mRNA variants of the estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* *277*, 37131–37138.
- Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., and Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2474–2479.
- Kratz, C.P., Mai, P.L., and Greene, M.H. (2010). Familial testicular germ cell tumours. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *24*, 503–513.
- Kristensen, D.M., Sonne, S.B., Ottesen, A.M., Perrett, R.M., Nielsen, J.E., Almstrup, K., Skakkebaek, N.E., Leffers, H., and Rajpert-De Meyts, E. (2008). Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol. Cell. Endocrinol.* *288*, 111–118.
- Kristiansen, W., Haugen, T.B., Witczak, O., Andersen, J.M., Fosså, S.D., and Aschim, E.L. (2011). CYP1A1, CYP3A5 and CYP3A7 polymorphisms and testicular cancer susceptibility. *Int. J. Androl.* *34*, 77–83.
- Kurimoto, K., Yamaji, M., Seki, Y., and Saitou, M. (2008). Specification of the germ cell lineage in mice: a process orchestrated by the PR-domain proteins, Blimp1 and Prdm14. *Cell Cycle Georget. Tex* *7*, 3514–3518.

## L

---

- Lagos-Cabré, R., and Moreno, R.D. (2012). Contribution of environmental pollutants to male infertility: A working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biol. Res.* *45*, 5–14.
- Lau, Y.-F.C., Li, Y., and Kido, T. (2009). Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *87*, 114–122.
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., and Hogan, B.L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* *13*, 424–436.
- Lee, H.-R., and Choi, K.-C. (2013). 4-tert-Octylphenol stimulates the expression of cathepsins in human breast cancer cells and xenografted breast tumors of a mouse model via an estrogen receptor-mediated signaling pathway. *Toxicology* *304*, 13–20.
- Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.-Y., Ahn, R.S., and Lee, K. (2003). Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *75*, 40–46.
- Lee, L.M.J., Cao, J., Deng, H., Chen, P., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2008). ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. *Anticancer Res.* *28*, 479–483.
- Lemarié, E., Diot, P., Magro, P., and de Muret, A. (2005). Tumeurs médiastinales d'origine embryonnaire. *EMC - Pneumol.* *2*, 105–125.
- Li, G., Zhang, J., Jin, K., He, K., Zheng, Y., Xu, X., Wang, H., Wang, H., Li, Z., Yu, X., et al. (2013a). Estrogen receptor- $\alpha$ 36 is involved in development of acquired tamoxifen resistance via regulating the growth status switch in breast cancer cells. *Mol. Oncol.* *7*, 611–624.
- Li, Q., Sun, H., Zou, J., Ge, C., Yu, K., Cao, Y., and Hong, Q. (2013b). Increased expression of estrogen receptor  $\alpha$ -36 by breast cancer oncogene IKK $\epsilon$  promotes growth of ER-negative breast cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *31*, 833–841.
- Li, Z., Zhang, H., Gibson, M., and Li, J. (2012). An evaluation on combination effects of phenolic endocrine disruptors by estrogen receptor binding assay. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *26*, 769–774.
- Liao, H.-F., Tai, K.-Y., Chen, W.S.-C., Cheng, L.C.W., Ho, H.-N., and Lin, S.-P. (2012). Functions of DNA methyltransferase 3-like in germ cells and beyond. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *104*, 571–587.
- Liao, H.-F., Chen, W.S.C., Chen, Y.-H., Kao, T.-H., Tseng, Y.-T., Lee, C.-Y., Chiu, Y.-C., Lee, P.-L., Lin, Q.-J., Ching, Y.-H., et al. (2014). DNMT3L promotes quiescence in postnatal spermatogonial progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 2402–2413.
- Lin, S.-L., Yan, L.-Y., Zhang, X.-T., Yuan, J., Li, M., Qiao, J., Wang, Z.-Y., and Sun, Q.-Y. (2010). ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS One* *5*, e9013.

Lind, G.E., Skotheim, R.I., Fraga, M.F., Abeler, V.M., Esteller, M., and Lothe, R.A. (2006). Novel epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1). *J. Pathol.* *210*, 441–449.

Lopez-Espinosa, M.J., Freire, C., Arrebola, J.P., Navea, N., Taoufik, J., Fernandez, M.F., Ballesteros, O., Prada, R., and Olea, N. (2009). Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere* *76*, 847–852.

Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., and Torrents, A. (2004). Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate. *J. Agric. Food Chem.* *52*, 2016–2020.

## M

---

Machev, N., Fuhrmann, G., and Viville, S. (2004). [Ontogenesis of primordial germ cells]. *Médecine Sci.* *MS 20*, 1091–1095.

MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P., and Petkovich, M. (2007). Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology* *148*, 4560–4567.

Maggiolini, M., and Picard, D. (2010). The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J. Endocrinol.* *204*, 105–114.

Maguire, R.J. (1999). REVIEW OF THE PERSISTENCE OF NONYLPHENOL AND NONYLPHENOL ETHOXYLATES IN AQUATIC ENVIRONMENTS. *Water Qual. Res. J. Can.* *34*, 37–78.

Mahfoudi, A., Roulet, E., Dauvois, S., Parker, M.G., and Wahli, W. (1995). Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4206–4210.

Majumdar, S.S., and Bhattacharya, I. (2013). Genomic and post-genomic leads toward regulation of spermatogenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*

Mannuel, H.D., Mitikiri, N., Khan, M., and Hussain, A. (2012). Testicular germ cell tumors: biology and clinical update. *Curr. Opin. Oncol.* *24*, 266–271.

Marques-Pinto, A., and Carvalho, D. (2013). Human infertility: are endocrine disruptors to blame? *Endocr. Connect.* *2*, R15–R29.

Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* *19*, 2783–2810.

Mathur, P.P., and D’Cruz, S.C. (2011). The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian J. Androl.* *13*, 585–591.

Matsui, Y., and Okamura, D. (2005). Mechanisms of germ-cell specification in mouse embryos. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *27*, 136–143.

McAdam, E.J., Bagnall, J.P., Soares, A., Koh, Y.K.K., Chiu, T.Y., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., and Cartmell, E. (2011). Fate of alkylphenolic compounds during activated sludge treatment: impact of loading and organic composition. *Environ. Sci. Technol.* *45*, 248–254.



McClusky, L.M., de Jager, C., and Bornman, M.S. (2007). Stage-related increase in the proportion of apoptotic germ cells and altered frequencies of stages in the spermatogenic cycle following gestational, lactational, and direct exposure of male rats to p-nonylphenol. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *95*, 249–256.

McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* *262*, 1–15.

Van Meeuwen, J.A., Ter Burg, W., Piersma, A.H., van den Berg, M., and Sanderson, J.T. (2007). Mixture effects of estrogenic compounds on proliferation and pS2 expression of MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *45*, 2319–2330.

Mohamed, G.H., Gelfond, J.A.L., Nicolas, M.M., Brand, T.C., Sarvis, J.A., Leach, R.J., and Johnson-Pais, T.L. (2012). Genomic characterization of testis cancer: association of alterations with outcome of clinical stage 1 mixed germ cell nonseminomatous germ cell tumor of the testis. *Urology* *80*, 485.e1–e5.

Møller, H., and Skakkebaek, N.E. (1999). Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *BMJ* *318*, 559–562.

Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., et al. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 4279–4286.

Morohashi, K., Baba, T., and Tanaka, M. (2013). Steroid hormones and the development of reproductive organs. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* *7*, 61–79.

Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* *392*, 49–53.

Müller, S., Schmid, P., and Schlatter, C. (1998). Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *5*, 257–265.

## N

---

Nakaki, F., and Saitou, M. (2014). PRDM14: a unique regulator for pluripotency and epigenetic reprogramming. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 289–298.

Nakamura, T., and Miki, T. (2010). Recent strategy for the management of advanced testicular cancer. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* *17*, 148–157.

Nassouri, A.S., Archambeaud, F., and Desailoud, R. (2012). [Endocrine disruptors: echoes of congress of Endocrinology in 2012]. *Ann. Endocrinol.* *73 Suppl 1*, S36–S44.

Nathanson, K.L., Kanetsky, P.A., Hawes, R., Vaughn, D.J., Letrero, R., Tucker, K., Friedlander, M., Phillips, K.-A., Hogg, D., Jewett, M.A.S., et al. (2005). The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am. J. Hum. Genet.* *77*, 1034–1043.

Nelson, E.R., and Habibi, H.R. (2013). Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*

Netto, G.J., Nakai, Y., Nakayama, M., Jadallah, S., Toubaji, A., Nonomura, N., Albadine, R., Hicks, J.L., Epstein, J.I., Yegnasubramanian, S., et al. (2008). Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 21, 1337–1344.

Niles, K.M., Chan, D., La Salle, S., Oakes, C.C., and Trasler, J.M. (2011). Critical period of nonpromoter DNA methylation acquisition during prenatal male germ cell development. *PLoS One* 6, e24156.

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., et al. (2012). Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function. *PLoS ONE* 7.

## O

---

O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., and Simpson, E.R. (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 22, 289–318.

Ogawa, S., Chester, A.E., Hewitt, S.C., Walker, V.R., Gustafsson, J.A., Smithies, O., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (2000). Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14737–14741.

Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., et al. (2005). *Blimp1* is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436, 207–213.

Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., and Saitou, M. (2009). A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 137, 571–584.

Omisano, O.A., Biermann, K., Hartmann, S., Heukamp, L.C., Sonnack, V., Hild, A., Brehm, R., Bergmann, M., Weidner, W., and Steger, K. (2007). DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochem. Cell Biol.* 127, 175–181.

## P

---

Park, M.-A., Hwang, K.-A., Lee, H.-R., Yi, B.-R., and Choi, K.-C. (2011a). Cell Growth of BG-1 Ovarian Cancer Cells was Promoted by 4-Tert-octylphenol and 4-Nonylphenol via Downregulation of TGF- $\beta$  Receptor 2 and Upregulation of c-myc. *Toxicol. Res.* 27, 253–259.

Park, Y.-J., Mohamed, E.-S.A., Kwon, W.-S., You, Y.-A., Ryu, B.-Y., and Pang, M.-G. (2011b). Xenoestrogenic chemicals effectively alter sperm functional behavior in mice. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 32, 418–424.

Parma, P., and Radi, O. (2012). Molecular mechanisms of sexual development. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 6, 7–17.

Paty, A.-C., Gomes do Espirito Santo, E., and Suzan, F. (2011). INVS | Étude des cryptorchidies et hypospadias opérés en France de 1998 à 2008 chez le petit garçon de moins

de 7 ans à partir des données du Programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI).

Pearce, S.T., Liu, H., and Jordan, V.C. (2003). Modulation of estrogen receptor alpha function and stability by tamoxifen and a critical amino acid (Asp-538) in helix 12. *J. Biol. Chem.* 278, 7630–7638.

Pelekanou, V., Notas, G., Kampa, M., Tsenteliero, E., Radojicic, J., Leclercq, G., Castanas, E., and Stathopoulos, E.N. (2012). ER $\alpha$ 36, a new variant of the ER $\alpha$  is expressed in triple negative breast carcinomas and has a specific transcriptomic signature in breast cancer cell lines. *Steroids* 77, 928–934.

Perrard, M.-H., Grenet, C., Prisant, N., Geoffroy-Siraudin, C., Segretain, D., Guichaoua, M.-R., Pointis, G., and Durand, P. (2010). Analyse de la spermatogenèse *ex vivo*. *Médecine/sciences* 26, 305–310.

Phillips, B.T., Gassei, K., and Orwig, K.E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 1663–1678.

Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol. Cell* 1, 697–705.

Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101–1105.

Prossnitz, E.R., and Barton, M. (2014). Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol. Cell. Endocrinol.* 389, 71–83.

Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M.F., De Francesco, E.M., Abonante, S., Rosano, C., and Maggiolini, M. (2012). Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environ. Health Perspect.* 120, 1177–1182.

## Q

---

Qin, Y., Chen, M., Wu, W., Xu, B., Tang, R., Chen, X., Du, G., Lu, C., Meeker, J.D., Zhou, Z., et al. (2013). Interactions between urinary 4-tert-octylphenol levels and metabolism enzyme gene variants on idiopathic male infertility. *PloS One* 8, e59398.

## R

---

Raecker, T., Thiele, B., Boehme, R.M., and Guenther, K. (2011). Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere* 82, 1533–1540.

Rago, V., Romeo, F., Giordano, F., Maggiolini, M., and Carpino, A. (2011). Identification of the estrogen receptor GPER in neoplastic and non-neoplastic human testes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* RBE 9, 135.

- Rajpert-De Meyts, E. (2006). Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum. Reprod. Update* *12*, 303–323.
- Rajpert-de Meyts, E., and Hoei-Hansen, C.E. (2007). From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1120*, 168–180.
- Rajpert-De Meyts, E., and Skakkebaek, N.E. (1994). Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int. J. Androl.* *17*, 85–92.
- Rao, J., Jiang, X., Wang, Y., and Chen, B. (2011). Advances in the understanding of the structure and function of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *127*, 231–237.
- Rapley, E.A., and Nathanson, K.L. (2010). Predisposition alleles for Testicular Germ Cell Tumour. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 225–230.
- Rapley, E.A., Turnbull, C., Al Olama, A.A., Dermitzakis, E.T., Linger, R., Huddart, R.A., Renwick, A., Hughes, D., Hines, S., Seal, S., et al. (2009). A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nat. Genet.* *41*, 807–810.
- Raychoudhury, S.S., Blake, C.A., and Millette, C.F. (1999). Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *157*, 192–202.
- Rébillard, X., Grosclaude, P., Leone, N., Velten, M., Coureau, G., Villers, A., Irani, J., Leuret, T., Rigaud, J., Pfister, C., et al. (2013). [Incidence and mortality of urological cancers in 2012 in France]. *Prog. En Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol.* *23 Suppl 2*, S57–S65.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* *307*, 1625–1630.
- Rochester, J.R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* *42*, 132–155.
- Rosen, A., Jayram, G., Drazer, M., and Eggener, S.E. (2011). Global trends in testicular cancer incidence and mortality. *Eur. Urol.* *60*, 374–379.
- Roth, M.Y., Lin, K., Amory, J.K., Matsumoto, A.M., Anawalt, B.D., Snyder, C.N., Kalthorn, T.F., Bremner, W.J., and Page, S.T. (2010). Serum LH correlates highly with intratesticular steroid levels in normal men. *J. Androl.* *31*, 138–145.
- Rouiller-Fabre, V., Lambrot, R., Muczynski, V., Coffigny, H., Lécureuil, C., Pairault, C., Bakalska, M., Courtot, A.-M., Frydman, R., and Habert, R. (2008). [Development and regulations of testicular functions in the human foetus]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* *36*, 898–907.
- Ruan, S.-Q., Wang, Z.-H., Wang, S.-W., Fu, Z.-X., Xu, K.-L., Li, D.-B., and Zhang, S.-Z. (2012). Heregulin- $\beta$ 1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3 breast cancer cells via ErbB2/ErbB3-MAPK/ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., and Wylie, C. (2006). Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Dev. Camb. Engl.* 133, 4861–4869.

## S

---

Saga, Y. (2010). Function of Nanos2 in the male germ cell lineage in mice. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 3815–3822.

Saitou, M., and Yamaji, M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.

Saitou, M., Payer, B., O'Carroll, D., Ohinata, Y., and Surani, M.A. (2005). Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 1736–1740.

Salian, S., Doshi, T., and Vanage, G. (2009). Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci.* 85, 742–752.

Saunders, P.T., Sharpe, R.M., Williams, K., Macpherson, S., Urquart, H., Irvine, D.S., and Millar, M.R. (2001). Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 227–236.

Savchuk, I., Söder, O., and Svechnikov, K. (2013). Mouse leydig cells with different androgen production potential are resistant to estrogenic stimuli but responsive to bisphenol a which attenuates testosterone metabolism. *PloS One* 8, e71722.

Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M., and Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* 110, A703–A707.

Sharpe, R.M., and Irvine, D.S. (2004). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 328, 447–451.

Sharpe, R.M., and Skakkebaek, N.E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341, 1392–1395.

Shin, Y.S., and Kim, H.J. (2013). Current management of testicular cancer. *Korean J. Urol.* 54, 2–10.

Siegfried, K.R. (2010). In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. *J. Fish Biol.* 76, 1879–1902.

Skakkebaek, N.E. (1972). Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 2, 516–517.

Skakkebaek, N.E., Berthelsen, J.G., Giwercman, A., and Müller, J. (1987). Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int. J. Androl.* 10, 19–28.

- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., and Main, K.M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *16*, 972–978.
- Skinner, M.K., Manikkam, M., and Guerrero-Bosagna, C. (2010). Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *21*, 214–222.
- Smiraglia, D.J., Szymanska, J., Kraggerud, S.M., Lothe, R.A., Peltomäki, P., and Plass, C. (2002). Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene* *21*, 3909–3916.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., and Lester, J.N. (2008). Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* *34*, 1033–1049.
- Soltysik, K., and Czekaj, P. (2013). Membrane estrogen receptors - is it an alternative way of estrogen action? *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* *64*, 129–142.
- Sonne, S.B., Almstrup, K., Dalgaard, M., Juncker, A.S., Edsgard, D., Ruban, L., Harrison, N.J., Schwager, C., Abdollahi, A., Huber, P.E., et al. (2009). Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res.* *69*, 5241–5250.
- Spiller, C.M., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2010). Retinoblastoma 1 protein modulates XY germ cell entry into G1/G0 arrest during fetal development in mice. *Biol. Reprod.* *82*, 433–443.
- Srivastava, D.P., and Evans, P.D. (2013). GPER 1: trials and tribulations of a Membrane Oestrogen Receptor. *J. Neuroendocrinol.*
- Storgaard, L., Bonde, J.P., and Olsen, J. (2006). Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* *21*, 4–15.
- Strohsnitter, W.C., Noller, K.L., Hoover, R.N., Robboy, S.J., Palmer, J.R., Titus-Ernstoff, L., Kaufman, R.H., Adam, E., Herbst, A.L., and Hatch, E.E. (2001). Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 545–551.
- Sultan, C., Gaspari, L., Kalfa, N., and Paris, F. (2011). Perturbateurs endocriniens environnementaux et maladies endocriniennes de l'enfant. *Médecine Longévité* *3*, 108–110.
- Sun, L., Wang, J., Zhang, L., Li, X., and Shen, D. (2013). Expression of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor in endometrial carcinoma and its clinical significance. *Gynecol. Obstet. Invest.* *75*, 68–72.
- Susiarjo, M., Sasson, I., Mesaros, C., and Bartolomei, M.S. (2013). Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLoS Genet.* *9*, e1003401.
- Suzuki, A., and Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev.* *22*, 430–435.

Svingen, T., Wilhelm, D., Combes, A.N., Hosking, B., Harley, V.R., Sinclair, A.H., and Koopman, P. (2009). Ex vivo magnetofection: a novel strategy for the study of gene function in mouse organogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 956–964.

Swerdlow, A.J., De Stavola, B.L., Swanwick, M.A., and Maconochie, N.E. (1997). Risks of breast and testicular cancers in young adult twins in England and Wales: evidence on prenatal and genetic aetiology. *Lancet* 350, 1723–1728.

## T

---

Tabuchi, Y., Zhao, Q.-L., and Kondo, T. (2002). DNA microarray analysis of differentially expressed genes responsive to bisphenol A, an alkylphenol derivative, in an in vitro mouse Sertoli cell model. *Jpn. J. Pharmacol.* 89, 413–416.

Taimi, M., Helvig, C., Wisniewski, J., Ramshaw, H., White, J., Amad, M., Korczak, B., and Petkovich, M. (2004). A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 279, 77–85.

Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., and vom Saal, F.S. (2009). Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2079–2096.

Thibault, C., and Levasseur, M.-C. (2001). *La Reproduction chez les mammifères et l'homme* (Editions Quae).

Thibault, C., Beaumont, A., and Levasseur, M.-C. (1998). *La reproduction des vertébrés* (Masson).

Thomas, P., and 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.

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., and Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624–632.

Thorup, J., McLachlan, R., Cortes, D., Nation, T.R., Balic, A., Southwell, B.R., and Hutson, J.M. (2010). What is new in cryptorchidism and hypospadias--a critical review on the testicular dysgenesis hypothesis. *J. Pediatr. Surg.* 45, 2074–2086.

Thuillier, R., Manku, G., Wang, Y., and 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.

Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jr, Jégou, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., et al. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104 Suppl 4, 741–803.

Toppari, J., Kaleva, M., and Virtanen, H.E. (2001). Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum. Reprod. Update* 7, 282–286.

Toyama, Y., and Yuasa, S. (2004). Effects of neonatal administration of 17beta-estradiol, beta-estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis. *Reprod. Toxicol. Elmsford N 19*, 181–188.

Trautmann, E., Guerquin, M.-J., Duquenne, C., Lahaye, J.-B., Habert, R., and Livera, G. (2008). Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. *Cell Cycle Georget. Tex 7*, 656–664.

Turnbull, C., Rapley, E.A., Seal, S., Pernet, D., Renwick, A., Hughes, D., Ricketts, M., Linger, R., Nsengimana, J., Deloukas, P., et al. (2010). Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer. *Nat. Genet. 42*, 604–607.

## V

---

Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., and Soto, A.M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr. Rev. 30*, 75–95.

Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F.J.R., and Schoenfelder, G. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect. 118*, 1055–1070.

Vega, A., Baptissart, M., Caira, F., Brugnion, F., Lobaccaro, J.-M.A., and Volle, D.H. (2012). Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front. Endocrinol. 3*, 150.

Verhoeven, R.H.A., Gondos, A., Janssen-Heijnen, M.L.G., Saum, K.U., Brewster, D.H., Holleczeck, B., Crocetti, E., Rosso, S., Hakulinen, T., Aareleid, T., et al. (2013). Testicular cancer in Europe and the USA: survival still rising among older patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 24*, 508–513.

Verville, K. (2009). Testicular cancer (Infobase Publishing).

Viñas, R., and Watson, C.S. (2013). Mixtures of xenoestrogens disrupt estradiol-induced non-genomic signaling and downstream functions in pituitary cells. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source 12*, 26.

Vitali, M., Ensabella, F., Stella, D., and Guidotti, M. (2004). Nonylphenols in freshwaters of the hydrologic system of an Italian district: association with human activities and evaluation of human exposure. *Chemosphere 57*, 1637–1647.

Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., and Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol. 15*, 1281–1287.

## W

---

Wallacides, A., Chesnel, A., Ajj, H., Chillet, M., Flament, S., and Dumond, H. (2011). Estrogens promote proliferation of the seminoma-like TCam-2 cell line through a GPER-dependent ER $\alpha$ 36 induction. *Mol. Cell. Endocrinol.*



- Wang, J., Li, J., Fang, R., Xie, S., Wang, L., and Xu, C. (2012). Expression of ER $\alpha$ 36 in gastric cancer samples and their matched normal tissues. *Oncol. Lett.* 3, 172–175.
- Wang, X., Deng, H., Zou, F., Fu, Z., Chen, Y., Wang, Z., and Liu, L. (2013). ER- $\alpha$ 36-mediated gastric cancer cell proliferation via the c-Src pathway. *Oncol. Lett.* 6, 329–335.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and 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.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2006). A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9063–9068.
- Weaver, J.R., Susiarjo, M., and Bartolomei, M.S. (2009). Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 20, 532–543.
- Western, P. (2009). Foetal germ cells: striking the balance between pluripotency and differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 393–409.
- Willoughby, K.N., Sarkar, A.J., Boyadjieva, N.I., and Sarkar, D.K. (2005). Neonatally administered tert-octylphenol affects onset of puberty and reproductive development in female rats. *Endocrine* 26, 161–168.
- Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N., and Watson, C.S. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor- $\alpha$ -mediated Ca<sup>2+</sup> fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 431–439.
- Wu, J.-J., Wang, K.-L., Wang, S.-W., Hwang, G.-S., Mao, I.-F., Chen, M.-L., and Wang, P.S. (2010). Differential effects of nonylphenol on testosterone secretion in rat Leydig cells. *Toxicology* 268, 1–7.

## X

---

- Xie, X., Lü, W., and Chen, X. (2013). Binding of the endocrine disruptors 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenol to human serum albumin. *J. Hazard. Mater.* 248-249, 347–354.

## Y

---

- Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat. Genet.* 40, 1016–1022.
- Yaman, R., and Grandjean, V. (2006). Timing of entry of meiosis depends on a mark generated by DNA methyltransferase 3a in testis. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 390–397.
- Ying, Y., and Zhao, G.Q. (2001). Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev. Biol.* 232, 484–492.

Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., and Zhao, G.Q. (2000). Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 14, 1053–1063.

Yuan, L., Liu, J.G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., and Höög, C. (2000). The murine *SCP3* gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell* 5, 73–83.

## Z

---

Zárate, S., Jaita, G., Ferraris, J., Eijo, G., Magri, M.L., Pisera, D., and Seilicovich, A. (2012). Estrogens induce expression of membrane-associated estrogen receptor  $\alpha$  isoforms in lactotropes. *PloS One* 7, e41299.

Zeravik, J., Skryjová, K., Nevoranková, Z., and Fránek, M. (2004). Development of direct ELISA for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol. *Anal. Chem.* 76, 1021–1027.

Zhang, X., and Wang, Z.-Y. (2013). Estrogen receptor- $\alpha$  variant, ER- $\alpha$ 36, is involved in tamoxifen resistance and estrogen hypersensitivity. *Endocrinology* 154, 1990–1998.

Zhang, J., Li, G., Li, Z., Yu, X., Zheng, Y., Jin, K., Wang, H., Gong, Y., Sun, X., Teng, X., et al. (2012a). Estrogen-independent effects of ER- $\alpha$ 36 in ER-negative breast cancer. *Steroids* 77, 666–673.

Zhang, X., Ding, L., Kang, L., and Wang, Z.-Y. (2012b). Estrogen receptor-alpha 36 mediates mitogenic antiestrogen signaling in ER-negative breast cancer cells. *PloS One* 7, e30174.

Zhang, X.T., Kang, L.G., Ding, L., Vranic, S., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2011). A positive feedback loop of ER- $\alpha$ 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* 30, 770–780.

Zhang, X.-T., Ding, L., Kang, L.-G., and Wang, Z.-Y. (2012c). Involvement of ER- $\alpha$ 36, Src, EGFR and STAT5 in the biphasic estrogen signaling of ER-negative breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 27, 2057–2065.

Zhao, C., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J.-A. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl. Recept. Signal.* 6, e003.

Zou, Y., Ding, L., Coleman, M., and Wang, Z. (2009). Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) suppresses expression of its variant ER-alpha 36. *FEBS Lett.* 583, 1368–1374.