UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Ecole Doctorale Biologie-Santé-Environnement

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

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

par **Angelina WALLACIDES**

Influence de l'acide rétinoïque et des stéroïdes sexuels sur l'entrée en méiose des cellules germinales et la prolifération des cellules de tumeurs testiculaires d'origine germinale

Soutenance prévue le 18 Octobre 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mr Gabriel LIVERA (Maître de Conférences, Université Paris VII)

Mr Eric PAILHOUX (Directeur de Recherches, INRA, Jouy en Josas)

Examinateurs :

Mme Denyse BAGREL (Professeur, Université P. Verlaine, Metz)

Mme Martine DUTERQUE-COQUILLAUD (Chargée de Recherches, CNRS, Lille)

Mlle Hélène DUMOND (Maître de Conférences, Co-directrice de thèse, UHP)

Mr Stéphane FLAMENT (Professeur, Directeur de thèse, UHP)

EA 4421 Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie (SIGRETO)

Faculté des Sciences et Technologies – Boulevard des Aiguillettes BP239 – 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy - France

Remerciements

Ce travail a été mené à l'Université Henri Poincaré au sein du laboratoire SiGReTO. Avant d'exposer mes travaux qui ont abouti à la rédaction de ce mémoire, je tiens à remercier le gouvernement syrien de m'avoir accordé une bourse ainsi que les personnes qui ont permis cette réalisation.

Monsieur le professeur Stéphane Flament a dirigé mes travaux de recherche avec la conviction et l'enthousiasme communicatif dont il sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle que d'avoir pu bénéficier de ses conseils.

Madame Hélène Dumond, la route de la thèse aurait été dure sans tes conseils, tes corrections et tes directives. Tu étais toujours présente pour m'écouter, pour réfléchir avec moi, et pour m'assurer toute aide possible.

J'exprime tous mes remerciements aux membres du jury, Mr Gabriel Livera et Mr Eric Pailhoux, rapporteurs, Mme Denyse Bagrel, et Mme Martine Duterque-Coquillaud, examinatrices, pour avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse et de juger mon travail.

Je voudrais tout particulièrement remercier Monsieur Amand Chesnel pour avoir accepté de relire ce manuscrit. J'apprécie les commentaires constructifs qu'il m'a fournis.

Ce travail n'aurait pu être fini sans l'aide technique de Mme Martine Chillet. 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 que nous avons passés ensemble durant ces années.

Je remercie particulièrement Sarra pour ton soutien moral, ton aide pour faire mes papiers administratives, pour les sorties cinéma et resto, pour nos discussions et surtout pour ma progression en langue française.

Merci également aux personnes que j'ai eu de la chance de côtoyer durant ces années de Doctorat : Chiai, Julie, Imane, Christelle et Hussein.

Je remercie aussi mes parents et mon compagnon Hamid, pour leur patience et leur soutien.

Liste des Abréviations

17βHSD	17β-hydroxystéroïde déshydrogénase
AcR	Acide rétinoïque
AF	Activating function
AFP	Alpha-fœtoprotéine
AIS	Androgen insensitivity syndrome
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMH	Anti-müllérienne hormone
AMHR	Anti-müllérienne hormone récepteur
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP1	Activator protein 1
AR	Androgen receptor
ARE	Androgen Response Element
ARN	Acide ribonucléïque
ARNm	Acide ribonucléique messager
Arx	X-linked aristaless-related homeobox gene
ATF	Activating transcription factor
AZF	Azoospermia factor
BAK1	BCL2-antagonist/Killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BEP	Bléomycine, Etoposide, Cisplatine
Blimp1	B-Lymphocyte induced maturation protein-1
BMP	Bone morphogenic protein
BMPRI	Bone morphogenic protein receptor
BPA	Bisphénol-A
BSA	Bovine Serum Albumine
CAIS	Complete androgen insensitivity syndrome
CDK	Cyclin-dependent kinase
CGP	Cellule germinale primordiale
CGs	Cellule germinale
CIS	Carcinome in situ
c-KIT	v-kit hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
CREB	cAMP responsive 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
DBP	Di-n-butyl phtalate
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEHP	Di-2-éthylhexyl phtalate
DES	Diéthylstilbestrol
DHH	Desert hedgehog
DHT	Dihydrotestostérone

DMC1	Disrupted meiotic cDNA 1
DMRT1	Doublesex- and mab-3-related transcription factor 1
DMSO	Diméthylsulfoxide
E_2	Oestradiol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid disodium
EGF	Epidermal growth factor
EGR1	Early growth response gene 1
EMX2	Empty spiracles homeobox 2
EP	Etoposide – Cisplatine
ERE	Estrogen responce element
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase
ERR-β	Estrogen related receptor β
ERs	Estrogen receptors
FGF	Fibroblast growth factor
FOG2	Feminization of germline 2
FOXl2	Forkhead domain box L2
FSH	Follicle-stimulating hormone
GATA4	GATA binding protein 4
Gcl	Germ cell less
GFP	Green fluorescent protein
GM	Complexe gonade-mésonéphros
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GPCR	G protein-coupled receptor
GPER	G protein-coupled estrogen receptor
Gy	Gray
HB-EGF	Heparan-bound epidermal growth factor
hCG-β	Hormone chorionique gonadotrope
HDAC	Histone déacétylase
HMG	High mobility group
HSP	Heat shock protein
IGF-1	Insuline like growth factor-1
IGFR	Insulin-like growth factor receptor
INSL3	Insuline-like factor 3
jpc	Jour post-coïtum
jpp	Jour post-partum
KITLG	KIT ligand
KO	Knockout
LBD	Ligand binding domain
LDH	Lactate déshydrogénase
LH	Luteinizing hormone
LHX9	LIM homeobox 9
LIF	Leukemia inhibitory factor
MAF	Mitotic arrest factors
MAMLD1	Mastermind-like domain containing 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBP	Mono-n-butyl phtalate
MBP	Maltose binding protein

MEHP	Mono-(2-ethylhexyl) phtalate
MIF	Meiotic inhibiting factors
MMPs	Matrix metalloproteases
MVH	Mouse vasa homolog
Nmnat2	Nicotinamide mononucléotide adenylyl-transférase 2
NTD	N-terminal domain
OCT3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAIS	Partial androgen insensitivity syndrome
PBB	Polybromobiphényle
PBDE	Polybrominated diphenyl ether
PBS	Phosphate buffer saline
PCB	Polychlorinated biphényl
PCDF	Polychlorodibenzo-furane
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	Protéine kinase A
PKG	Guanosine monophosphate (cGMP)-dependent protein kinase
PRDM	PR-domain containing proteins
PRMT5	Arginine méthyltransferase
PVC	Polyvinyl chloride
RAF	Murine leukemia viral oncogene homolog
RALDH2	Retinaldehyde dehydrogenase 2
RARE	Retinoic acid response element
RARs	Retinoic acid receptors
RAS	Viral oncogene homolog
RB	Retinoblastoma protein
RPLND	Retroperitoneal lymph node dissection
RPLPO	Human acidic ribosomal phosphoprotein
RSPO1	R-spondin 1
RXFP2	Relaxin/insulin-like family peptide receptor 2
SCP	Synaptonemal complex protein
SDF1	Stromal cell-derived factor 1
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SF1	Steroidogenic factor 1
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SMAD	Homolog of drosophila 'mothers against decapentaplegic'
SOX9	SRY box 9
SP1	Specificity protein 1
spf	Semaines post fécondation
SPO11	Sporulation protein, meiosis specific, Spo11 homolog (S. cerevisiae)
SRY	Sex determining region of the Y chromosome
SSEA1	Stage-specific embryonic antigen-1
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein

Stra8	Stimulated by retinoic acid gene 8
SVF	Sérum de veau fœtal
Tau	Transcription activation unit
T-BSA	Testostérone couplée à la protéine BSA (Bovine Serum Albumine)
TDF	Testis determining factor
TDS	Testicular dysgenesis syndrome
Tfm	Testicular feminization mutation
TGCT	Testicular germ cell tumor
TGFβ	Transforming growth factor β
TNAP	Tissue non-specific alkaline phosphatase
TNM	Tumor-node-metastasis
TSPY	Testis-specific protein Y
UICC	Union for International Cancer Control
WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4
WT1	Wilm’s tumor 1

SOMMAIRE

Avant propos 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Développement gonadique chez les mammifères 2

1. Spécification de la lignée germinale chez la souris 2
   1.1. Origine de la lignée germinale 2
   1.2. Signalisation impliquée dans la spécification des CGPs 3
   1.3. Suppression du programme somatique et maintien de la pluripotence 5
   1.4. Migration et prolifération de la lignée germinale 6
2. Différenciation gonadique chez la souris 9
   2.1. Voie mâle 10
   2.2. Voie femelle 18
3. Caractéristiques de la différenciation des cellules germinales chez l'homme 22

II. Contrôle de la fonction de reproduction mâle par les stéroïdes 24

1. Les hormones stéroïdes et leurs récepteurs 24
   1.1. Stéroïdogenèse 24
   1.2. Récepteurs des stéroïdes 25
2. Stéroïdes et différenciation testiculaire/spermatogenèse 35
   2.1. Œstrogènes et différenciation testiculaire/spermatogenèse 35
   2.2. Androgènes et différenciation testiculaire/spermatogenèse 37
3. Interactions stéroïdes/rétinoïdes 39

III. Pathologies du développement gonadique 41

1. Syndrome de dysgénésie testiculaire 41
   1.1. Définition 41
   1.2. Origine fœtale 41
   1.3. Causes possibles 42
2. Puberté précoce 49
   2.1. Symptômes hommes/femmes 49
   2.2. Variations ethniques/Enfants adoptés 50
3. Cancers testiculaires 51
   3.1. Données cliniques 51
   3.2. Origine des TGCTs 57

OBJECTIFS DE LA THESE 63

RESULTATS ET DISCUSSION : PARTIE I

Différenciation normale des cellules germinales : entrée en méiose 64
1. Le modèle *Pleurodeles waltl* 64
   1.1. Développement morphologique et différenciation histologique des gonades 64
   1.2. Le déterminisme du sexe 66
   1.3. Modification de la différenciation sexuelle 66
   1.4. Origine des CGPs chez le pleurodèle 68
2. Justification de l'étude et Objectifs 69
3. Publication 70
   3.1. Matériels et méthodes 70
   3.2. Principaux résultats 73
4. Résultats supplémentaires : production de tératomes expérimentaux à partir d'implants embryonnaires chez *Pleurodeles waltl* 76
5. Discussion et perspectives 77
   5.1. La cinétique de la différenciation des CGs est elle comparable entre le pleurodèle et les mammifères ? 77
   5.2. L'AcR est-il impliqué dans l'entrée en méiose chez le pleurodèle ? 80
   5.3. Existe-t-il des facteurs inhibant la méiose dans le testicule fœtal de pleurodèle? . 84

ANNEXE : PARTIE I

Article de revue 86

RESULTATS ET DISCUSSION : PARTIE II

Différenciation pathologique des cellules germinales : cancer testiculaire 87
1. Contexte et objectifs 87
2. Les modèles d'étude 87
   2.1. Le modèle TCam2 87
   2.2. Le modèle NT2/D1 88
3. Publication 90
   3.1. Introduction 90
   3.2. Principaux résultats 91
   3.3. Conclusion 94
   3.4. Résultats complémentaires 95
4. Discussion et perspectives 99
   4.1. Quel est le rôle d'ERα36 dans la progression des tumeurs testiculaires? 99
   4.2. Quel est le rôle d'ERα36 dans l'initiation des tumeurs testiculaires ? 104

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 107

Avant propos

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse ont porté sur deux thématiques liées aux cellules germinales.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la différenciation « normale » des cellules germinales d'un amphibien urodèle (*Pleurodeles waltl*), modèle que notre laboratoire utilise depuis de nombreuses années pour étudier la différenciation gonadique et notamment le rôle des stéroïdes sexuels et des perturbateurs endocriniens dans ce processus. Nous avons montré que l'acide rétinoïque est impliqué dans l'induction de la méiose chez le pleurodèle. L'interaction entre les rétinoïdes et les stéroïdes lors de l'entrée en méiose a été étudiée chez cet animal. Cependant, les mécanismes d'action des rétinoïdes ainsi que les gènes cibles impliqués lors de l'entrée en méiose n'ont pas pu être identifiés.

Dans un second temps, une réorientation des recherches du laboratoire sur des modèles cancéreux nous a amenés à étudier des cellules cancéreuses testiculaires humaines dont l'origine est une anomalie de la différenciation des cellules germinales. Le modèle utilisé est la lignée séminomateuse TCam2 sur laquelle l'effet des stéroïdes sur la prolifération cellulaire a été étudié.

Pour ces raisons, nous avons choisi de présenter dans l'introduction une revue bibliographique sur la différenciation gonadique normale et pathologique chez les mammifères. Les résultats ont été organisés en deux volets :

1- Différenciation normale des cellules germinales : entrée en méiose. Ce travail a été publié dans le journal « Developmental Dynamics ».

2- Différenciation pathologique des cellules germinales : cancer testiculaire. Une partie des résultats obtenus font l'objet d'un article soumis pour publication.

La discussion comporte deux parties centrées sur chacun de ces deux aspects.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

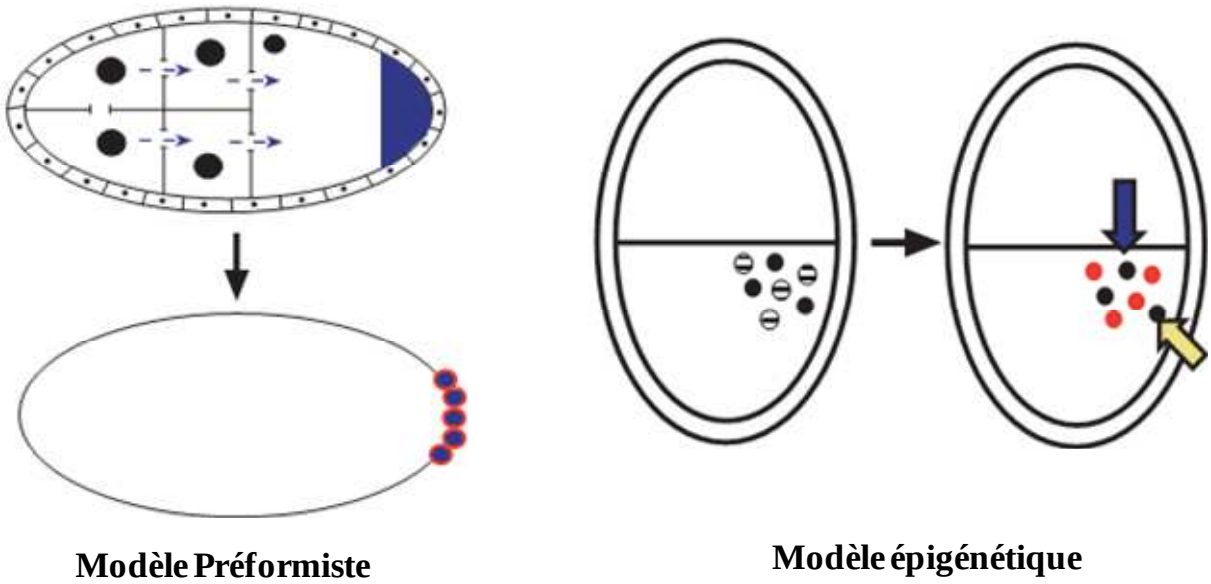


Figure 1 : Les deux grands modes de formation de la lignée germinale. Dans le <u>modèle préformiste</u> (exemple de la drosophile), des ARN et des protéines synthétisés par les cellules nourricières sont transportés au pôle postérieur de l'embryon et constituent le plasme polaire (bleu). Les cellules qui hériteront de ce plasme au cours de la cellularisation deviendront les cellules germinales (ronds bleu et rouge). Dans le <u>modèle épigénétique</u> (exemple de la souris), il n'y a pas de plasme germinal. En réponse à des signaux issus de l'ectoderme extra-embryonnaire (flèche bleue) et de l'endoderme (flèche jaune), une sous population de cellules de l'épiblaste se différencie en cellules germinales (en rouge). (D'après Extavour et Akam, 2003).

I. DEVELOPPEMENT GONADIQUE CHEZ LES MAMMIFERES

Au cours de la reproduction sexuée, le zygote est formé par la fusion de deux cellules reproductrices sexuées, les gamètes. Ils sont issus d'une population de cellules souches qui apparait à un stade très précoce du développement embryonnaire et est souvent la première lignée cellulaire à être établie : la lignée germinale. Les cellules germinales (CGs) sont les seules à subir la méiose qui précède la reproduction sexuée et aussi les seules cellules de l'organisme qui peuvent générer un individu d'où leur caractère totipotent (Wylie, 1999). Cette totipotence permet de distinguer les cellules de la lignée germinale des cellules de la lignée somatique (Wylie, 1999). Or, un organisme métazoaire dérive d'une cellule unique, le zygote. Quand et comment s'effectue alors la ségrégation entre ces deux lignées? Au moins deux modes distincts de spécification de la lignée germinale ont été définis chez les animaux. Dans certains cas, ce sont des déterminants cytoplasmiques d'origine maternelle, déjà présents dans l'ovocyte, qui jouent un rôle essentiel dans cette spécification. On parle alors de modèle préformiste, décrit notamment chez les anoures et la drosophile. Dans d'autres cas, comme chez les mammifères et les urodèles, les CGs apparaissent grâce à des signaux émis par les cellules somatiques voisines : c'est le modèle épigénétique. Les CGs sont alors identifiées plus tard au cours de l'embryogenèse (figure 1) (Extavour et Akam, 2003).

1. Spécification de la lignée germinale chez la souris

1.1. Origine de la lignée germinale

Les travaux de Lawson et Hage ont démontré, chez la souris, que les précurseurs des cellules germinales primordiales (CGPs) sont d'origine épiblastique. Ils proviennent plus précisément de l'épiblaste proximal proche de l'ectoderme extra-embryonnaire (Lawson et Hage, 1994). Six jours après la fécondation (jours post coïtum = jpc), ces précurseurs, qui peuvent aussi donner naissance à des dérivés du mésoderme extra-embryonnaire, sont présents sur tout le pourtour de cet épiblaste proximal. A ce stade du développement embryonnaire, la ségrégation de la lignée germinale s'effectue spécifiquement dans cette région grâce aux signaux émis par l'ectoderme extra-embryonnaire (pour revue Matsui et Okamura, 2005). En effet, des expériences de transplantation de cellules épiblastiques,

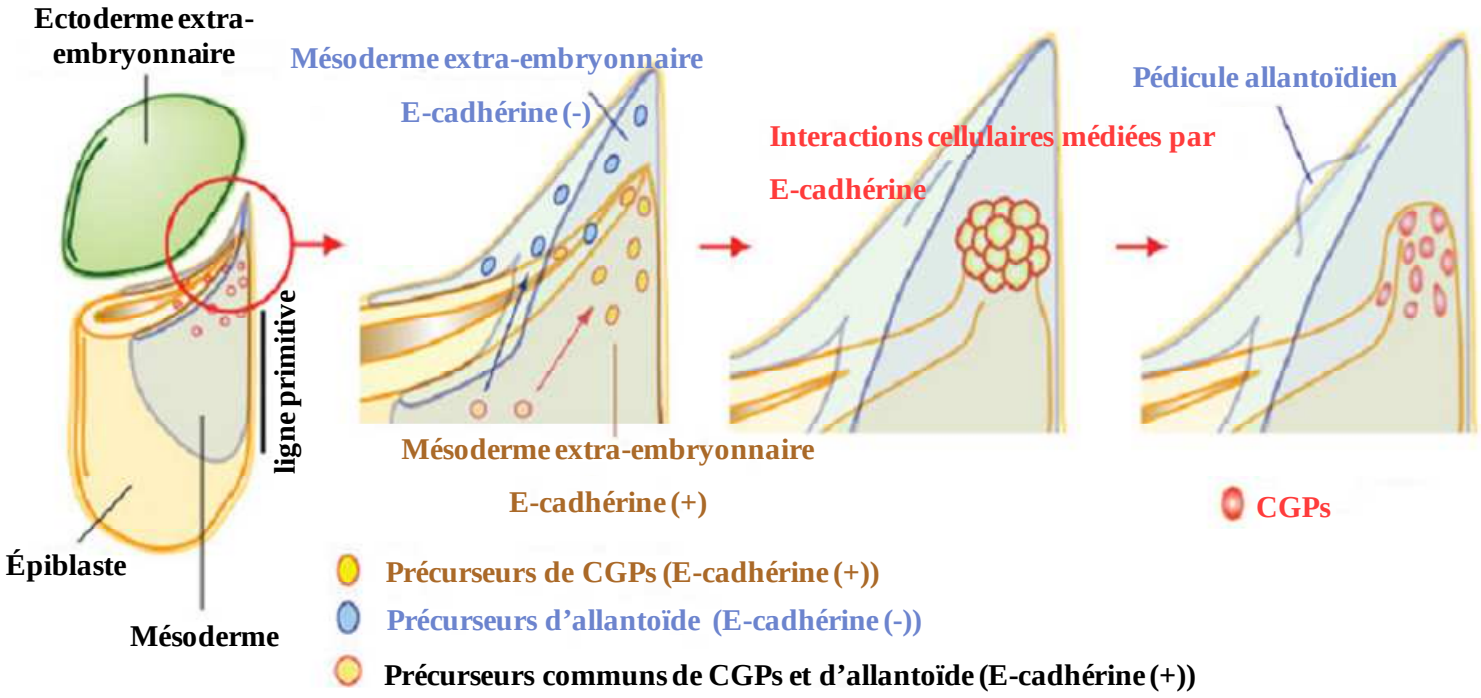


Figure 2 : Ségrégation des cellules germinales primordiales (CGPs). Au cours de la gastrulation (à partir de 6,5 jpc), les précurseurs communs de CGPs et de l'allantoïde vont migrer hors de l'épiblaste proximal par la partie postérieure de la ligne primitive pour se localiser au niveau du mésoderme extra-embryonnaire. Une population de ces précurseurs perd l'expression de l'E-cadherine en migrant vers la partie distale de la région extra-embryonnaire pour se différencier en allantoïde. À la base de l'allantoïde une autre population de précurseurs exprimant fortement l'E-cadhérine donne naissance aux CGPs à 7,2 jpc. (D'après Matsui et Okamura, 2005).

réalisées à 6,5 jpc montrent que les cellules transplantées évoluent conformément à leur site d'implantation, quelle que soit leur position d'origine (Tam et Zhou, 1996). Les cellules épiblastiques distales évoluent normalement en cellules neuroectodermiques et ectodermiques. Si ces cellules de l'épiblaste distal sont transplantées dans la région proximale, elles évolueront en CGPs. En revanche, la greffe de cellules de l'épiblaste proximal en position distale ne donnera pas de CGPs mais du neurectoderme (Tam et Zhou, 1996). Cette étude illustre l'importance des signaux provenant de l'environnement, en particulier l'ectoderme extra-embryonnaire, dans le déterminisme des CGPs. De même, la culture d'un épiblaste proximal de 5,5 jpc en l'absence d'ectoderme extra-embryonnaire ne donne jamais naissance à des CGPs. L'épiblaste distal quant à lui ne donne jamais naissance à des CGPs, sauf s'il est cultivé en présence d'ectoderme extra-embryonnaire. Ces résultats établissent clairement le rôle inducteur de l'ectoderme extra-embryonnaire dans l'émergence des CGPs (Yoshimizu et al., 2001).

Au cours de la gastrulation (à partir de 6,5 jpc), les précurseurs communs des CGPs et de l'allantoïde vont migrer hors de l'épiblaste proximal par la partie postérieure de la ligne primitive pour se localiser au niveau du mésoderme extra-embryonnaire. Une population de ces précurseurs perd l'expression de l'E-cadhérine (protéine des jonctions intercellulaires) en migrant vers la partie distale de la région extra-embryonnaire pour se différencier en allantoïde. À la base de l'allantoïde une autre population de précurseurs exprime fortement l'E-cadhérine et donne naissance aux CGPs à 7,2 jpc (figure 2) (pour revue, Matsui et Okamura, 2005). Ainsi, à ce stade de développement (7,2 jpc), la ségrégation définitive des CGPs est effectuée. Ces cellules sont identifiées par l'expression de certains gènes tels que le gène *Tnap* (tissue non-specific alkaline phosphatase) codant la phosphatase alcaline, le gène *Fragilis* (interferon-inducible gene) qui code une protéine transmembranaire, le gène *Stella* (*Pgc-7*) codant une protéine nucléo-cytoplasmique exprimée également dans l'ovocyte et l'embryon aux stades précoces (pré-implantation), *Ssea1* (stage-specific embryonic antigen-1) (pour revue, McLaren, 2003), *Blimp1* (B-Lymphocyte induced maturation protein-1), *Nanos3*, et les gènes de pluripotence comme octamer-binding transcription factor 3/4 (*Oct3/4*), *Nanog* et *Sox2* (Saitou et al., 2005).

1.2. Signalisation impliquée dans la spécification des CGPs

Parmi les voies de signalisation contrôlant la ségrégation et la différenciation des CGPs, il semble que les BMP (bone morphogenic proteins) -membres de la superfamille du TGFβ

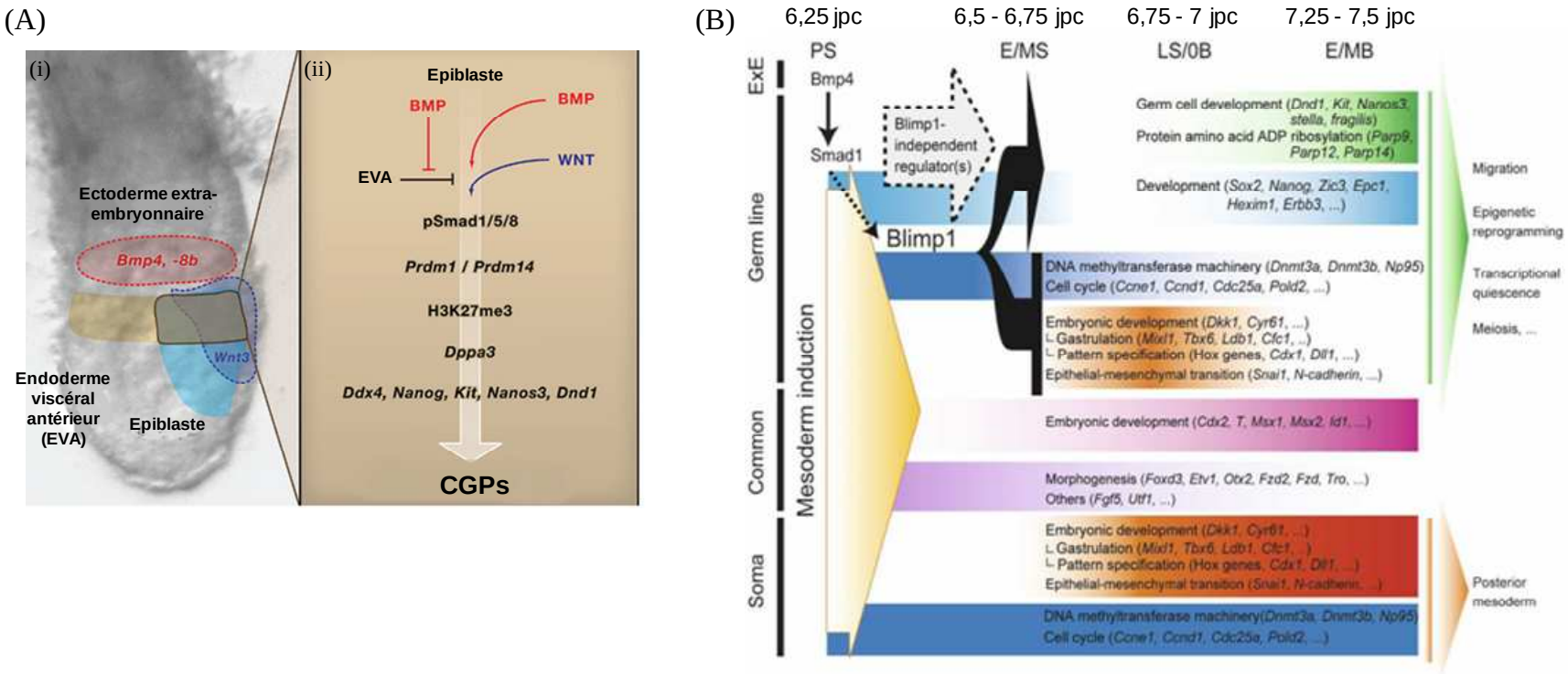


Figure 3 : Spécification de la lignée germinale chez la souris. (A) (i) chez les embryons au stade pré-gastrula, une population de cellules localisées dans la région postérieure de l'endoderme viscéral (brune) donne naissance aux futures cellules germinales primordiales (CGPs). Cette région montre un taux élevé de la protéine BMP (zone jaune) provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire (zone pointillé en rouge) et de WNT3 (zone bleue). Elle reçoit également des signaux négatifs de l'endoderme viscéral antérieur (EVA). (ii) les signaux BMP et WNT3 induisent la formation des CGPs à partir des cellules épiblastiques. Ces signaux impliquent les protéines intracellulaires SMADs dans l'activation de la transcription des gènes spécifiques de la lignée germinales comme les gènes *Prdm 1* et *Prdm14* conduisant à une reprogrammation épigénétique et ainsi à la ségrégation des CGPs. (B) Programmation génétique de la spécification de la lignée germinale. Certaines cellules épiblastiques recevant le signal BMP4 répondent en exprimant *Blimp1*. Ce gène active l'expression des gènes spécifiques de la lignée germinale (*Fragilis*, *Stella*, *Nanos3*…) et contribue au contrôle de l'expression de certains gènes de pluripotence dans les cellules germinales primordiales comme *Sox2* et *Nanog*. *Blimp1* est impliqué également dans la répression des gènes de la lignée somatique comme les gènes *Hox*. Des gènes spécifiques de la lignée germinales, de la lignée somatique et également des gènes qui représentent un programme du développement communs entre les deux lignées sont montrés. La flèche pointillée représente des gènes impliqués dans la spécification de la lignée germinale et qui sont Blimp1-independants comme *Prdm14*. EXE, ectoderme extra-embryonnaire ; jpc, jour post-coïtum; PS, prestreak ; E/MS, early-/mid-streak; LS/0B, late-streak/no-bud ; E/MB, early-/mid-bud. (D'après Tam et Loebel, 2009 ; Kurimoto et al., 2008).

(transforming growth factor β)- et leurs effecteurs intracellulaires (les protéines SMADs) jouent un rôle primordial, en particulier les BMP4, BMP8b et BMP2 et leurs effecteurs SMAD1 et SMAD5 (revue dans Matsui et Okamura, 2005).

Lawson et al. ont suggéré que la différenciation finale des CGPs semble dépendre de deux signaux séparés. A 6 jpc, une première exposition à BMP4, sécrétée par l'ectoderme extra-embryonnaire, permet à l'épiblaste proximal de donner naissance aux précurseurs communs des CGPs et de l'allantoïde. Tandis qu'un deuxième signal provenant probablement du mésoderme extra-embryonnaire entre 6,75 et 7 jpc conduit à la ségrégation des deux lignées cellulaires (Lawson et al., 1999).

Le rôle essentiel de BMP4 a été mis en évidence par des expériences de knock-out (KO) chez la souris. En effet, une absence totale des CGPs et de l'allantoïde a été observée chez les embryons porteurs d'une invalidation homozygote du gène *Bmp4*. Par contre, une réduction de 50% de leur nombre est observée chez les hétérozygotes. Ceci suggère une action dose-dépendante de BMP4 (Lawson et al., 1999).

L'expression de *Bmp8b* est limitée entre 6 et 7,5 jpc à l'ectoderme extra-embryonnaire. L'absence de *Bmp8b* entraîne une diminution du nombre, voire une absence totale de CGPs. BMP8b interviendrait, comme BMP4, dans la détermination des CGPs, mais pas dans leur prolifération ni dans leur survie (Ying et al., 2000). Le rôle de BMP8b impliqué dans la spécification des CGPs a été précisé par l'étude de Ohinata et al. En effet, cette étude a mis en évidence l'existence de signaux négatifs provenant de la région antérieure de l'endoderme viscéral qui restreignent la population de cellules épiblastiques donnant naissance aux CGPs. L'influence négative de ces signaux sur la réponse des cellules épiblastiques aux BMP4 provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire serait limité par l'action de BMP8b selon un mécanisme inconnu (Ohinata et al., 2009). De plus, cette étude a montré que le gène *Wnt3* exprimé dans la région postérieure de l'endoderme viscéral est essentiel à la réponse de l'épiblaste aux signaux BMP4 (figure 3A).

Bmp2 semble aussi jouer un rôle dans la ségrégation des CGPs. Elle est exprimée dans la région postérieure de l'endoderme viscéral entre 6 et 6,75 jpc. BMP2 interviendrait dans la ségrégation des CGPs. L'étude des souris mutantes pour *Bmp2* a montré une réduction du nombre de CGPs (Ying et Zhao, 2001). L'étude d'embryons doublement hétérozygotes, soit pour *Bmp2* et *Bmp4*, soit pour *Bmp2* et *Bmp8b*, a permis d'établir que BMP4 et BMP2 agissaient de façon additive sur la différenciation des CGPs, alors que ce n'est pas le cas pour

BMP2 et BMP8b (Ying et Zhao, 2001). Ainsi, les trois molécules BMPs fonctionnent différemment mais en coopération afin que la partie postérieure de l'épiblaste proximal reçoive un niveau suffisant de « signal BMPs » pour générer les CGPs (Ying et Zhao, 2001).

Les processus de signalisation conduisant à la ségrégation de la lignée germinale consistent en une cascade de réactions déclenchée par la fixation des ligands BMPs sur des récepteurs membranaires appartenant à la famille des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase. Tout d'abord, ces BMPs se lient au récepteur de type II (BMPRII), formant un complexe qui active le récepteur de type I (BMPRIA, BMPRIB) par phosphorylation. Ce dernier active à son tour par phosphorylation les protéines intracellulaires SMADs en particulier SMAD1 et SMAD5 qui forment des hétérodimères avec SMAD4. Ces complexes entrent dans le noyau et activent la transcription de gènes responsables du déterminisme de la lignée germinale (Massagué et al., 2005). Les études des souris mutantes pour *Smad1* ou *Smad5* ont montré une réduction du nombre, voire une absence totale des CGPs (Chang et Matzuk, 2001; Hayashi et al., 2002). L'étude d'embryons doublement hétérozygotes pour *Smad1* et *Smad5* (*Sma1*$^{+/-}$; *Sma5*$^{+/-}$) a également montré une réduction significative du nombre des CGPs (Arnold et al., 2006). Ceci confirme l'importance de ces protéines dans la formation des CGPs. Cependant, le mécanisme d'action des BMPs conduisant à la spécification de la lignée germinale ainsi que les gènes cibles sont largement inconnus (Tam et Loebel, 2009).

1.3. Suppression du programme somatique et maintien de la pluripotence

Un certain nombre de gènes ont été décrits comme impliqués dans la spécification des CGPs chez la souris. C'est notamment le cas du gène *Blimp1* également appelé *Prdm1*. Il code un membre de la famille PRDM (PR-domain containing proteins) –famille de protéines régulatrices transcriptionnelles- qui intervient comme répresseur transcriptionnel. Cette protéine est exprimée à 6,25 jpc dans certaines cellules de l'épiblaste proximal qui sont en contact avec l'ectoderme extra-embryonnaire. Le suivi de l'évolution de ces cellules marquées à la GFP (green fluorescent protein) a permis de montrer que ce sont bien les futures CGPs (Ohinata et al., 2005). *Blimp1* semble jouer un rôle essentiel dans la spécification des CGPs. D'une part, il intervient dans la répression de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation de la lignée somatique comme les gènes *Hox* (Saitou et al., 2005). En effet, les travaux d'Ancelin et al., montrent que BLIMP1 s'associe avec l'arginine méthyltransférase (PRMT5) et provoque une diméthylation de l'arginine 3 sur l'histone H2A

et/ou H4 (H2A/H4R3me2s) à 8,5 jpc. Cependant cette méthylation serait réprimée à 11,5 jpc en raison de la translocation du complexe BLIMP1/PRMT5 du noyau au cytoplasme, dont le mécanisme n'est pas clairement élucidé (Ancelin et al., 2006).

D'autre part, *Blimp1* contribue au maintien de l'expression de certains gènes de pluripotence dans les CGPs. Ainsi, *Blimp1* n'apparait pas seulement comme un initiateur mais comme un coordinateur majeur du programme transcriptionnel aboutissant à la spécification de la lignée germinale (Kurimoto et al., 2008) (figure 3B). Chez les embryons porteurs d'une invalidation hétérozygote de *Blimp1* (*Blimp1*$^{+/-}$), le nombre de CGPs est réduit, et ces cellules ont des altérations de la migration, de la prolifération et de la répression du programme somatique. Chez les embryons homozygotes (*Blimp1*$^{-/-}$), une absence totale des CGPs a été observée (Ohinata et al., 2005).

Un autre membre de la famille PRDM appelé *Prdm14* semble aussi jouer un rôle crucial dans la spécification des CGPs. Il s'agit d'un gène dont l'expression est spécifique de la lignée germinale. Elle est détectée dans les cellules qui expriment *Blimp1* à 6,5 jpc et demeure dans les CGPs jusqu'à 13,5-14,5 jpc chez les mâles et les femelles. L'étude de Yamaji et al., réalisée sur des souris KO pour *Prdm14* (*Prdm14*$^{-/-}$) montre que les mâles et les femelles sont stériles suite à une perte complète des CGPs à 12,5 jpc (Yamaji et al., 2008). En effet, chez les embryons *Prdm14*$^{-/-}$, les CGPs montrent une répression de l'expression de *Sox2* et de *Hoxb1*. De ce fait, *Prdm14* joue un rôle dans la ré-acquisition d'expression d'une partie des gènes de pluripotence, mais pas dans la suppression du programme somatique (Yamaji et al., 2008). Chez la souris, la ré-acquisition de pluripotence des CGPs est médiée par une répression de la diméthylation de la lysine 9 sur l'histone 3 (H3K9me2) à 8 jpc, suite à une répression de l'expression d'une histone méthyltransférase (GLP) ainsi qu'à une induction de la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3 (H3K27me3). Cependant, chez les embryons *Prdm14*$^{-/-}$, on observe ni la répression de H3K9me2 ni l'induction de H3K27me3 (Yamaji et al., 2008). L'ensemble de ces mécanismes est résumé dans la figure 3B.

1.4. Migration et prolifération de la lignée germinale

Chez la souris, les CGPs sont définitivement spécifiées à 7,25 jpc au niveau du mésoderme extra-embryonnaire. Elles migrent au sein de l'embryon et rejoignent le site des futures gonades. Vingt quatre heures après leur apparition (~8,5 jpc), l'endoderme viscéral subit des mouvements d'invagination qui permettent la formation de la paroi du tube digestif

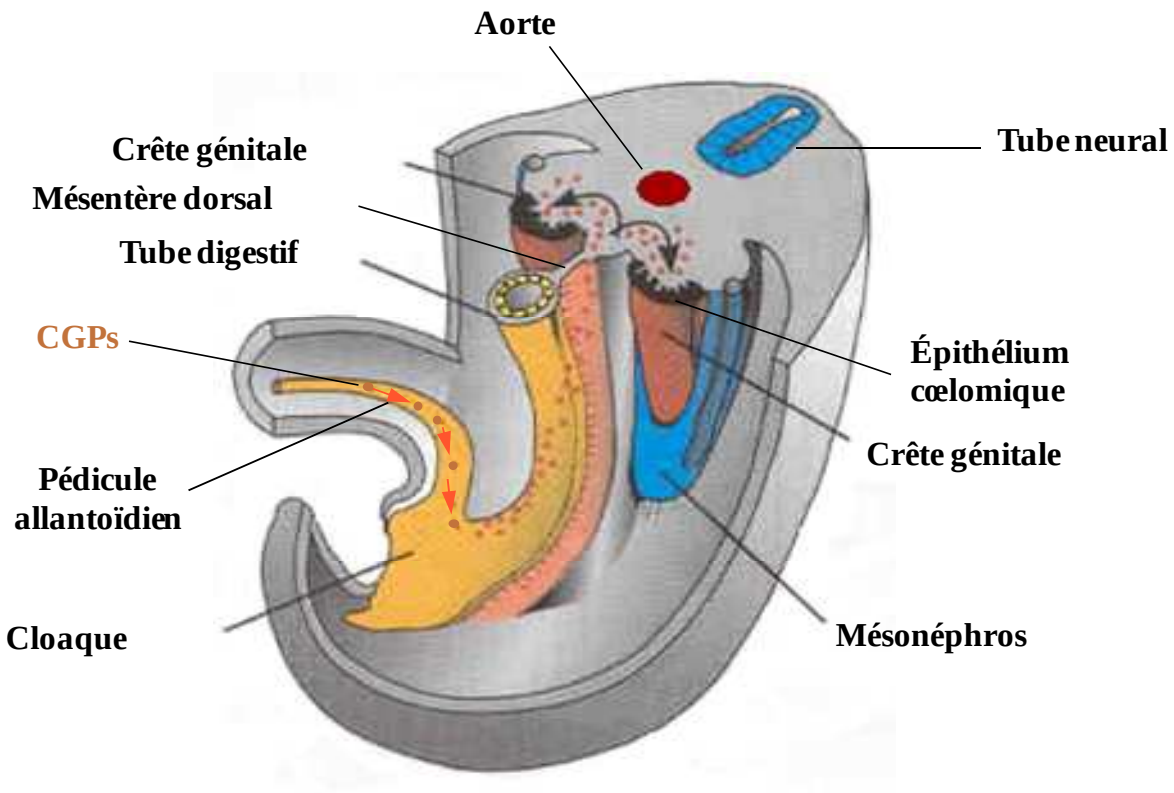


Figure 4 : Schéma en trois dimensions représentant la migration des cellules germinales primordiales (CGPs) vers les crêtes génitales chez un embryon de souris âgé de 11 jours. Voie de migration des CGPs depuis le pédicule allantoïdien, puis le long du tube digestif postérieur et du mésentère dorsal, jusque dans la crête génitale. (D'après Soto-Suazo et Zorn, 2005).

postérieur. Bien que les CGPs soient incapables de se déplacer à ce stade d'une façon autonome, elles sont emportées passivement avec les cellules endodermiques par les mouvements d'invagination et viennent se positionner le long de la paroi postérieure du tube digestif (pour revue, McLaren, 2003). Entre 9,5 et 11,5 jpc, les CGPs prolifèrent et quittent alors activement le tube digestif postérieur en traversant le mésentère dorsal pour rejoindre les crêtes génitales en cours de formation (figure 4). Celles-ci se forment de chaque côté de la ligne médiane, entre le mésonéphros et le mésentère dorsal, du fait de la prolifération de l'épithélium cœlomique et d'une condensation du mésenchyme sous-jacent (pour revue, McLaren, 2003).

La migration des CGPs vers les crêtes génitales est contrôlée par les locus W (white spoting) et Steel. Ces locus portent respectivement les gènes codant c-KIT (un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de type III ; également appelé CD117) et son ligand, KIT ligand (KITLG) (un facteur de croissance ; également appelé Stem Cell Factor ou Mast-Cell Growth Factor). Les souris mutantes pour *c-kit* ou son ligand sont caractérisées par une absence des CGPs dans les crêtes génitales (pour revue, McLaren, 2003). En effet, le nombre des CGPs dans les embryons *Kitlg*$^{-/-}$ n'est pas affecté à 8 jpc mais il diminue énormément à partir de 9 jpc. Cette diminution résulte d'un défaut dans la prolifération de ces cellules. Ceci indique que KITLG est nécessaire pour la survie des CGPs; son invalidation induit l'apoptose qui est détectée par l'expression de *Bax* (gène pro-apoptotique). Cependant, dans les embryons *Kitlg*$^{-/-}$, les CGPs dont *Bax* est invalidé ne meurent pas mais elles arrêtent la prolifération et leur migration serait perturbée (Runyan et al., 2006). *In vivo*, l'expression de *Kitlg* dans la ligne médiane diminue entre 9,5 et 10,5 jpc. Cette diminution semble nécessaire pour induire l'apoptose dans les CGPs qui ne sont pas très avancées dans leur migration vers les crêtes génitales. Ainsi, KITLG contrôle la survie des CGPs et il est nécessaire pour leur prolifération et leur migration (Runyan et al., 2006).

D'autres facteurs sont également impliqués dans la migration et la survie des CGPs chez la souris. C'est le cas de SDF1 (stromal cell-derived factor 1 ou CXCL12). Il s'agit d'une cytokine de type chemokine, qui exerce son action chimioattractive via son récepteur couplé à la protéine G, CXCR4. Les travaux de Molyneaux et al. montrent que le récepteur CXCR4 est exprimé dans la membrane des CGPs migrantes à 10,5 jpc, et que son ligand SDF1 est exprimé en même temps par les crêtes génitales. Ainsi, les interactions SDF1/CXCR4 sont impliquées dans la colonisation des crêtes génitales par les CGPs. D'ailleurs, chez les souris

KO pour *Cxcr4* (*Cxcr4*$^{-/-}$), le nombre de CGPs colonisant les crêtes génitales est réduit par rapport aux témoins (Molyneaux et al., 2003).

Les BMPs jouent un rôle important non seulement dans la spécification des CGPs, mais aussi dans leur migration. L'étude de Dudley et al. montre que l'ajout de BMP4 ou de Noggin (antagoniste de BMP) à une culture de tissus embryonnaires (9,5 jpc) induit une augmentation ou une diminution du nombre de CGPs respectivement. En outre, Noggin, bloque l'expression de KITLG dans les crêtes génitales et provoque une perturbation dans la migration des CGPs ainsi qu'un échec de la colonisation des crêtes génitales (Dudley et al., 2007). De même, le blocage de la voie de signalisation des BMPs réprime l'expression de SDF1 par les crêtes génitales et empêche la colonisation de ces dernières par les CGPs (Dudley et al., 2010).

La prolifération des CGPs a lieu lors de la migration et continue jusqu'à un ou deux jours après la colonisation des crêtes génitales. Leur nombre augmente rapidement et passe de ~100 cellules à 8,5 jpc pour atteindre ~25000 cellules à 13,5 jpc. Plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans la prolifération des CGPs : KITLG (nous l'avons mentionné ci-dessus), FGF (fibroblast growth factor) et LIF (leukemia inhibitory factor) (revue dans Ewen et Koopman, 2010).

Après la colonisation des crêtes génitales, les CGPs qui sont nommées cellules germinales (CGs) ou gonocytes à ce stade de développement, subissent trois changements importants :

1. Un changement morphologique ; les CGs deviennent grandes, rondes et facilement repérables par rapport à leurs voisines somatiques.

2. Un changement du profil d'expression génique ; les gènes *Tnap*, *Ssea1*, et *Nanos3* sont réprimés, tandis que les gènes *Gcna1* (germ cell nuclear antigen 1), *Dazl* (deleted in azoospermia like), *Gcl* (germ cell-less), *Err-β* (estrogen related receptor β) et *Mvh* (Mouse vasa homolog) sont exprimés permettant ainsi la prolifération des CGs dans les gonades.

3. La perte de pluripotence ; les CGs perdent en partie leur capacité à produire des cellules souches embryonnaires en culture. D'ailleurs, la répression des gènes de pluripotence (*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*) est nécessaire pour la différenciation sexuelle (revue dans. Ewen et Koopman, 2010)

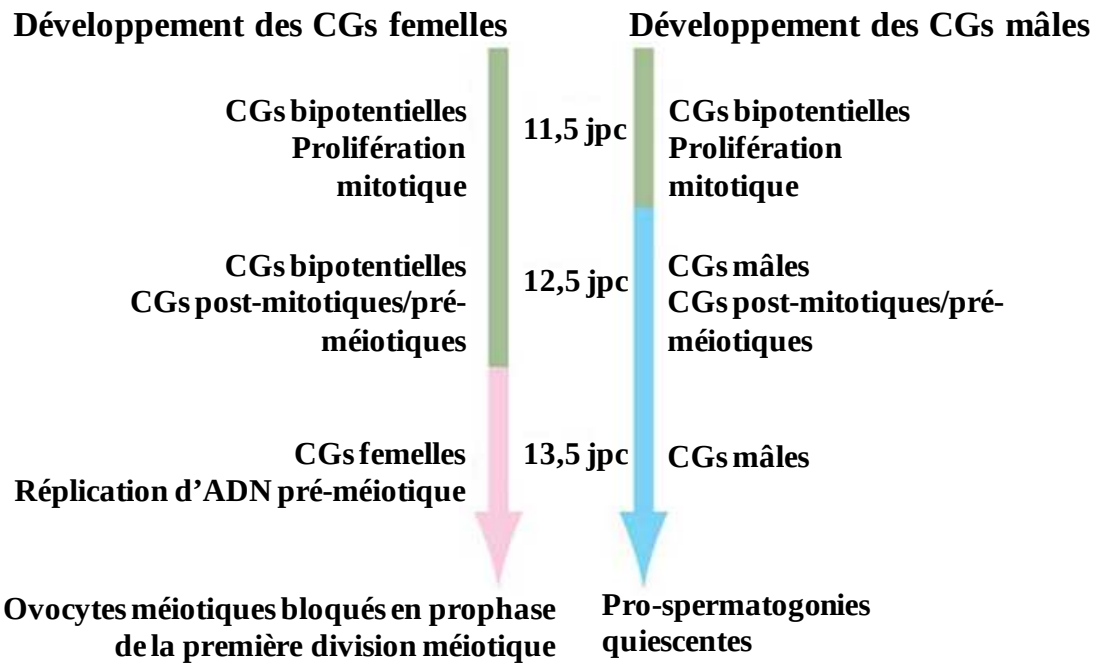


Figure 5 : Schéma de différenciation des CGs mâles et femelles au cours du développement embryonnaire de souris. A 11,5 jpc les CGs sont bipotentielles, en prolifération. A partir de 12,5 jpc, les CGs commencent à se différencier dans la gonade mâle. Tandis que cette différenciation sera retardée de 24h chez la femelle. A ce stade de développement, les CGs femelles commencent à se préparer pour entrer en méiose en répliquant l'ADN, progressent jusqu'au stade diplotène auquel elles restent bloquées jusqu'à la puberté. Par contre, les CGs mâles entrent en arrêt mitotique (quiescence). (D'après Kocer et al., 2009).

2. Différenciation gonadique chez la souris

Les CGs colonisant les crêtes génitales peuvent suivre la voie de différenciation mâle ou le sens femelle, cette différenciation étant contrôlée par leur environnement somatique. Les différences entre les cellules somatiques de l'ovaire et celles du testicule sont évidentes à 12,5 jpc, alors que les différences entre les CGs des gonades femelles (XX) et des gonades mâles (XY) ne s'observent qu'à 13,5 jpc. A ce stade, les CGs de l'ovaire entrent en méiose alors que celles du testicule vont subir un arrêt du cycle cellulaire mitotique (revue dans Ewen et Koopman, 2010) (figure 5).

Les mécanismes de la recombinaison génétique ont été largement étudiés chez la levure et font intervenir plusieurs gènes dits «de méiose». En effet, il existe plusieurs gènes marqueurs de division méiotique qui sont fortement conservés au cours de l'évolution, parmi lesquels les gènes *Dmc1*, *Scp3* et *Spo11* (sporulation). Le gène *Dmc1*, largement étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, code une recombinase spécifique de la méiose qui présente des homologies avec la protéine bactérienne Rec A. La protéine DMC1 interviendrait dans la régulation du cycle cellulaire, l'appariement homologue (synapsis) et l'échange d'ADN entre les chromosomes (crossing-over) (Pittman et al., 1998). Les souris *Dmc1*$^{-/-}$, mâles et femelles, sont stériles avec arrêt de la gamétogénèse au stade de la première prophase méiotique. Les gonades des deux sexes sont plus petites chez ces mutants. Chez les mâles, cette mutation nulle de *Dmc1* entraîne un arrêt de méiose des spermatocytes I au stade zygotène; ces cellules dégénèrent ensuite par apoptose (Pittman et al., 1998). Chez les femelles *Dmc1*$^{-/-}$, l'ovogenèse s'arrête au cours de la vie fœtale. Les CGs dégénèrent par la suite, l'ovaire adulte ne contenant ni ovocytes, ni follicules (Pittman et al., 1998).

SCP3 est un complexe protéique permettant l'appariement des chromosomes homologues lors du stade zygotène de la prophase de la première division méiotique. Les souris mâles dont le gène *Scp3* a été invalidé sont stériles suite à une perte de spermatocytes par apoptose ; ils présentent des testicules plus petits (Yuan et al., 2000).

Le gène *Spo11*, initialement décrit chez la levure, est aussi nécessaire pendant la recombinaison méiotique et la ségrégation des chromosomes et plus spécifiquement lors de la formation des cassures doubles-brins dans les chromosomes homologues appariés. Chez la souris, la protéine SPO11 pourrait générer les cassures de chromosomes qui initient la recombinaison méiotique à travers une série de réactions impliquant entre autres la protéine DMC1. La délétion de *Spo11* conduit à un défaut de méiose responsable de l'infertilité de ces

Gène	Phénotype	Fonction proposée
Emx2	Les gonades *Emx2*$^{-/-}$ XX et XY ont un phénotype similaire à celui des mutants *Wt1*,*Sf1* et *Lhx9*. Les gonades régressent après 13 jours post-coïtum (jpc).	Inconnue
Igf1r/Irr/Ir	Un triple Knock out des gènes du récepteur de l'*Igf1*, du récepteur apparenté au récepteur de l'insuline et du récepteur de l'insuline se traduit par une réversion sexuelle mâle-femelle. *Sry* est exprimé mais les marqueurs sertoliens sont absents.	La signalisation par le récepteur de l'insuline permet la croissance précoce des gonades XX et XY.
Lhx9	Les cellules des gonades *Lhx9*$^{-/-}$XX et XY ne prolifèrent pas et les gonades régressent avant 13 jpc.	*Lhx 9* pourrait réguler *Sf1* ou la prolifération précoce des cellules Sf1 positives de l'épithélium coelomique
M33	Les gonades des mutants *M33*^{cterm} possèdent un retard développemental et présentent un fort taux de réversion sexuelle mâle-femelle.	La réversion sexuelle pourrait résulter d'une diminution de la prolifération dans la gonade bipotentielle ou d'anomalies de la différenciation au niveau ou en aval de Sry.
Sf1	Les gonades *Sf1*$^{-/-}$ XX et XY entrent en apoptose et régressent avant 12,5 jpc.	Sf1 régule la survie et/ou la prolifération des cellules de la gonade bipotentielle. Sf1 est également impliqué dans la régulation positive de l'*Amh* et des enzymes de la stéroïdogenèse dans les gonades XY.
Wt1	Les gonades *Wt1*$^{-/-}$ et *Wt1-KTS*$^{-/-}$XX et XY commencent à régresser dès 12,5 jpc. Les gonades *Wt1+KTS*$^{-/-}$ présentent une réversion sexuelle mâle-femelle.	L'isoforme –KTS de *Wt1* est nécessaire pour la survie/prolifération des cellules de la gonade bipotentielle. L'isoforme +KTS contribue à la régulation positive de l'expression de *Sry*.

Tableau 1 : Gènes impliqués dans la croissance précoce et la survie de la gonade. Ces résultats ont été obtenus chez la souris par l'utilisation de modèles Knock-out ou transgéniques. *Emx2*, empty spiracles homolog 2 ; *Igf1r*, insulin-like growth factor1 receptor; *Ir*, insulin receptor; *Irr*, insulin receptor-related receptor; *Lhx9*, LIM homoeobox protein 9; *M33*, chromobox homolog 2(*Cbx2*); *Sf1*, steroidogenic factor 1; *Wt1*, Wilm's tumor homologue, KTS représente les trios acides aminés présents (+KTS) ou non (-KTS) dans la protéine WT1. (D'après Brennan et Capel, 2004).

souris. La structure des chromosomes est modifiée et des erreurs de recombinaison apparaissent conduisant à un arrêt du cycle cellulaire et/ou à l'apoptose avant la première division (Baudat et de Massy, 2004).

Les cellules somatiques constituant la gonade sont classées en trois types. Les cellules précurseurs des cellules dites «de soutien» se différencient en cellules de Sertoli chez le mâle et en cellules de la granulosa chez la femelle. Le deuxième type correspond aux cellules stéroïdogènes qui sont les cellules de Leydig chez le mâle et les cellules de la thèque interne ainsi que les cellules de la granulosa chez la femelle. Enfin, les cellules précurseurs des tissus de connexion donnent le tissu vasculaire, la tunique et les cellules myoïdes péritubulaires chez le mâle et se différencient en tunique et cellules stromales chez la femelle.

Les expériences d'invalidation de gènes ont permis d'identifier plusieurs gènes qui ont un rôle dans la croissance précoce et le maintien de la gonade dans les deux sexes, notamment *Sf1* (steroidogenic factor 1) et *Wt1* (Wilm's tumor gene 1). *Sf1* code un récepteur nucléaire orphelin. Son invalidation conduit à une absence de gonades. *Wt1* code un facteur de transcription qui, lorsqu'il est invalidé, conduit là encore à une régression des gonades (Brennan et Capel, 2004) (tableau 1). Outre ces deux gènes fondamentaux, d'autres facteurs sont impliqués dans la croissance précoce de la gonade (*Emx2*, *Lhx9*, *Igfr*, *M33*) (Brennan et Capel, 2004) (tableau 1).

2.1. Voie mâle

2.1.1. Déterminisme génétique

Chez les mammifères, la présence d'un chromosome Y induit la différenciation de la gonade en testicule et ce, quel que soit le nombre de chromosomes X. Il a alors été envisagé que la différenciation testiculaire soit induite par un locus dominant porté par le chromosome Y. Ce dernier a été nommé TDF (Testis Determining Factor) et semblait comporter un ou plusieurs gènes qui interviennent dans la détermination mâle. L'analyse du génome de patients inversés sexuellement a conduit à l'identification du gène *Sry* (Sex-determining region of Y chromosome) comme étant le TDF (Sinclair et al., 1990). Par la suite, l'utilisation d'un transgène *Sry* chez des souris XX ont confirmé que *Sry* est le déterminant primaire de la différenciation sexuelle (Koopman et al., 1991). *Sry* code un facteur de transcription qui contient un domaine de liaison à l'ADN : la boîte HMG (High Mobility Group).

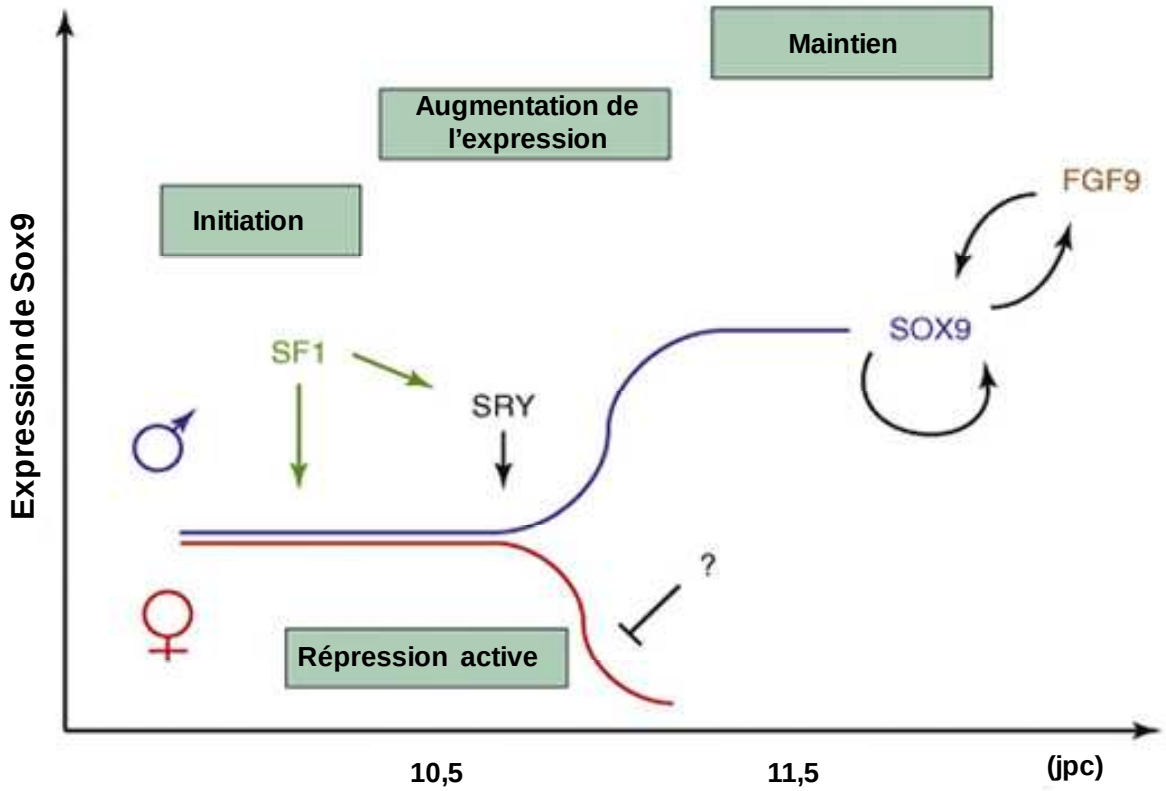


Figure 6 : Modèle représentant la régulation transcriptionelle de *Sox9*. Chez le mâle, la régulation transcriptionnelle gonadique de *Sox9* comprend trois phases : (i) initiation de la transcription indépendante de SRY; (ii) augmentation de l'expression dépendante de SRY ; (iii) maintien de l'expression en absence de SRY. Ainsi chez le mâle, SF1 active l'expression de *Sry*. L'expression de *Sox9* augmente à environ 11,5 jpc par une action synergique de SRY et SF1, tandis que chez la femelle, l'expression de *Sox9* diminue à ce stade de développement. Le maintien de l'expression de *Sox9* après la disparition de *Sry* est dû à une autorégulation directe de SOX9 et également à FGF9. (D'après Sekido et Lovell-Badge, 2008).

Chez la souris, *Sry* est exprimé uniquement durant les premières étapes de la différenciation testiculaire. En effet, l'expression commence juste après l'ébauche des crêtes génitales à 10,5 jpc. Elle est maintenue jusqu'aux premiers signes de la différenciation testiculaire à 12,5 jpc, puis décline jusqu'à disparaître complètement. Cette expression a lieu dans les précurseurs des cellules de Sertoli et permettrait l'induction de leur différenciation (Brennan et Capel, 2004).

Seuls 10% de cas d'inversion sexuelle sont associés à des mutations du gène *Sry*, ce qui indique que d'autres gènes jouent un rôle critique dans la différenciation testiculaire (DiNapoli et Capel, 2008). Le premier gène identifié en aval de *Sry* est le gène *Sox9* (Sry-like HMG-box protein 9), codant un facteur de transcription qui contient une boîte HMG se liant spécifiquement à l'ADN (Koopman, 1999). Chez la souris, l'expression de *Sox9* est détectée quelques heures après l'initiation de l'expression de *Sry*. Au stade 11,5 jpc, le niveau de transcrits augmente dans les cellules pré-Sertoliennes tandis qu'il diminue chez les femelles (Kanai et al., 2005). Par la suite son expression persiste dans les cellules de Sertoli jusqu'à l'âge adulte (Koopman, 1999). Chez la souris, l'invalidation de *Sox9* dans la gonade XY induit une inversion sexuelle, tandis que la duplication d'une région contenant *Sox9* conduit à des inversions sexuelles par une activation ectopique du gène *Sox9* dans les gonades XX (revue dans DiNapoli et Capel, 2008). *Sox9* joue donc un rôle fondamental dans l'orientation de la différenciation gonadique vers la voie mâle. La régulation transcriptionelle de *Sox9* est constituée de trois phases (figure 6) : (i) initiation de la transcription indépendante de SRY mais dépendante de SF1 ; (ii) augmentation de l'expression dépendante de SRY. En effet, SRY se fixe sur une région régulatrice de *Sox9* dite « testis-specific enhancer » et active son expression. Cependant le mécanisme d'action selon lequel SRY induit l'expression de *Sox9* n'est pas connu ; (iii) maintien de l'expression en absence de SRY (Sekido et Lovell-Badge, 2009; Jakob et Lovell-Badge, 2011).

Le FGF9 membre de la famille des fibroblast growth factor, semble également être impliqué dans la différenciation sexuelle mâle. *Fgf9* est exprimé dans les précurseurs des cellules de Sertoli, et son expression commence peu après celle de *Sry* (Colvin et al., 2001). L'inactivation du gène *Fgf9* entraîne une inversion sexuelle des souris XY (Colvin et al., 2001). L'expression de *Fgf9* est indispensable pour maintenir l'expression de *Sox9*. En effet, l'absence de *Fgf9* entraîne une diminution de l'expression de *Sox9* et une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation ovarienne comme *Wnt4*, dont le rôle sera abordé ultérieurement. Cela induit une inversion sexuelle totale. Comme les gènes *Wnt4*

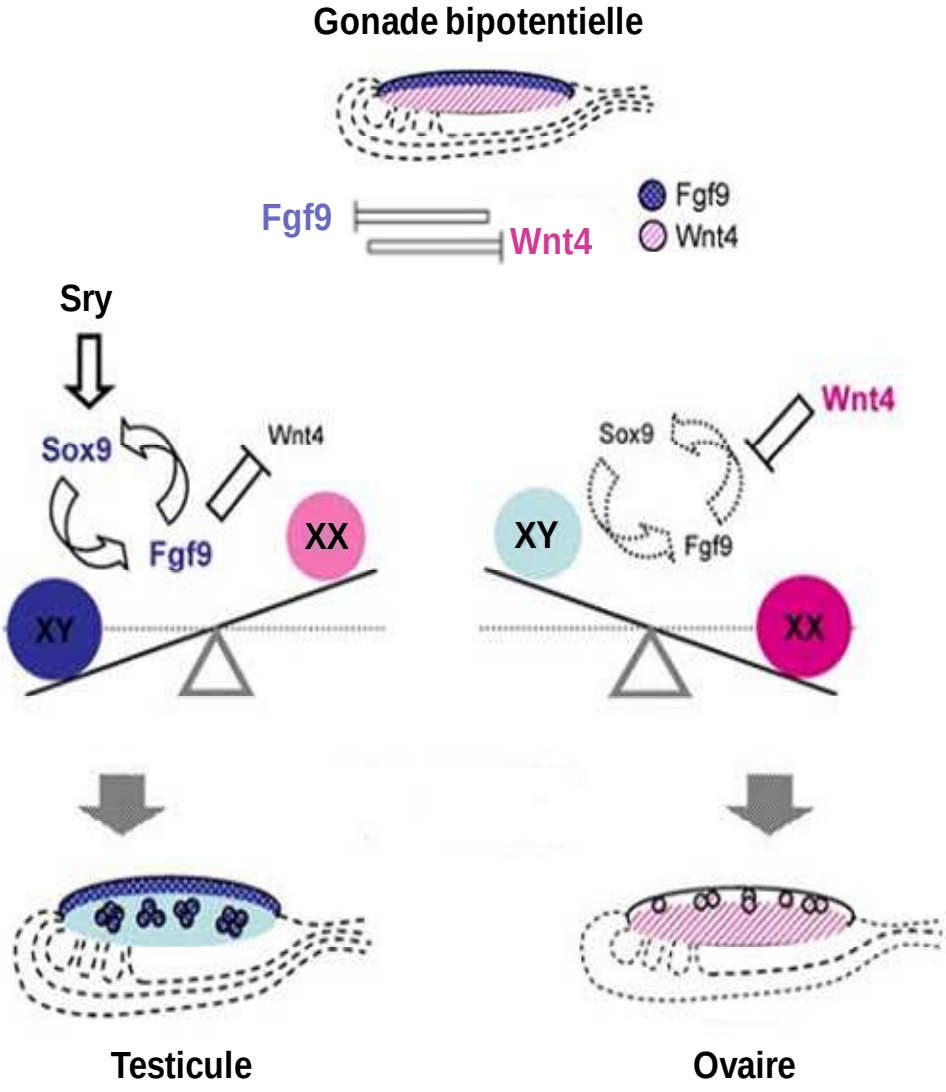


Figure 7 : Modèle illustrant la régulation de la différenciation gonadique par *Wnt4* et *Fgf9*. Dans la gonade XY, les expressions de *Sox9* et *Fgf9* seraient induites suite à celle de *Sry* ; *Fgf9* induit une diminution de l'expression de *Wnt4*. Dans la gonade XX, il n'y a pas de *Sry* et donc peu de *Fgf9* et de *Sox9*. De ce fait, la différenciation de la gonade en ovaire sera induite suite à l'expression de *Wnt4*. (D'après Kim et al., 2006; Kim et Capel, 2006).

et *Fgf9* sont exprimés tous les deux par la gonade bipotentielle, cela a amené l'équipe de Capel à émettre l'hypothèse d'un système de balance entre *Wnt4* et *Fgf9*. Chez le mâle *Sox9* et *Fgf9* s'activent réciproquement, phénomène induit par la présence de *Sry*. FGF9 présent en forte quantité va diminuer l'expression de *Wnt4* et mener à la différenciation mâle. Chez la femelle, il n'y a pas d'expression de *Sry* donc peu de *Fgf9* et de *Sox9* et de ce fait, la différenciation de la gonade en ovaire sera induite suite à l'induction de l'expression de *Wnt4* (figure 7) (Kim et al., 2006; Kim et Capel, 2006).

La différenciation testiculaire est induite par de nombreux gènes dont les principaux sont présentés dans le (tableau 2). Certains gènes comme *Wt1* et *Sf1* dont le rôle évolue au cours de la différenciation gonadique mais qui participent également à la différenciation testiculaire sont présentés dans le (tableau 1). Ainsi l'expression de *Sf1* devient différentielle dès que les gonades en développement commencent à se différencier : elle augmente au cours de la différenciation mâle tandis qu'elle diminue dans les gonades femelles (Parker, 1998). *Sf1* intervient dans la régulation de l'expression de l'AMH (Anti-Müllerian Hormone) dans les cellules de Sertoli et dans celle des enzymes de la stéroïdogenèse dans les cellules de Leydig (revue dans Sadovsky et Dorn, 2000).

2.1.2. Différenciation testiculaire

Dans les gonades XY, la prolifération cellulaire au sein de l'épithélium cœlomique est induite par le gène *Sry*. Cette augmentation de taille est observée peu après l'initiation de l'expression de *Sry* tandis qu'aucun changement n'est détecté dans les gonades XX (Schmahl et al., 2000). Après 11,5 jpc, les cellules mésonéphrétiques migrent dans la gonade mâle. La migration a lieu de 11,5 jpc à 16,5 jpc uniquement dans les gonades XY. Les cellules qui migrent sont à l'origine des cellules péritubulaires myoïdes et des cellules endothéliales (Martineau et al., 1997; Brennan et Capel, 2004).

2.1.2.1. Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli ne dérivent pas du mésonéphros mais de l'épithélium cœlomique. En effet, le groupe de Capel a montré, en injectant un colorant dans les cellules de l'épithélium cœlomique que celles-ci peuvent migrer dans la gonade et y former les cellules de Sertoli (Karl et Capel, 1998). Ces cellules sont les premières cellules testiculaires qui se différencient à 11,5 jpc et produisent l'AMH, hormone peptidique spécifique de ces cellules, qui induit la régression des canaux de Müller. *Sry* induit la différenciation de cellules de

Gène	Phénotype	Fonction proposée
Arx	Les cellules de Leydig fœtales ne se différencient pas dans les gonades *Arx*$^{-/-}$.	*Arx* n'étant pas exprimé dans les cellules de Leydig, il doit agir comme facteur paracrine pour promouvoir la différenciation de ces cellules.
Dax1	La délétion de *Dax1* se traduit par une sévère anomalie de la morphologie du testicule.	Le taux de *Dax1* est crucial pour le développement testiculaire : trop ou trop peu et la formation des cordons est inhibée. *Dax1* agit en aval ou de façon parallèle à Sry pour permettre l'organisation des cordons séminifères et l'expression des marqueurs mâles.
Dhh	Il n'y a pas de différenciation des cellules de *Leydig* et de formation des cordons dans les gonades *Dhh*$^{-/-}$.	*Dhh* doit être impliqué dans le maintien d'un haut niveau d'expression de *Sf1* dans les précurseurs de cellules de Leydig.
Fgf9	La plupart des gonades *Fgf9*$^{-/-}$ ont une réversion sexuelle totale avec aucune expression des marqueurs mâles en aval de *Sry*.	*Fgf9* favorise la prolifération des précurseurs des cellules de Sertoli et pourrait être impliqué dans la suite de la différenciation des cellules de Sertoli. Il est également nécessaire à la survie précoce des cellules germinales XY.
Gata4/Fog2	Les gonades *Fog2*$^{-/-}$ *et Gata*$^{4ki-/-}$ XY ne développent pas de cordons testiculaires ni de types cellulaires spécifiques du testicule et de l'expression de *Sry* est diminuée.	*Gata4*/*Fog2* favorise l'expression de *Sry* et de ce fait l'expression et la différenciation des cellules de Sertoli.
Pdgfrα	Les gonades *Pdgfrα*$^{-/-}$ ont une formation anormale et retardée des cordons séminifères et un défaut de développement des cellules de Leydig. La migration cellulaire et la prolifération des cellules de l'épithélium coelomique sont également atteintes.	*Pdgfrα* agit en aval de *Sry* pour permettre la formation des cordons séminifères et la différenciation des cellules de Leydig.
Sox9	Les embryons *Sox9*$^{-/-}$ meurent avant que le phénotype cellulaire testiculaire puisse être testé. L'invalidation conditionnelle dans les cellules de Sertoli provoque une réversion sexuelle des gonades XY.	*Sox9* est considéré comme la cible directe en aval de *Sry*. En effet, il peut se substituter à *Sry* au niveau de toutes ses fonctions. Les cibles en aval de Sox9 incluent l'Amh.

Tableau 2 : Gènes impliqués dans la différenciation testiculaire. Ces résultats ont été obtenus ches la souris par l'utilisation des modèles KO ou transgéniques. *Arx*, aristaless related homeobox ; *Dax1*, DSS-AHC critical region on the X) ou nuclear receptor family 0 B1 (Nr0B1) ; *Dhh*, desert hedgehog ; *Fgf9*, fibroblast growth factor 9 ; *Fog2*, friend of *Gata2* ; *Gata4*, GATA binding protein 4, *Pdgfrα*, plateleted-derived growth factor receptor α; *Sox9*, Sry-like HMG-box protein 9. (D'après Brennan et Capel, 2004).

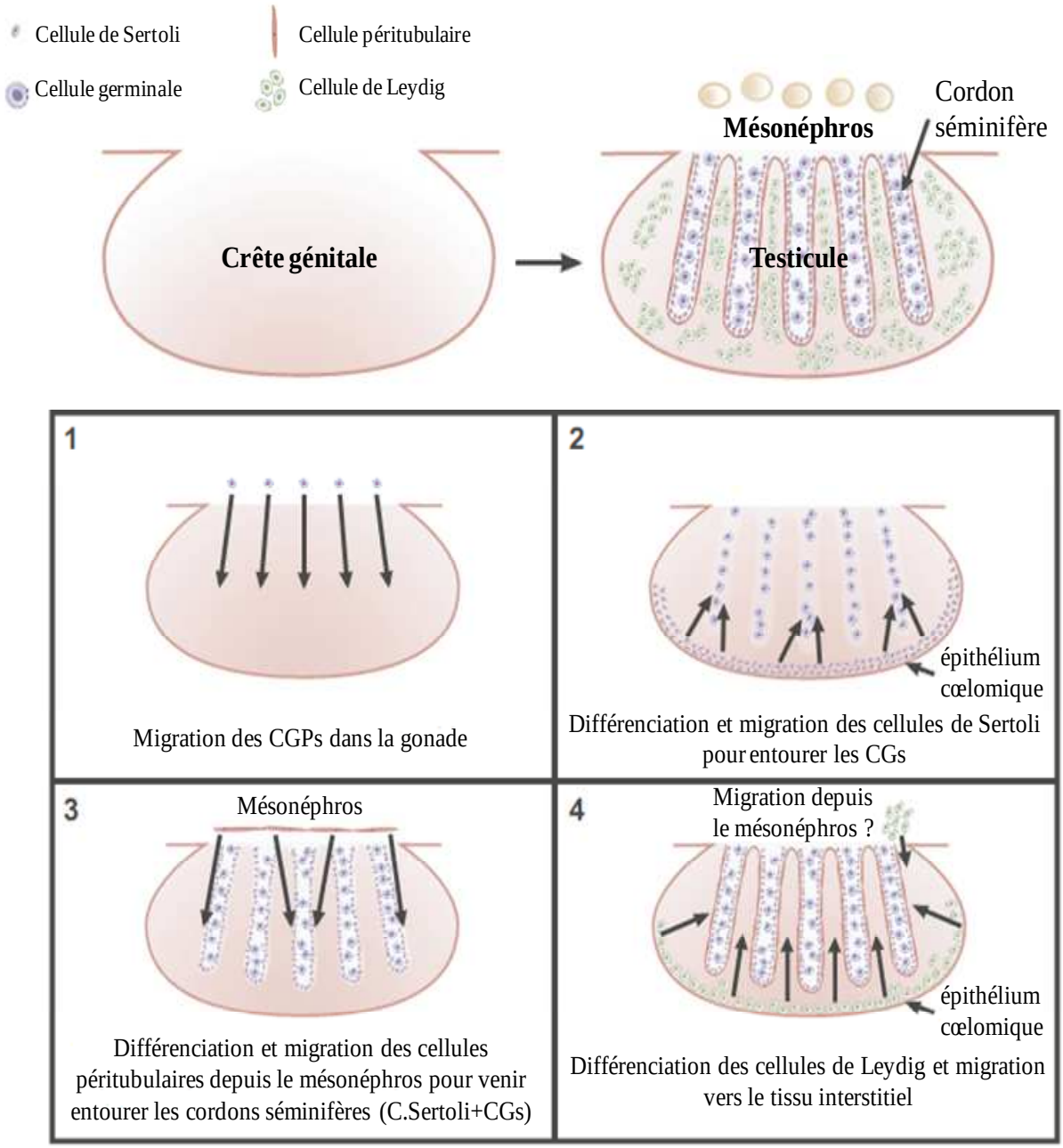


Figure 8 : Différenciation du testicule. La différenciation du testicule à partir de la gonade indifférenciée se fait en plusieurs étapes qui impliquent la migration des cellules germinales (CGs), la différenciation et la migration des cellules de Sertoli, puis des cellules péritubulaires et enfin des cellules de Leydig. (D'après Sharpe, 2006).

Sertoli puisqu'il est exprimé dans leurs précurseurs entre 10,5 et 12,5 jpc (Albrecht et Eicher, 2001). *Sox9* et *Fgf9* sont également impliqués dans leur différenciation (Kim et Capel, 2006). De plus, d'autres facteurs de transcription tels que SF1, WT1 et GATA4 sont décrits comme impliqués dans la régulation de l'expression du gène codant l'AMH (Arango et al., 1999). Les cellules de Sertoli englobent les CGs et donnent ainsi naissance à des cordons séminifères observés dès 12 jpc chez la souris (figure 8). Les cellules de Sertoli servent de cellules de soutien et de cellules nourricières aux CGs. Elles régulent également la prolifération, l'apport en hormones stéroïdes et la différenciation de CGs lors de la spermatogenèse.

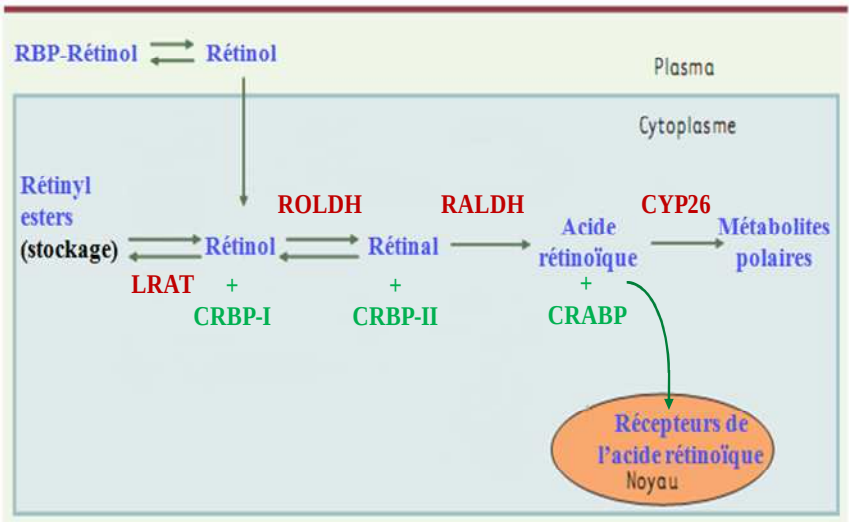
2.1.2.2. Les cellules de Leydig

Chez la souris, deux populations de cellules de Leydig sont distinguées : les cellules de Leydig embryonnaires (fœtales) qui disparaissent progressivement après la naissance, et la population adulte qui se forme durant la puberté et persiste pendant la vie adulte (Ross et Capel, 2005). Cette population produit la testostérone nécessaire à la spermatogenèse dès la puberté et pendant toute la vie.

L'origine des cellules de Leydig fœtales reste incertaine (O'Shaughnessy et al., 2006). Il semble qu'elles se différencient dans la région interstitielle (entre les cordons testiculaires) à partir des cellules mésenchymateuses à 12,5 jpc, c'est à dire 24 heures après la formation des cellules de Sertoli (Barsoum et Yao, 2006). Les cellules de Leydig sont essentielles pour la masculinisation du fœtus car elles synthétisent la testostérone une fois les cordons séminifères formés à environ 12,5 jpc. Cet androgène est nécessaire au maintien des canaux de Wolff et à leur différenciation en épididyme, canal déférent et vésicule séminale (Capel, 2000).

La différenciation des cellules de Leydig serait induite par des facteurs paracrines comme DHH (desert hedgehog) et PDGF (Platelet Derived Growth Factor) sécrétés par les cellules de Sertoli ou comme ARX (X-linked aristaless-related homeobox gene) exprimé dans les cellules interstitielles autres que les cellules de Leydig (fibroblastes, cellules myoïdes péritubulaires, cellules endothéliales) (voir tableau 2) (revue dans Brennan et Capel, 2004). DHH est une molécule sécrétée par les cellules de Sertoli à 11,5 jpc. Le gène *Patched 1* codant le récepteur de DHH est initialement exprimé dans l'espace interstitiel entre les cordons testiculaires (Yao et al., 2002). L'invalidation de *Dhh* aboutit à une diminution remarquable du nombre de cellules de Leydig fœtales (Barsoum et Yao, 2006). Concernant le facteur PDGF, l'inactivation de son récepteur (PDGFRα) provoque le blocage de la

(A)



(B)

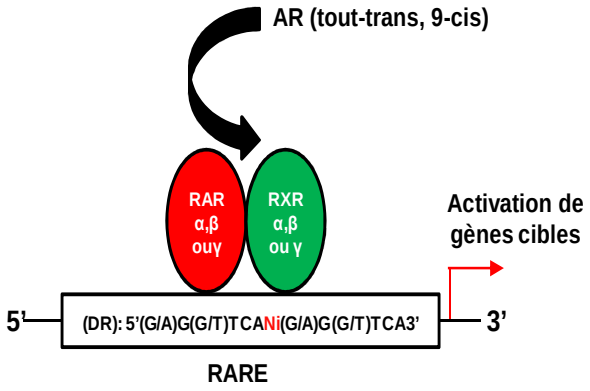


Figure 9 : Biosynthèse et mécanisme d'action de l'acide rétinoïque (AcR). (A) Le rétinol est le rétinoïde majoritaire dans le sang, provenant de la conversion du β-carotène et des rétinyl esters alimentaires dans l'intestin et/ou des rétinyl esters stockés dans le foie. Dans le sérum, le rétinol est lié à la RBP (retinol binding protein) pour être transporté jusqu'aux tissus cibles possédant des récepteurs de surface à la RBP. Deux familles de protéines cytoplasmiques, les cellular retinol-binding proteins (CRBP) et les cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP) pourraient aussi participer au métabolisme de la vitamine A. L'oxydation du rétinol en AcR est un processus enzymatique en deux étapes dont le rétinal est le métabolite intermédiaire : la première oxydation, réversible, est catalysée par une rétinol déshydrogénase (ROLDH) et la deuxième irréversible est catalysée par une rétinal déshydrogénase (RALDH). Les cellules cibles peuvent aussi synthétiser des esters de vitamine A. Cette réaction est catalysée par la LRAT (lecithin retinol acyltransférase). Les deux principales formes biologiquement actives de l'AcR sont l'acide rétinoïque tout-trans et l'acide rétinoïque 9-cis. (B) Mécanisme d'action de l'AcR. L'action de l'AcR s'exerce via deux types de récepteurs nucléaires : les RARs (retinoic acid receptor) et les RXRs (retinoid X receptor). Les RARs et les RXRs en se liant à des séquences d'ADN spécifiques, les RAREs (retinoic acid response element) et les RXREs (retinoid X response element), moduleront la transcription de gènes cibles. (D'après Parisotto et al., 2006).

prolifération et de la migration des cellules mésonéphrétiques ainsi que la différenciation des cellules de Leydig (Gnessi et al., 2000).

2.1.2.3. Les cellules germinales

Chez la souris, les gonocytes mâles, également appelés pro-spermatogonies sont divisés en pro-spermatogonies M (M = multiplying, car elles seraient mitotiquement actives), pro-spermatogonies T1 (T = transitionnelles) et pro-spermatogonies T2. Les pro-spermatogonies M sont localisées dans le centre du cordon testiculaire loin de la lame basale, elles prolifèrent et donnent naissance aux pro-spermatogonies T1 (Rouiller-Fabre et al., 2008; Phillips et al., 2010). Celle-ci arrêtent la prolifération et entrent en arrêt du cycle cellulaire mitotique en G0/G1, entre 12,5 et 14,5 jpc (Western et al., 2008). Elles reprennent la prolifération dans les jours qui suivent la naissance et donnent naissance aux pro-spermatogonies T2. Ces dernières migrent vers la lame basale et se différencient en spermatogonies qui entrent en méiose et donneront par la suite les spermatocytes puis les spermatozoïdes (Phillips et al., 2010).

Dans ce qui suit, nous allons aborder les événements cellulaires concernant les CGs mâles pendant la vie fœtale.

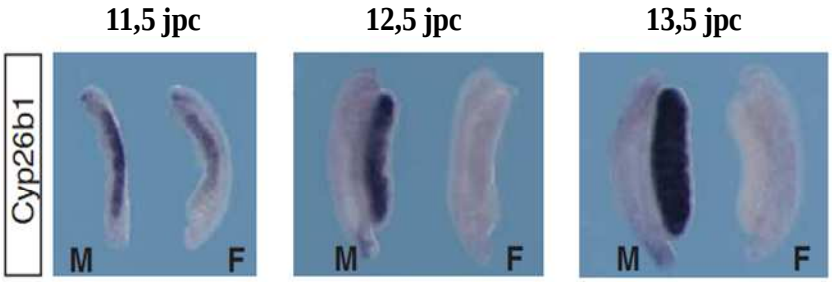
(a) Inhibition de l'entrée en méiose

Il a été montré que l'acide rétinoïque (AcR) (dérivé biologiquement actif de la vitamine A, figure 9) pourrait être impliqué dans l'induction de l'entrée en méiose des CGs. L'AcR tout trans est synthétisé suite à l'expression de l'enzyme RALDH2 à 10,5 jpc dans le mésonéphros. L'AcR synthétisé dans le mésonéphros diffuserait dans les gonades. Chez les individus XY, l'expression de *Raldh2* persiste jusqu'à 13,5 jpc, stade auquel l'AcR serait dégradé par l'action de l'enzyme CYP26B1 (Bowles et al., 2006).

Les enzymes CYP26 sont des membres de la famille des cytochromes P450, qui convertissent l'AcR en dérivés polaires directement excrétables. Trois membres de cette famille, CYP26A1, CYP26B1 et CYP26C1, ont été identifiés chez de nombreuses espèces dont l'homme (revue dans Taimi et al., 2004).

Les transcrits *Cyp26b1* sont détectés au stade 11,5 jpc dans les gonades des deux sexes, avec une expression plus forte dans les gonades XY. Cette expression atteint son maximum à 13,5 jpc (figure 10A) (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Ainsi, chez le mâle, l'entrée en méiose n'a lieu qu'à la puberté. Dans les testicules fœtaux de souris dont le gène *Cyp26b1* a été invalidé (*Cyp26b1*$^{-/-}$), les CGs entrent en méiose précocement (comme dans une gonade

(A)



(B)

Ovaire embryonnaire

Mésonéphros embryonnaire → AcR → CYP26B1 OFF → forte (AcR) → Stra8 ON → Initiation de la méiose

Testicule embryonnaire

Mésonéphros embryonnaire → AcR → CYP26B1 ON → faible (AcR) → Stra8 OFF → Pas d'initiation de la méiose

Figure 10 : Acide rétinoïque (AcR) et entrée en méiose. (A) Analyse de l'expression de *Cyp26b1* dans les gonades au cours du développement embryonnaire de souris mâles (M) et femelles (F). (B) Modèle proposé pour la régulation de l'initiation de la méiose dans les gonades embryonnaires. (D'après Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006).

XX). De même, les CGs des gonades XY (12,5 jpc) cultivées pendant 2 jours et traitées par le kétoconazole (inhibiteur non-spécifique des cytochromes P450) entrent aussi en méiose comme dans un ovaire fœtal (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Cette entrée en méiose des CGs à été constatée par l'expression des gènes impliqués dans la méiose tels que *Stra8* (Stimulated by retinoic acid gene 8), *Dmc1* (Disrupted Meiotic cDNA 1) et *Scp3* (Synaptonemal complex protein 3). Ainsi, CYP26B1 peut être considéré comme un facteur inhibiteur de la méiose spécifique du mâle (Bowles et Koopman, 2007).

Le gène *Stra8* code une protéine cytoplasmique (Oulad-Abdelghani et al., 1996) qui semble nécessaire pour préparer l'entrée en méiose des CGs femelles et mâles (Mark et al., 2008). Chez la souris, *Stra8* est exprimé dans les CGs pré-méiotiques. Son expression dans les testicules n'est détectée pour la première fois que quelques jours après la naissance (l'âge de la puberté chez la souris) (Koubova et al., 2006). La dégradation de l'AcR dans les testicules fœtaux par l'action de CYP26B1 empêchera la transcription du gène *Stra8* dans les CGs, tandis que le traitement de testicules fœtaux par le kétoconazole induit l'expression de ce gène (Koubova et al., 2006) (figure 10 B).

L'invalidation homozygote de *Stra8* conduit à une infertilité des individus mâles avec des gonades 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, détectée par la phosphorylation de H2AX (une isoforme de l'histone H2A), ainsi que la recombinaison méiotique, sont absentes dans ces cellules qui vont ensuite dégénérer par apoptose (Anderson et al., 2008).

Les travaux de Trautmann et al. montrent que le traitement par l'AcR de gonades XY fœtales cultivées à 11,5 et 13,5 jpc, induit la méiose à 11,5 mais pas à 13,5 jpc. De plus, l'expression de *Stra8* a été détectée dans les deux cas. Ceci indique que *Stra8* est nécessaire mais pas suffisant pour induire l'entrée en méiose des CGs (Trautmann et al., 2008).

Récemment, il a été montré, que *Nanos2*, qui code une protéine de liaison à l'ARN (RNA binding-protein) joue un rôle dans la différenciation des CGs mâles. *Nanos2* n'est exprimé que dans les CGs mâles à environ 13,5 jpc, moment de l'entrée en méiose des CGs femelles. Cela a conduit Suzuki et Saga à faire l'hypothèse que *Nanos2* serait impliqué dans l'inhibition de l'entrée en méiose des CGs mâles. En effet, les CGs mâles dans lesquelles *Nanos2* est invalidé, entrent en méiose peu avant de dégénérer par apoptose à 15,5 jpc. Pour empêcher l'apoptose afin de vérifier l'entrée en méiose de cellules *Nanos2*$^{-/-}$, Suzuki et Saga

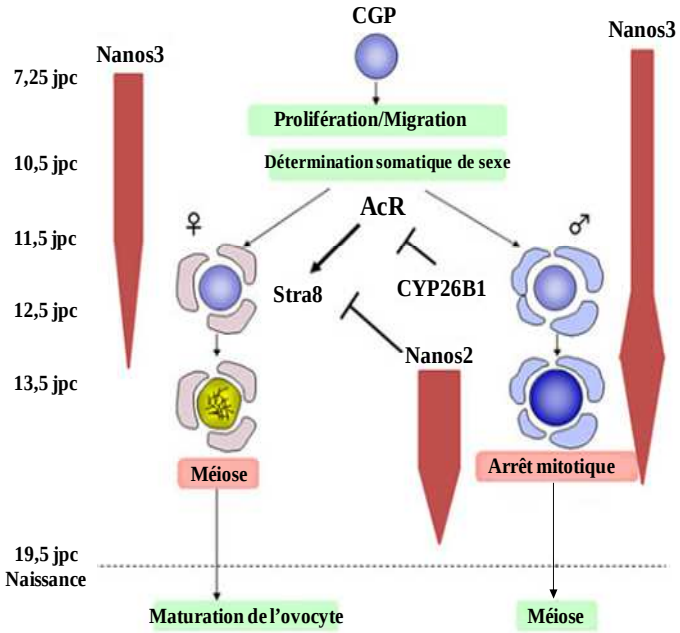


Figure 11 : Voies de développement impliquées dans la différenciation sexuelle des cellules germinales. Une fois les cellules germinales primordiales (CGPs) apparues à 7,25 jpc, elles prolifèrent et migrent vers le site des futures gonades dont les cellules somatiques commencent leur différenciation en exprimant les facteurs induisant la différenciation mâle ou femelle. L'acide rétinoïque (AcR) est produit par le mésonéphros dans les deux sexes, puis il diffusera dans la gonade. L'AcR sera dégradé par l'action de l'enzyme CYP26B1 dans la gonade fœtale mâle tandis que l'AcR induira l'expression de *Stra8* dans les CGs femelles qui vont ensuite entrer en méiose. En effet, l'expression de *Stra8* est réprimée d'abord par la dégradation de l'AcR par l'action de CYB26B1, ensuite par l'expression de *Nanos2* qui commence à environ 13,5 jpc dans les CGs mâles. Celles-ci n'entreront en méiose qu'à la puberté. (D'après Saga, 2010).

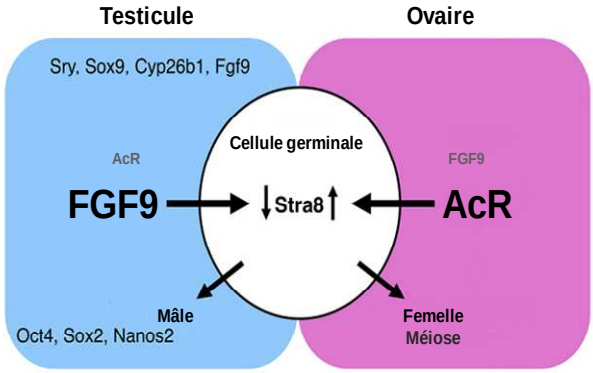


Figure 12 : L'acide rétinoïque (AcR) et FGF9 agissent de façon antagoniste en déterminant le destin des cellules germinales. La détermination sexuelle des cellules germinales se fait par deux molécules de signalisation produites par des cellules somatiques : AcR et FGF9. *Cyp26b1* et *Fgf9* sont fortement exprimés dans le testicule (bleu), tandis qu'ils sont réprimés dans l'ovaire (rose). En effet, CYP26B1 induit la dégradation de 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 agit de façon antagoniste sur l'expression de *Stra8* ; il 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).

ont généré des souris mâles invalidés pour *Nanos2* et *Bax* (gène pro-apoptotique). Leurs travaux montrent que les gènes marqueurs de la méiose comme *Scp3* et *Dmc1* sont exprimés dans les gonocytes *Nanos2*$^{-/-}$ *Bax*$^{-/-}$. De même, l'expression de *Stra8* chez ces mutants a été détectée à un niveau élevé entre 14,5 et 16,5 jpc, tandis qu'elle était réprimée à 13,5 jpc (Suzuki et Saga, 2008). Ceci indique que l'expression de *Stra8* est réprimée d'abord suite à la dégradation de l'AcR par l'action de CYP26B1, ensuite par l'expression de *Nanos2* (figure 11). Ainsi, CYP26B1 seul, ne semble pas suffisant pour bloquer l'entrée en méiose dans les CGs mâles. *Nanos2* est nécessaire pour réprimer complètement l'expression de *Stra8* à partir de 14,5 jpc et bloquer l'entrée en méiose (revue dans Saga, 2010). De plus, les CGs mâles invalidées pour *Cyp26b1*, n'expriment pas *Nanos2*, ce qui indique que l'AcR induit la dégradation de *Nanos2* lorsque *Cyp26b1* n'est pas exprimé (Suzuki et Saga, 2008).

Fgf9 semble également impliqué dans le blocage de l'entrée en méiose des gonocytes mâles. En effet, *Fgf9* exprimé par les précurseurs de cellules de Sertoli à environ 11,5 jpc, agit directement sur les CGs en réprimant l'expression de *Stra8* et en induisant l'expression de *Nanos2* (Bowles et al., 2010). Cette hypothèse sur le rôle joué par *Fgf9* sur la détermination de la différenciation des CGs mâles ainsi que les données connues sont représentées sur la (figure 12).

Ainsi, les CGs mâles n'entrent pas en méiose mais en quiescence pendant la vie fœtale. Cet état persiste jusqu'à après la naissance où elles reprennent la prolifération et entrent en méiose à environ 7 jours après la naissance.

(b) Entrée en quiescence (arrêt mitotique)

Western et al. ont analysé l'expression des gènes et des protéines impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire. Cette analyse a montré une activation de la protéine $P27^{Kip1}$ (membre de la famille des « Cdk inhibitor proteins » Cip/Kip, également appelé CDKN1B), et des protéines $P15^{INK4b}$ et $P16^{INK4a}$ (membres de la famille des « Cdk inhibitor protein INK4 », également appelés CDKN2B et CDKN2A, respectivement). Ces protéines sont impliquées dans l'inhibition des complexes Cycline D/cdk4/6 et CyclineE /cdk2, ce qui empêche la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (RB) et induit l'arrêt mitotique (Western et al., 2008).

La protéine RB joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire et plus précisément dans le blocage du cycle en G1. RB s'associe au facteur de transcription E2F qui est impliqué dans la transcription des gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse de

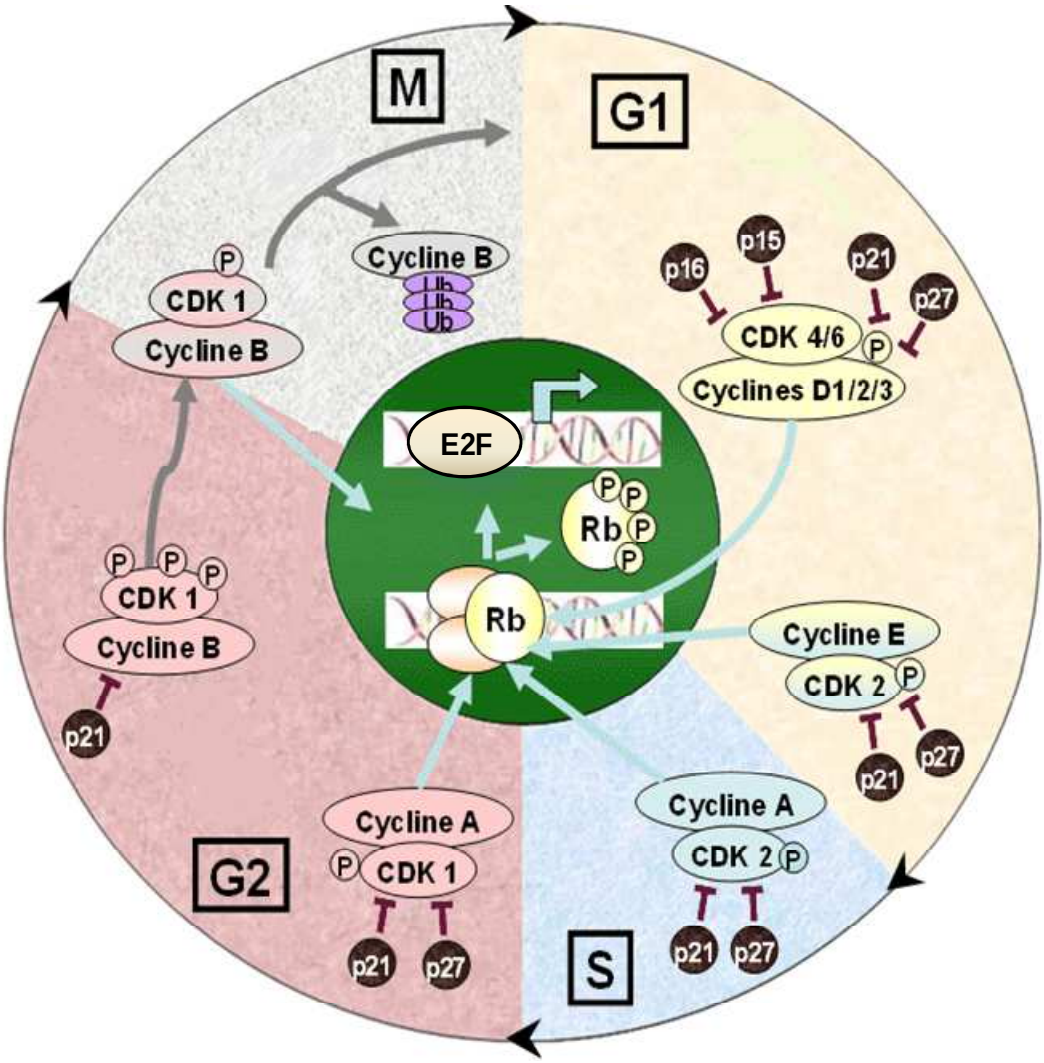


Figure 13 : Schéma représentatif de la régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/CDK et leurs inhibiteurs. Le cycle cellulaire est classiquement divisé en quatre phases: phase de croissance de la cellule (G1); phase de réplication de l'ADN (S); phase de croissance et de préparation à la mitose (G2) et la mitose (M). Les cyclines sont des protéines formées et dégradées au cours du cycle cellulaire. Chacune des phases du cycle cellulaire est caractérisée par l'expression d'un type particulier de cycline et les variations des taux des différentes cyclines régulent l'activité des différentes CDKs (kinases cyclines-dépendantes). Les CDKs, une famille de protéines kinases, sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique (CDK) et une sous-unité régulatrice (cycline). Le début du cycle cellulaire nécessite la transcription d'un certain nombre de gènes, tels ceux des cyclines D et E, des inhibiteurs $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$, $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ ainsi que des gènes qui sont sous le contrôle des facteurs de transcription de la famille E2F. Les cellules sont maintenues en phase G1 grâce à la protéine du rétinoblastome (RB). Cette protéine bloque le cycle cellulaire en s'associant avec E2F. Cependant, la phosphorylation de RB libère E2F et active la transcription des cyclines E et A nécessaires pour le passage à travers G1 et pour la phase S. (http://www.unilim.fr/theses/2006/sante/).

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 (figure 13).

L'expression de RB à été détectée dans les CGs mâles entre 12,5 et 15,5 jpc (Western et al., 2008). Les souris XY invalidées pour ce gène meurent, *in utero*, à environ 14,5 jpc suite à des défauts neuronaux, hématopoïétiques et placentaires. De ce fait, le rôle de RB dans la régulation de l'arrêt mitotique des CGs dans la gonade XY à été étudié par Spiller et son équipe dans un système de culture *ex-vivo*, où les gonades XY (14,5 jpc) invalidées pour *Rb* ont été cultivées pendant 48h. Cette étude a montré que le nombre de CGs est plus élevé (19%) dans la gonade KO à 14,5 jpc, ce qui indique que les CGs continuent leur prolifération à ce stade de développement. 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* codant des 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.

En plus de son implication dans le blocage de l'entrée en méiose des CGs mâles pendant la vie fœtale, *Nanos2* semble également jouer un rôle dans l'induction de l'arrêt mitotique de ces cellules. En effet, les CGs mâles invalidées pour *Nanos2* entrent en arrêt mitotique à 14,5 jpc comme dans une gonade normale, mais elles ne peuvent pas maintenir cet arrêt mitotique plus de 24h. Elles reprennent ensuite la prolifération et commencent à entrer en méiose peu avant qu'elles soient dégénère par apoptose à 15,5 jpc (Suzuki et Saga, 2008).

Les travaux de Trautmann et al. montrent que l'AcR pourrait être impliqué dans le blocage de l'arrêt mitotique des CGs mâles *in vitro* et *in vivo*. En effet, dans les gonades XY (13,5 jpc) cultivées pendant deux jours en présence d'AcR (10^{-6}M), les CGs continuent leur prolifération, tandis que cette prolifération diminue dans les gonades non traitées. De plus le blocage de l'action de CYP26B1 par le kétoconazole (inhibiteur non-spécifique des cytochromes P450), bloque également l'arrêt mitotique des CGs. De même, l'administration de l'AcR par voie orale en une seule dose (100 mg/kg) à des souris gestantes induit la prolifération des CGs des testicules fœtaux à 15,5 jpc, comme l'indique l'incorporation de BrdU (Bromodéoxyuridine) (Trautmann et al., 2008).

Ainsi, la dégradation de l'AcR dans le testicule fœtal semble nécessaire, d'une part, pour inhiber la voie femelle (initiation de la méiose) ; et d'autre part, pour induire la voie mâle (arrêt mitotique des CGs) (Trautmann et al., 2008).

2.2. Voie femelle

Chez la femelle, la différenciation des CGs devient évidente à 13,5 jpc (figure 5) et elles entrent en méiose pendant la vie fœtale. Les gènes impliqués dans leur différenciation ainsi que les facteurs contrôlant leur entrée en méiose seront abordés dans les paragraphes suivants.

2.2.1. Déterminisme génétique

Entre 11,5 et 12,5 jpc, la gonade bipotentielle semble être orientée vers la voie femelle par l'induction de l'expression de certains gènes tels que *Wnt4* [wingless-related MMTV (murine-mammary-tumour-virus) integration site 4]. Ce gène est exprimé initialement dans la gonade bipotentielle, son expression est ensuite réprimée dans la gonade XY alors qu'elle persiste dans l'ovaire à 12,5 jpc. *Wnt4* est impliqué dans l'inhibition de la migration des cellules endothéliales à partir du mésonéphros dans la gonade XX. L'action de WNT4 passe par l'activation de l'expression de la Follistatine (protéine de la famille du TGFβ). L'invalidation de *Wnt4* mène à une masculinisation partielle des gonades XX (Yao et al., 2004).

Foxl2 (forkhead box L2) semble aussi impliqué dans la différenciation ovarienne et spécifiquement dans la formation des follicules ovariens. Il code un facteur de transcription de type forkhead. Le knock-out de ce gène induit l'expression des gènes tels que *Sox9*, *Fgf9*, *Wt1*, *Gata4*, *Dhh*, *Sf1*, *Dmrt1* (doublesex- and mab-3-related transcription factor 1) et *Fgfr2*, impliqués dans la différenciation testiculaire. Ceci indique l'implication de ce gène dans la répression de la voie mâle (Ottolenghi et al., 2005).

Le gène *Rspo1* code un facteur de croissance de type « secreted growth factors» de la famille R-SPONDIN, qui semble être nécessaire pour le développement ovarien. Il est exprimé dans les cellules somatiques de la gonade bipotentielle des deux sexes à 11,5 jpc. Son expression ne sera maintenue que dans la gonade XX à partir de 12,5 jpc. L'invalidation de *Rspo1* dans la gonade XX conduit à une répression de l'expression de *Wnt4*. En revanche, l'expression de *Rspo1* n'est pas affectée dans la gonade XX dont *Wnt4* est invalidé, indiquant que RSPO1 agit en amont de WNT4. De plus, l'expression de *Sox9* augmente dans la gonade

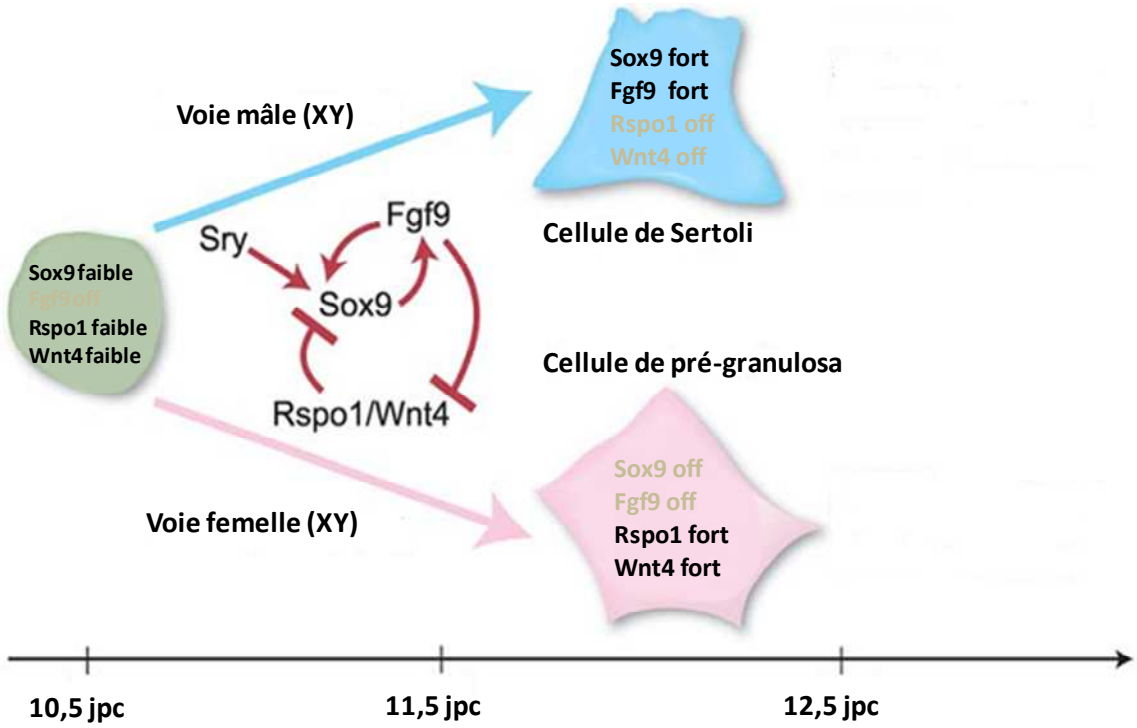


Figure 14 : Détermination somatique du sexe chez la souris. Schéma représentatif de la différenciation d'une cellule somatique « de soutien » (en vert) en cellule de Sertoli (en bleu) chez le mâle et en cellules de la pré-granulosa (en rose) chez la femelle. Le gène de la détermination du sexe mâle *Sox9* s'exprime faiblement dans les cellules somatiques de la gonade bipotentielle, tandis que *Fgf9* n'est pas exprimé. L'expression des gènes de la détermination du sexe femelle, *Rspo1* et *Wnt4*, est également faible dans les cellules somatiques de la gonade bipotentielle.
Dans la gonade XY, l'expression de *Sox9* et *Fgf9* seraient induites suite à celle de *Sry*, *Fgf9* réprime l'expression de *Wnt4* et induit ainsi la différenciation mâle.
Dans la gonade XX, il n'y a pas de *Sry* donc peu d'expression de *Fgf9* et de *Sox9*. *Rspo1* réprime l'expression de *Sox9* et induit celle de *Wnt4* activant ainsi la différenciation femelle. (D'après Kocer et al., 2009).

XX invalidée pour *Rspo1*. Ainsi, *Rspo1* semble être impliqué dans l'inhibition de la détermination sexuelle mâle (Chassot et al., 2008). La figure 14 présente un modèle de détermination somatique du sexe chez la souris (Kocer et al., 2009).

2.2.2. Différenciation ovarienne

Les CGs arrêtent la division mitotique dans les ovaires en constituant un stock d'ovogonies. Les ovogonies et les cellules somatiques (pré-granulosa) s'organisent en structures épithéliales qui sont en continuité avec la surface épithéliale des ovaires (cortex). Ces structures sont nommées cordons ovigères (CO) (Guigon et Magre, 2006). Les ovaires différenciés sont alors organisés précocement en deux compartiments distincts : les CO et le tissu interstitiel. A l'intérieur des CO, les ovogonies subissent une réplication d'ADN et entrent en prophase de première division méiotique à environ 13,5 jpc. Les ovogonies sont désormais appelées ovocytes I. La prophase méiotique se poursuit dans les ovocytes primaires et se bloque au stade diplotène, tandis que chaque ovocyte s'entoure d'une couche de cellules somatiques, les cellules de granulosa, pour former un follicule primordial (figure 15) (Guigon et Magre, 2006).

2.2.2.1. Entrée en méiose

Chez la souris les ovocytes entrent en prophase de première division méiotique à environ 13,5 jpc et passent les stades leptotène, zygotène et pachytène avant de s'arrêter au stade diplotène. Comme chez les mâles, l'entrée en méiose des CGs femelles dépend également de la présence d'AcR (Bowles et al., 2006). Celui-ci provoque l'entrée en méiose des CGs dans l'ovaire à environ 13,5 jpc et induit l'ovogenèse. De plus, la signalisation induite par l'AcR implique ses récepteurs RAR qui sont exprimés dans les CGs. En effet, dans les gonades XX traitées par un panantagoniste des RAR, les CGs n'entrent pas en méiose (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Cette étude est en accord avec les travaux de Livera et son équipe, qui montrent que le traitement par l'AcR des gonades XX (14,5 jpc) de rat cultivées pendant 3 jours accélère l'entrée en méiose des CGs (Livera et al., 2000).

L'enzyme CYP26B1 qui dégrade l'AcR est exprimée à 11,5 jpc dans les gonades XX, mais plus faiblement que dans les gonades XY. A partir de ce stade de développement, l'expression de *Cyp26b1* n'est plus détectable dans les gonades XX (figure 10A) (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Dans les gonades XX invalidées pour *Cyp26b1*, les CGs entrent en méiose plus précocement que dans des gonades XX normales. Cette entrée en

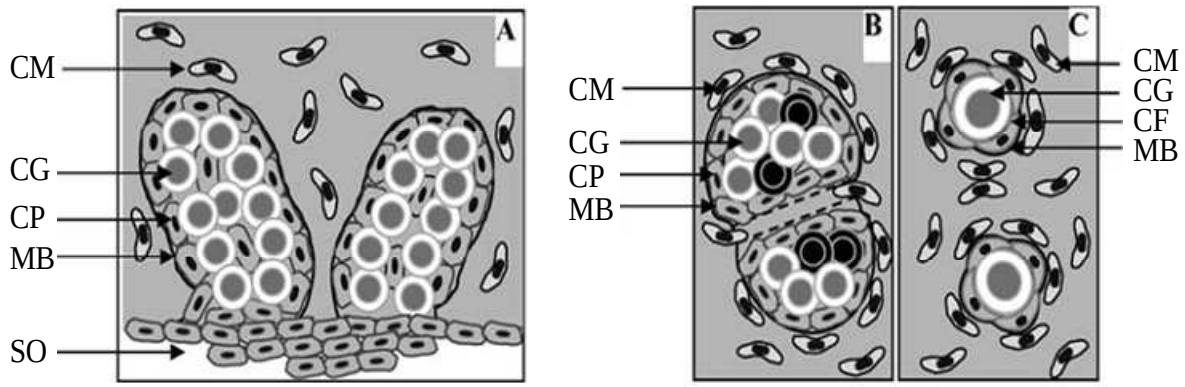


Figure 15 : Représentation schématique des différentes étapes de la différenciation ovarienne. A) Des cordons ovigères composés de cellules germinales (CG) et de cellules de pré-granulosa (CP), limités par une membrane basale (MB), se forment peu à peu. Ces cordons sont en contact avec la surface de l'ovaire (SO) et des cellules mésenchymateuses (CM) se trouvent dans l'espace interstitiel. B) Les cordons ovigères se fragmentent, la membrane basale est détruite, certaines cellules germinales meurent par apoptose (en noir) alors que d'autres s'arrêtent en première division de méiose. C) Les follicules primordiaux résultent de cette fragmentation et de cette réorganisation. Dans un follicule, une cellule germinale est entourée d'une couche de cellules folliculaires (CF). (D'après Guigon et Magre, 2006).

méiose précoce résulterait d'une accumulation précoce de l'AcR dans l'ovaire fœtal suite à l'absence totale de CYP26B1 (Bowles et al., 2006). Ainsi, l'expression de *Cyp26b1* semble contrôler le moment de l'entrée en méiose des CGs dans l'ovaire (Bowles et Koopman, 2007).

Comme chez le mâle, l'expression du gène *Stra8* est également nécessaire pour l'entrée en méiose des CGs femelles. Son expression est détectée dans les ovaires embryonnaires avant l'initiation méiotique (Koubova et al., 2006). Chez les embryons XX déficients pour ce gène, les CGs continueraient leur développement normalement jusqu'au moment de l'entrée en méiose, où ces cellules ne peuvent pas montrer la condensation chromosomique caractéristique de la prophase de la première division méiotique (Baltus et al., 2006). De plus, la formation des cassures double-brins dans les chromosomes homologues ne semble pas se produire dans les CGs des ces mutants. Celles-ci ne seraient donc pas engagées dans la recombinaison méiotique (Baltus et al., 2006).

Nanos2, qui joue un rôle dans le blocage de l'entrée en méiose des CGs mâles, n'est pas exprimé chez la femelle. Cependant, chez des souris transgéniques pour ce gène, on observe une absence d'entrée en méiose suite à l'inhibition de l'expression de *Stra8* dans les CGs (Suzuki et Saga, 2008).

Récemment, une étude a montré que dans les gonades XX (11,5 jpc) cultivées séparément du mésonéphros pendant quatre jours dans un milieu dépourvu de rétinoïde, les CGs entrent en méiose. Ceci indique que l'AcR produit par le mésonéphros est nécessaire pour la progression de la méiose mais pas pour son initiation. Ces travaux montrent également que le testicule fœtal sécrète en plus de CYP26B1 d'autres facteurs qui inhibent la méiose des CGs femelles, lorsque ce testicule est co-cultivé avec une gonade XX de 11,5 jpc. Ces facteurs sont sécrétés par des cellules somatiques du testicule (cellules de Sertoli et cellules interstitielles) (Guerquin et al., 2010).

Ainsi, les CGs entrent en prophase de la première division méiotique et se bloquent au stade diplotène pendant la vie fœtale. Cette entrée en méiose pendant la vie fœtale est caractéristique de la femelle. Les CGs vont ensuite s'associer à des cellules somatiques pour former les follicules primordiaux pendant la période périnatale.

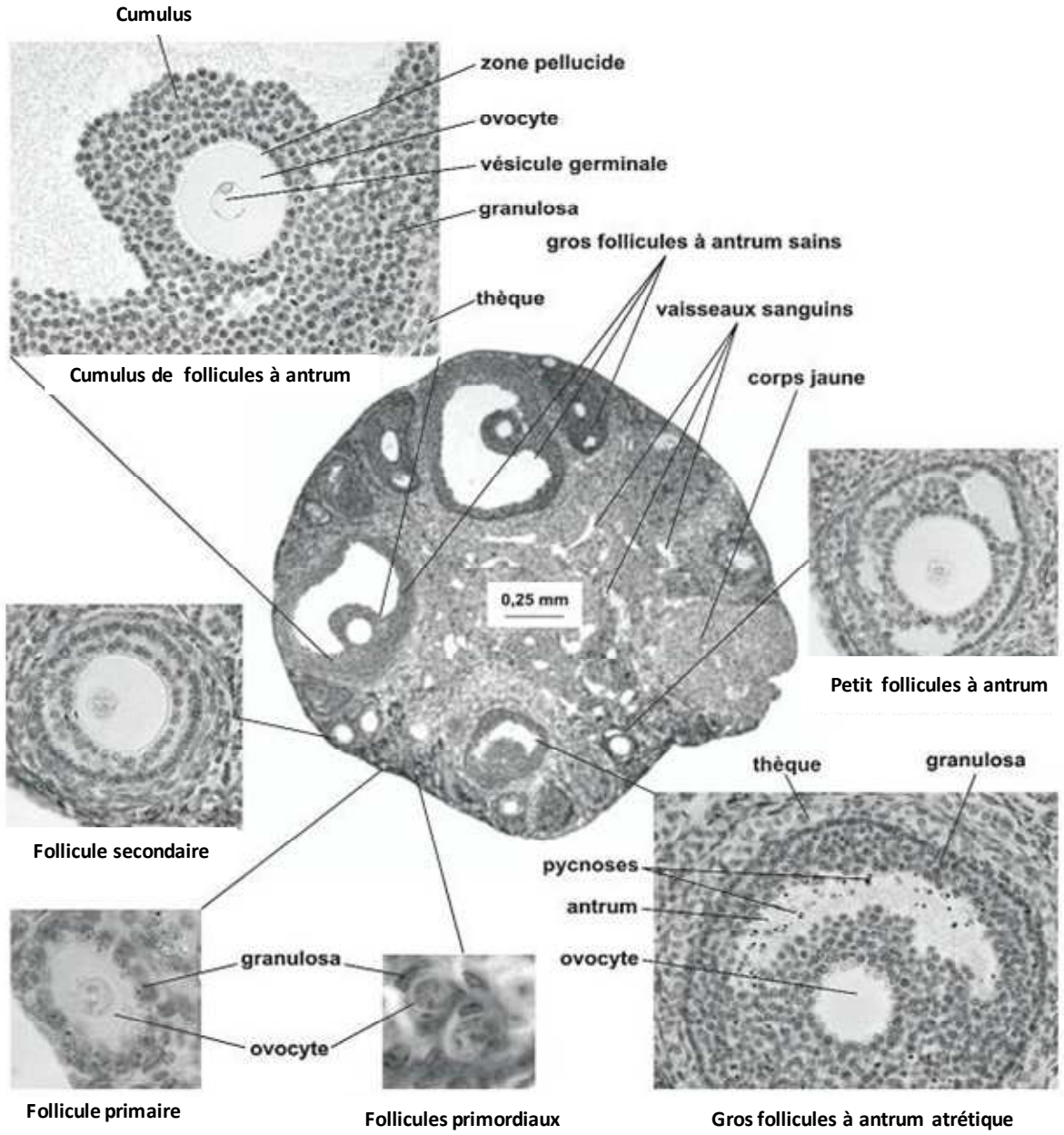


Figure 16 : Coupe histologique d'un ovaire de souris adulte et principaux types de follicules ovariens. (D'après Monniaux et al., 2009).

2.2.2.2. Folliculogenèse

La folliculogenèse correspond à la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où il se met en place lors de la vie fœtale jusqu'à sa rupture au moment de l'ovulation.

Juste après la naissance, le cortex ovarien forme des follicules primordiaux constitués de cellules de granulosa aplaties entourant un ovocyte bloqué en fin de prophase I de méiose (stade diplotène). Le blocage de la méiose perdurera jusqu'à l'ovulation. Après initiation de la croissance du follicule primordial, le follicule devient primaire (les cellules folliculaires se transforment en cellules cubiques). A partir de deux couches de cellules de granulosa, le follicule est appelé follicule secondaire. C'est à ce stade qu'apparaît la zone pellucide entourant l'ovocyte. A la fin de la croissance du follicule secondaire, les cellules de la thèque apparaissent en dehors de la membrane basale (Slavjanski), le follicule devient préantral. La taille du follicule augmente par multiplication des cellules de la granulosa. Des espaces intercellulaires se constituent. Au stade de follicule tertiaire une cavité se forme au sein des cellules de la granulosa, l'antrum. La thèque externe apparaît par différenciation des certaines cellules de la thèque interne qui deviennent polyédriques. La croissance s'accélère par augmentation du volume de l'antrum jusqu'à former le follicule pré-ovulatoire ou follicule de De Graaf (figure 16) (Monniaux et al 2009). Dans l'espèce humaine, dès la vie fœtale et tout au long de la vie, le stock des follicules primordiaux diminue par atrésie folliculaire : 7 millions à 20 semaines de vie fœtale, 1-2 millions à la naissance, 400000 à la puberté. À partir de la puberté, seul un faible pourcentage des follicules va entrer en croissance pour donner le ou les follicules ovulatoires, les autres entreront en atrésie par phénomène d'apoptose (Monniaux et al 2009). Pendant la croissance du follicule du stade primordial au stade pré-ovulatoire, l'ovocyte entre également en croissance. Il reprend la méiose après le pic de LH et reste bloqué en métaphase II. Après l'ovulation, l'ovocyte sera activé par le spermatozoïde au moment de la fécondation et il achèvera alors sa méiose. S'il n'y a pas de fécondation, l'ovocyte dégénérera (Guigon et Magre, 2006).

En 2004, une étude de Johnson et al. a montré l'existence des cellules germinales souches dans l'ovaire des souris postnatales. Ces cellules serviraient à régénérer la réserve folliculaire chez l'adulte (Johnson et al., 2004). Cependant, ces résultats ont donné lieu à une forte controverse et seront repris dans la discussion de la partie I.

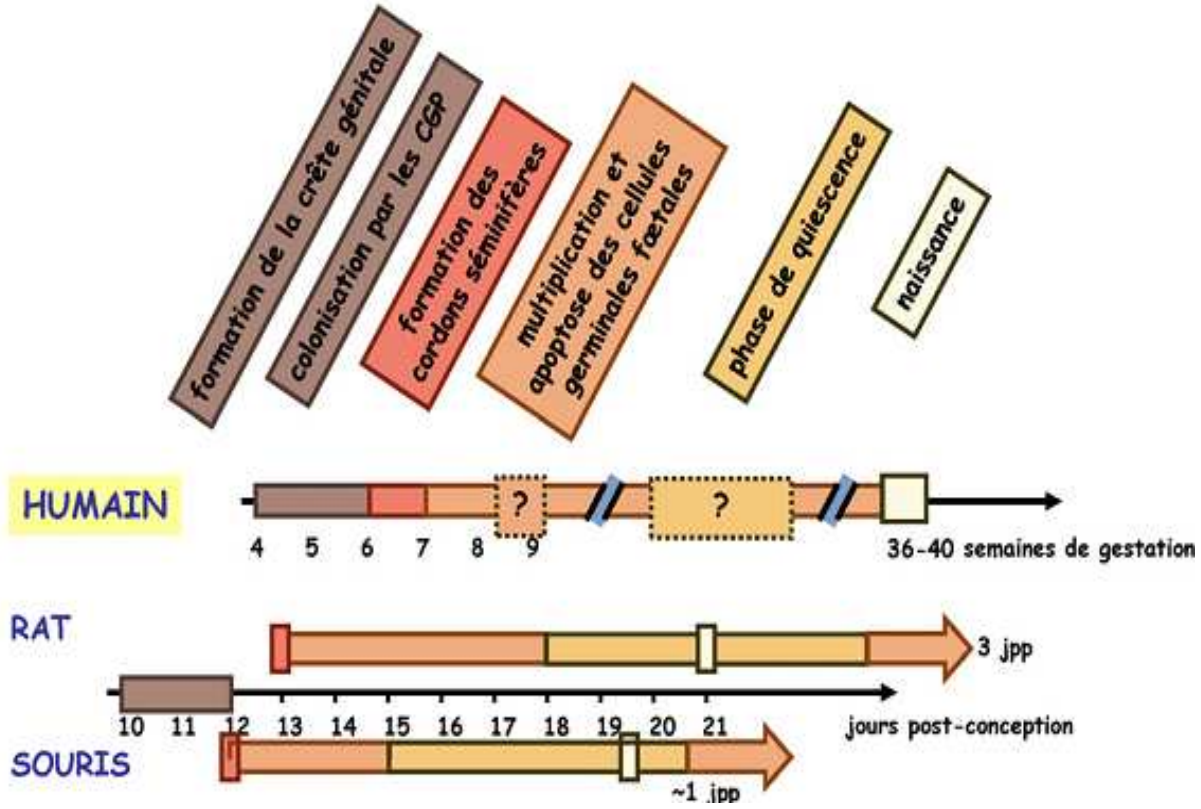


Figure 17 : Différenciation de la lignée germinale chez l'homme et chez les rongeurs. L'existence d'une phase de quiescence dans les cellules germinales fœtales n'a pas été décrite chez l'homme. (D'après Rouiller-Fabre et al., 2008).

3. Caractéristiques de la différenciation des cellules germinales chez l'homme

Chez l'homme, aucune étude n'est venue confirmer que les CGPs sont originaires de l'épiblaste proximal proche de l'ectoderme extra-embryonnaire comme cela a été montré chez la souris. Ces cellules passent dans le mésoderme extra-embryonnaire, puis, au début de la 4ème semaine de gestation dans l'endoderme du sac vitellin et, enfin, dans le pédicule allantoïdien. Les mouvements de ces cellules sont alors essentiellement passifs et résultent des modifications morphogénétiques de l'embryon lors de la gastrulation. Elles migrent ensuite, par un processus actif, du pédicule allantoïdien via le tube digestif vers le mésentère dorsal. Elles atteignent les crêtes génitales vers la 5ème semaine et finissent de les coloniser lors de la 6ème semaine. La formation des cordons séminifères s'achève à la 7ème semaine (figure 17) (Rouiller-Fabre et al., 2008).

Une forte prolifération des CGs est également observée chez l'homme. Lors du premier trimestre de gestation, le nombre de CGs passe d'environ 2000 cellules à six semaines de gestation à 40000 à neuf semaines, puis il augmente encore entre la 11ème et la 16ème semaine pour passer d'environ 100000 à 600000 cellules. Au troisième trimestre ce nombre est de 4 millions environ (Rouiller-Fabre et al., 2008).

Chez l'humain, peu de données peuvent être trouvées sur l'existence d'une phase de quiescence dans les CGs fœtales mâles (figure 17) (Rouiller-Fabre et al., 2008).

Dans l'ovaire humain, l'entrée en méiose a été constatée à partir de 11 semaines post fécondation (spf) en détectant l'expression de *SPO11* et *SCP1* d'abord, suivies par celle de *DMC1*. Ce décalage dans l'expression des marqueurs de la méiose suggère la possibilité d'une régulation par des mécanismes différents (Le Bouffant et al., 2010). Il a également été montré que, dans l'ovaire humain, l'entrée en méiose des CGs est corrélée avec l'augmentation de l'expression de RALDH1 (l'enzyme qui synthèse l'AcR). Ceci indique la nécessitée de l'AcR dans l'initiation de la méiose. Cependant, l'entrée en méiose des CGs, dans un ovaire fœtal (8 spf) cultivé pendant quatre semaines en présence d'AcR, n'a pas été observée. Ce qui indique que l'AcR n'est pas suffisant pour déclencher complètement la méiose dans l'ovaire humain. De plus, l'expression de CYP26B1 (l'enzyme qui dégrade l'AcR) n'est pas affectée pendant l'initiation de la méiose dans l'ovaire humain (Le Bouffant et al., 2010).

Ainsi, dans l'ovaire humain, l'initiation de la méiose ne semble dépendre que partiellement de l'AcR. La progression ainsi que la régulation de ce processus semblent être différentes entre l'homme et la souris.

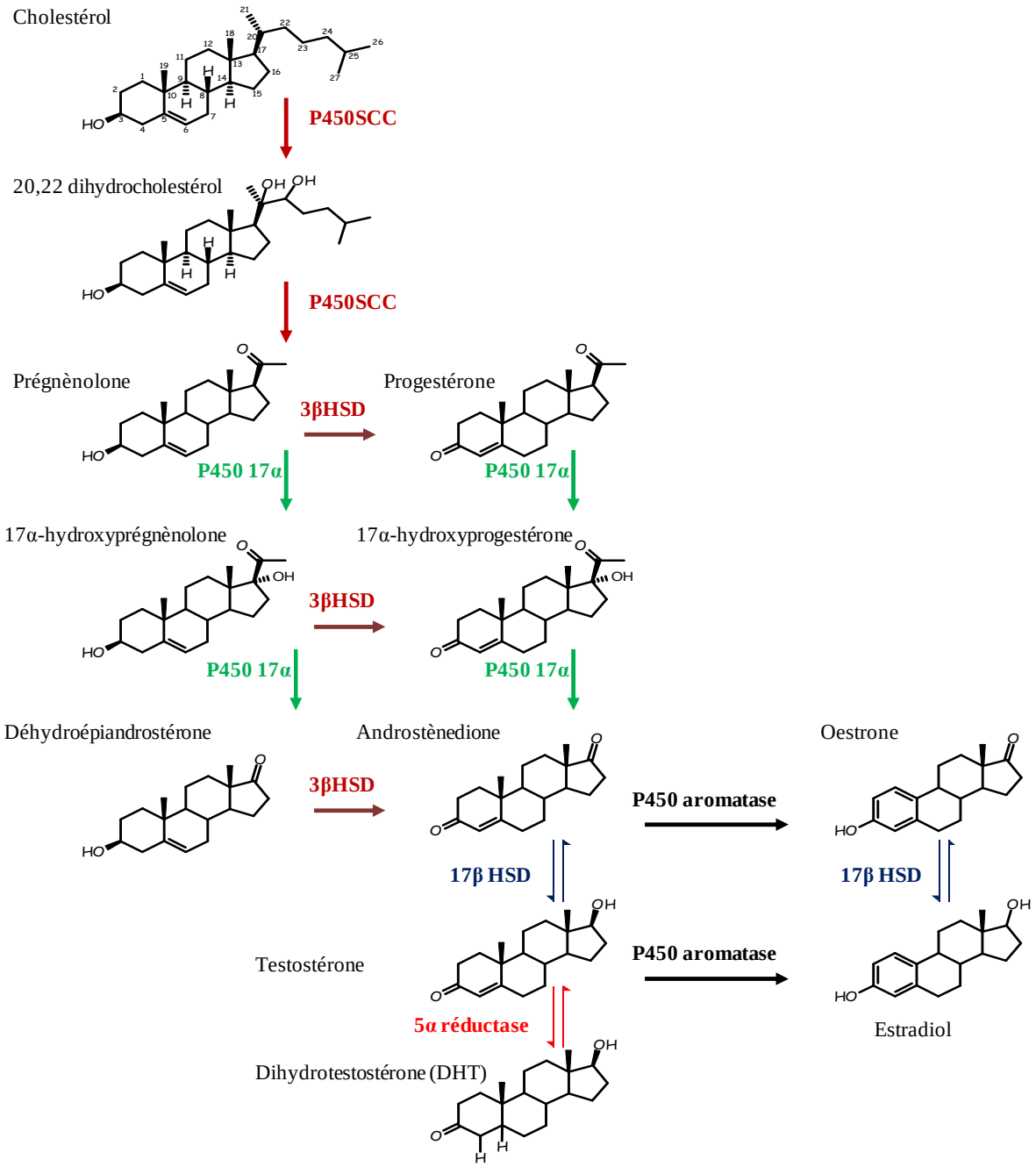


Figure 18 : Etapes principales de la production des hormones stéroïdes sexuelles chez les mammifères.

II. CONTRÔLE DE LA FONCTION DE REPRODUCTION MÂLE PAR LES STEROÏDES

1. Les hormones stéroïdes et leurs récepteurs

1.1. Stéroïdogenèse

Les hormones stéroïdes sont synthétisées à partir du cholestérol à l'issue de plusieurs réactions enzymatiques. Le cholestérol est synthétisé dans les cellules stéroïdogènes à partir de l'acétyl-CoA et du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) par l'enzyme HMG-CoA réductase.

L'étape clé et limitante de la biosynthèse des stéroïdes sexuels est la coupure de la chaîne latérale du cholestérol. Le cholestérol est transformé successivement en 20,22-dihydroxycholestérol et prégnènolone, par l'enzyme cytochrome P450scc (side chain clivage, SCC) présent dans la membrane mitochondriale.

Au niveau du réticulum endoplasmique, prégnènolone et progestérone sont converties en androstènedione, précurseur des androgènes qui possèdent 19 atomes de carbone, par l'action de la 17α-hydroxylase. Sous l'action de la 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase (17βHSD) et de la 5α-réductase, l'androstènedione est convertie successivement en testostérone et dihydrotestostérone (DHT). Il faut préciser que la DHT est non-aromatisable (figure 18) (Miller, 1988).

Les œstrogènes résultent de l'aromatisation des androgènes par l'enzyme cytochrome P450 aromatase présente dans le réticulum endoplasmique (figure 18) (Miller, 1988).

Les trois œstrogènes naturels sont le 17β-œstradiol (œstradiol ou E_2) qui constitue l'œstrogène le plus actif car il possède la meilleure affinité pour les récepteurs des œstrogènes. L'œstrone (E1) et l'œstriol (E3) sont des métabolites de l'E_2. Ces œstrogènes jouent un rôle important dans la différenciation du sexe femelle. Ils sont produits dans les cellules des follicules ovariens (cellules de la thèque interne et cellules de la granulosa).

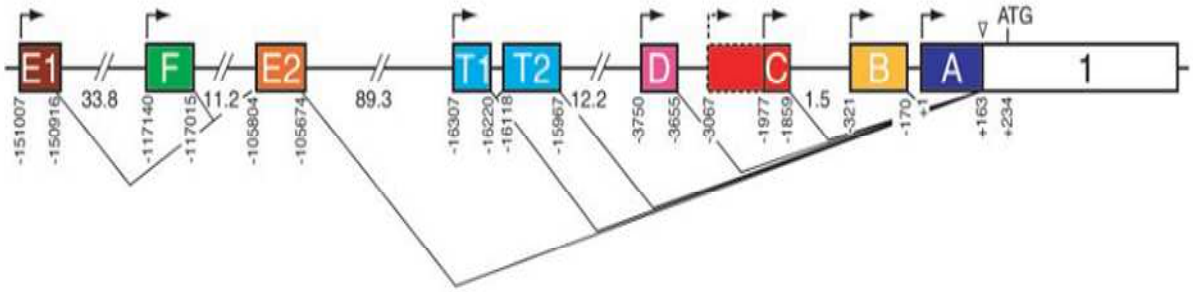


Figure 19 : Organisation génomique de la région promotrice du gène *ERα* humain. Les rectangles colorés représentent les différents exons selon la nomenclature actuelle. Les nombres situés en dessous des exons indiquent leur distance par rapport au premier site de début de la transcription (+1). Les nombres situés entre les exons indiquent la taille des introns en kilo bases. Le site commun accepteur d'épissage est indiqué par un triangle. (D'après Kos et al., 2001).

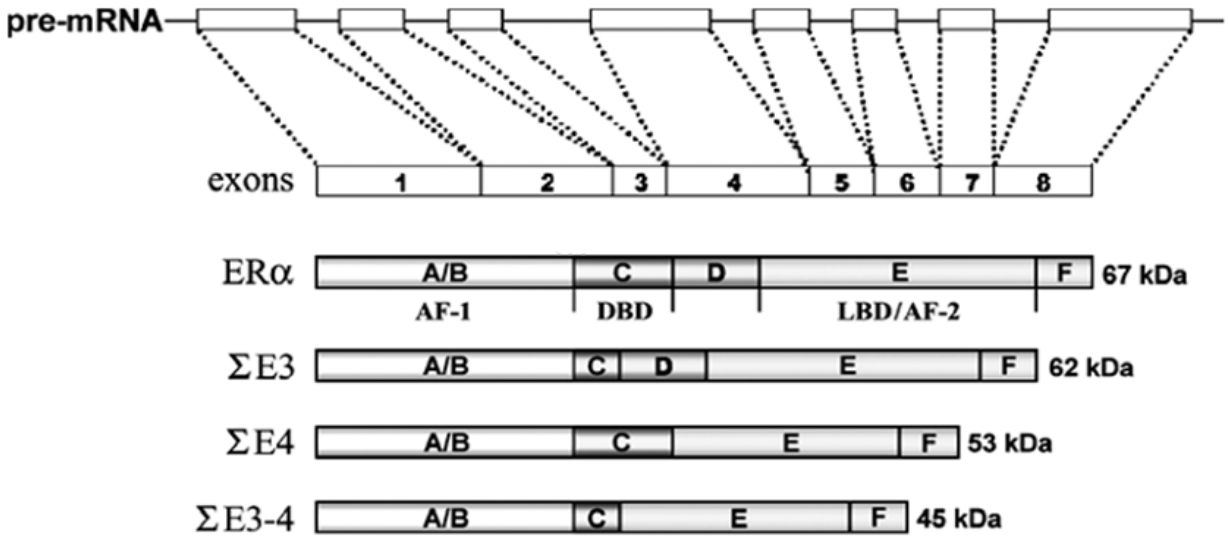


Figure 20 : Les isoformes de ERα. Le pré-ARNm de ERα contient 8 exons séparé par de longs introns. Les isoformes Σ E3, Σ E4 et Σ E3-4 sont délétées des exons 3 et 4. (D'après Ascenzi et al., 2006).

1.2. Récepteurs des stéroïdes

1.2.1. Les récepteurs des œstrogènes (ERs)

Les ERs sont des facteurs de transcription qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et à la classe des récepteurs des hormones stéroïdes.

1.2.1.1. Le récepteur ERα

(a) Le gène codant ERα

Le gène codant le récepteur ERα, nommé *ESR1*, est localisé sur le bras long du chromosome 6 en position q25.1. Il est constitué de huit exons codants séparés par sept introns, qui s'étendent sur environ 140 kb. La comparaison de la séquence de l'ADNc de l'*ERα* humain avec celle du poulet, du rat ou encore de la souris montre un haut niveau de conservation entre ces espèces excepté pour l'extrémité 5'. Cependant, l'analyse d'autres membres de la famille des récepteurs nucléaires indique que la présence de multiples promoteurs est une caractéristique commune des récepteurs des hormones stéroïdiennes (Kos et al., 2001). Ainsi, de nombreux exons situés en amont de l'exon 1 et correspondant à une région 5' non traduite de l'ARNm de *ERα* ont été identifiés (figure 19). Ils sont au nombre de 8 et sont nommés A, B, C, D, E, F, T1 et T2. Il existe également sept promoteurs différents situés en amont de chacun des exons (un seul promoteur pour les exons T1 et T2) (Kos et al., 2001).

(b) Les différents variants d'ARNm

En plus des variants correspondant à l'utilisation différentielle des sept promoteurs, des variants issus d'épissage alternatif sont détectés dans de nombreux tissus tels que le sein, l'endomètre ou encore l'hypophyse. De tels variants sont également trouvés dans de nombreuses variétés de tumeurs incluant les tumeurs mammaires, les carcinomes de l'endomètre et les méningiomes. Bien que beaucoup de ces variants aient été majoritairement détectés dans les tissus cancéreux, les études réalisées ont été incapables de démontrer une différence dans leur niveau d'expression par rapport aux tissus sains suggérant que ces variants pourraient aussi jouer un rôle dans les processus physiologiques. Les variants les plus fréquents sont ceux présentant une délétion des exons 3 et/ou 4. Leur traduction engendre pour la plupart des protéines tronquées (figure 20) (Ascenzi et al., 2006). Une protéine ERα tronquée de 46 kDa a été mise en évidence par Flouriot et ses collègues. Elle serait produite à partir d'un codon d'initiation interne et serait dépourvue de l'exon 1 et par conséquent des

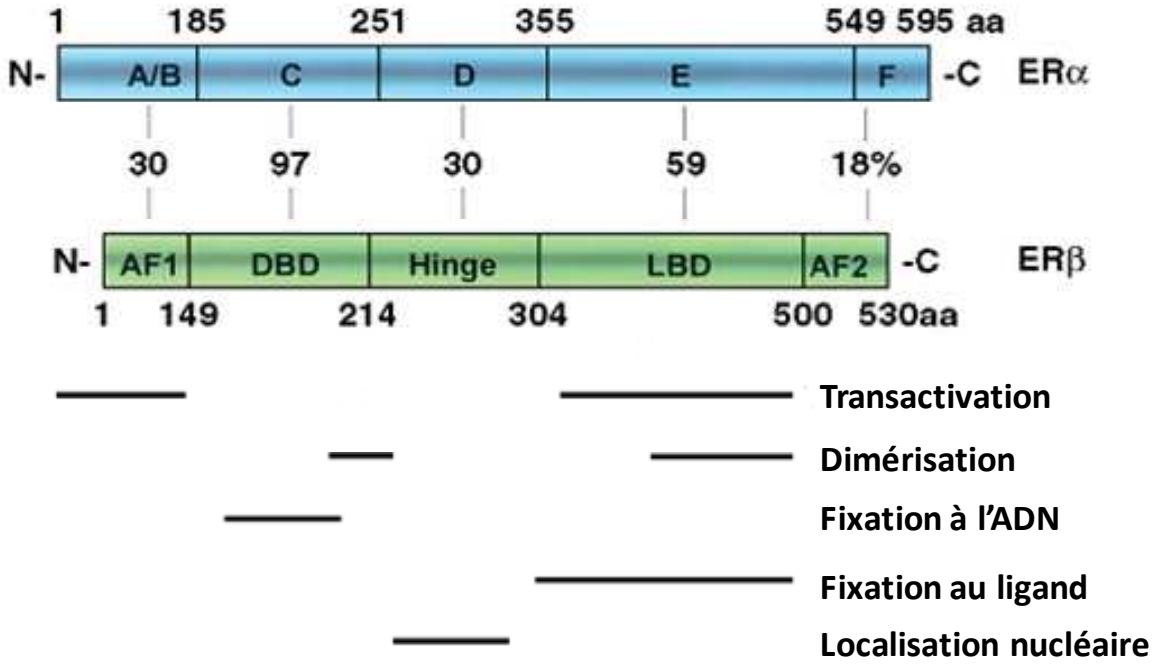


Figure 21 : Domaines fonctionnels (A à F) des protéines ERα et ERβ. Le pourcentage de similarité en acides aminés entre les deux récepteurs est représenté ainsi que les fonctions principales associées aux différents domaines des récepteurs. (D'après Speirs et Walker, 2007).

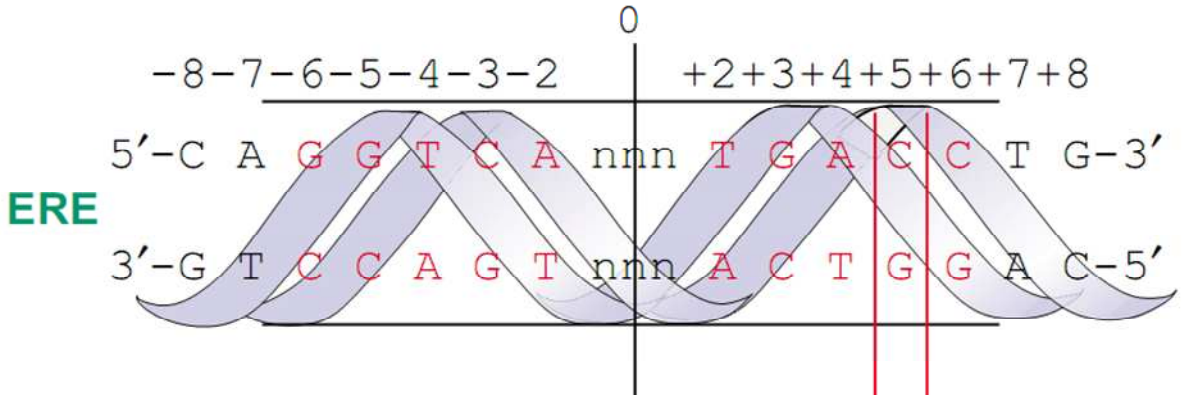


Figure 22 : Séquence consensus de l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) dérivant des gènes de la vitellogénine A1, A2, B1 et B2 de *Xenopus laevis*. Il s'agit d'une séquence palindromique en répétition inversée de 13 paires de bases présentant un espace de 3 paires de bases variables (en rouge). (D'après Gruber et al., 2004).

domaines amino-terminaux A et B. Cette forme est exprimée dans les ostéoblastes et dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 (Flouriot et al., 2000). Plus récemment, une autre protéine ERα tronquée de 36 kDa a été clonée par Wang et son équipe (voir paragraphe II 1.2.1.1.d) (Wang et al., 2005).

(c) Structure du récepteur ERα

La forme longue du récepteur alpha des œstrogènes est composée de 595 acides aminés et sa masse moléculaire est d'environ 66 kDa. L'utilisation de récepteurs chimères entre le récepteur des œstrogènes et celui des glucocorticoïdes, et l'analyse de mutants ont permis de diviser sa séquence en six domaines fonctionnels notés A à F (figure 21) (Speirs et Walker, 2007). Les domaines amino-terminaux (NTD) A et B possèdent un domaine de transactivation appelé domaine d'activation 1 (AF-1) qui remplit une fonction d'activation ligand-indépendante et contient de nombreux sites de sumoylation et de phosphorylation. Le domaine AF-1 est celui qui présente la plus grande variabilité entre les membres de la famille des récepteurs stéroïdiens. La région A/B contient également un domaine de corégulation qui peut lier des coactivateurs et des corépresseurs et ainsi modifier l'activité transcriptionnelle (Ascenzi et al., 2006).

Le domaine central C contient le domaine de fixation à l'ADN ou DBD (DNA binding domain) composé de deux motifs en doigts de zinc. Le premier motif appelé P-box (Proximal box) est responsable de la fixation spécifique du récepteur aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE). Les ERE sont constitués d'une séquence palindromique en répétition inversée de 13 paires de bases contenant 3 paires de bases de nature variable (figure 22). Le second motif du doigt de zinc appelé D-box (Distal box) est impliqué dans la dimérisation (Ascenzi et al., 2006).

Le domaine D, appelé région charnière, contient une partie du domaine de transactivation AF-2 et une portion du signal de localisation nucléaire ainsi que des sites de sumoylation et d'acétylation.

Les domaines carboxy-terminaux E et F contiennent le domaine de fixation au ligand ou LBD (Ligand Binding Domain). Le LBD contient lui-même le domaine de transactivation AF-2 présentant une fonction d'activation ligand-dépendante. Le domaine LBD des récepteurs nucléaires adopte un repliement communément appelé sandwich d'hélices α antiparallèles. Le LBD des ERs est composé de 12 hélices α arrangées en trois couches formant une poche hydrophobe permettant la fixation du ligand: la couche centrale, constituée

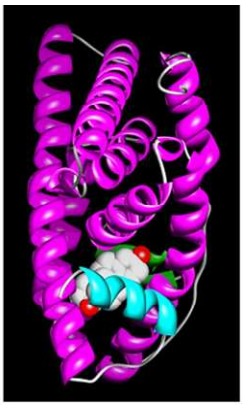


Figure 23 : Structure tri-dimensionnelle du complexe LBD-E_2 du récepteur ERα. Les hélices α sont représentées en violet, les feuillets β en vert, et l'hélice H12 en bleu. Les atomes de l'E_2 sont représentés en blanc et rouge. (D'après Ascenzi et al., 2006).

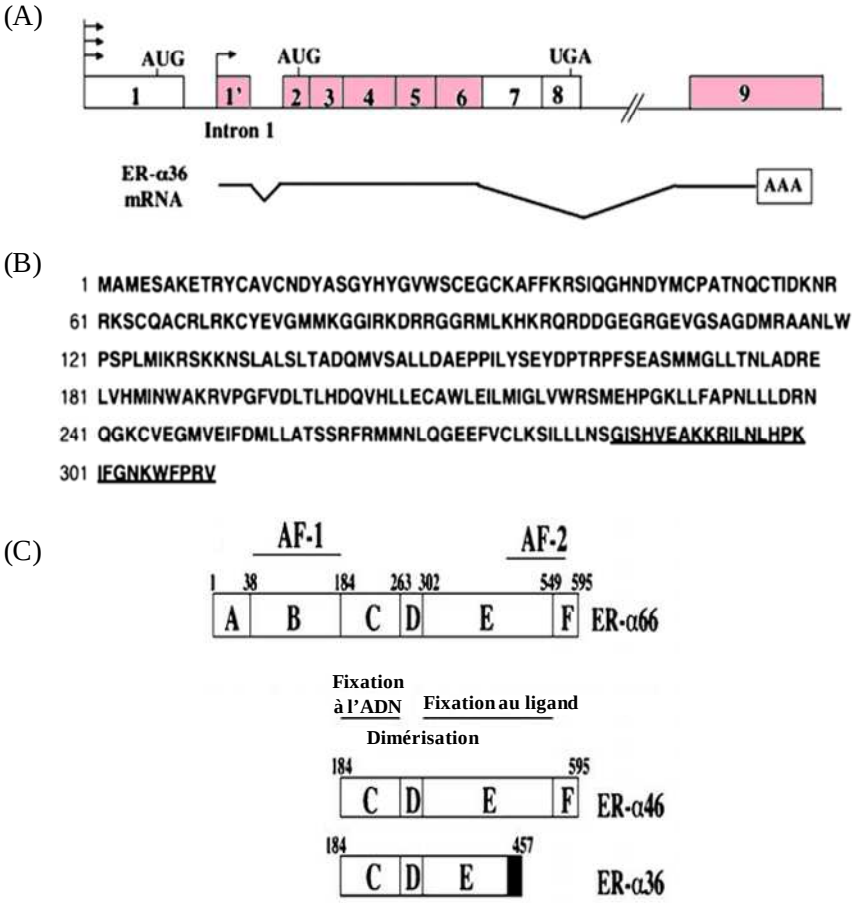


Figure 24 : Nouvelle isoforme de ERα « ERα36 ». (A) Organisation génomique du gène Erα36 humain. Les rectangles colorés en rose représentent les exons du gène Erα36. les exons numérotés de 1 à 8 correspondent au gène Erα66. L'intron 1 contenant un exon non-codant dit « exon 1' » à partir duquel ERα36 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 de ERα36, les derniers 27 acides aminés spécifiques de ERα36 sont soulignés. (C) Domaines fonctionnels des isoformes de ERα humaine. Les domaines sont notés de A à F. Le nombre d'acides aminés ainsi que la fonction de chaque domaine sont représentés. Le domaine qui contient les derniers 27 acides aminés spécifiques de ERα36 est marqué en noir (D'après Wang et al., 2005).

de trois hélices α (H5-6, H9 et H10), est prise en sandwich entre deux couches additionnelles d'hélice α (H1-4, H7, H8 et H11). La géométrie de l'hélice H12, qui contient le domaine AF-2, est variable selon la présence ou l'absence d'E_2. En présence d'E_2, H12 se referme sur la cavité de fixation et vient se plaquer contre les hélices H3, H5-6 et H11. H12 n'établit pas de contact direct avec l'E_2 et son positionnement est nécessaire pour le recrutement de coactivateurs. Les coactivateurs interagissent avec les résidus des H3, H4, H5 et H12 (figure 23).

Les résidus cystéine du LBD des ERs jouent un rôle important dans la fixation des ligands. En particulier, la Cys530 est impliquée dans la fixation de l'E_2 et les Cys381 et Cys417, sont impliquées dans la reconnaissance des anti-œstrogènes (Ascenzi et al., 2006).

La région E/F est aussi impliquée dans la dimérisation du récepteur et la fixation de protéines corégulatrices et de protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique HSP70 et HSP90 (Ascenzi et al., 2006).

(d) Le récepteur ERα36

Récemment, Wang et son équipe ont cloné une nouvelle isoforme d'ERα qui en raison de sa masse moléculaire de 36 kDa est appelée « ERα36 ». Cette protéine est générée à partir d'un promoteur localisé dans le premier intron du gène codant ERα66 et elle est dépourvue des deux domaines de transactivation AF-1 et AF-2 en raison de l'absence des exons 1, 7 et 8 (figure 24). Ce récepteur contient un domaine de fixation à l'ADN et également un domaine partiel de dimérisation et de fixation au ligand. Il possède 310 acides aminés dont les 27 derniers sont spécifiques de ce récepteur et remplacent les derniers 138 acides aminés codés par les exons 7 et 8 du gène *Erα66*. Il contient aussi trois sites de myristoylation potentiels localisés sur les résidus 25-30 (GVWSCE), 76–81 (GMMKGG) et 171–176 (ELLTNL), qui lui donnent la possibilité de se localiser au niveau de la membrane plasmique et de médier ainsi les actions œstrogéniques non-génomiques (Wang et al., 2005; Lee et al., 2008).

1.2.1.2. Le récepteur ERβ

En 1996, un deuxième récepteur des œstrogènes a été cloné à partir de la prostate de rat et nommé ERβ (Kuiper et al., 1996). Ce gène a été cloné chez l'homme et la souris par la suite (Mosselman et al., 1996).

(a) Le gène codant ERβ

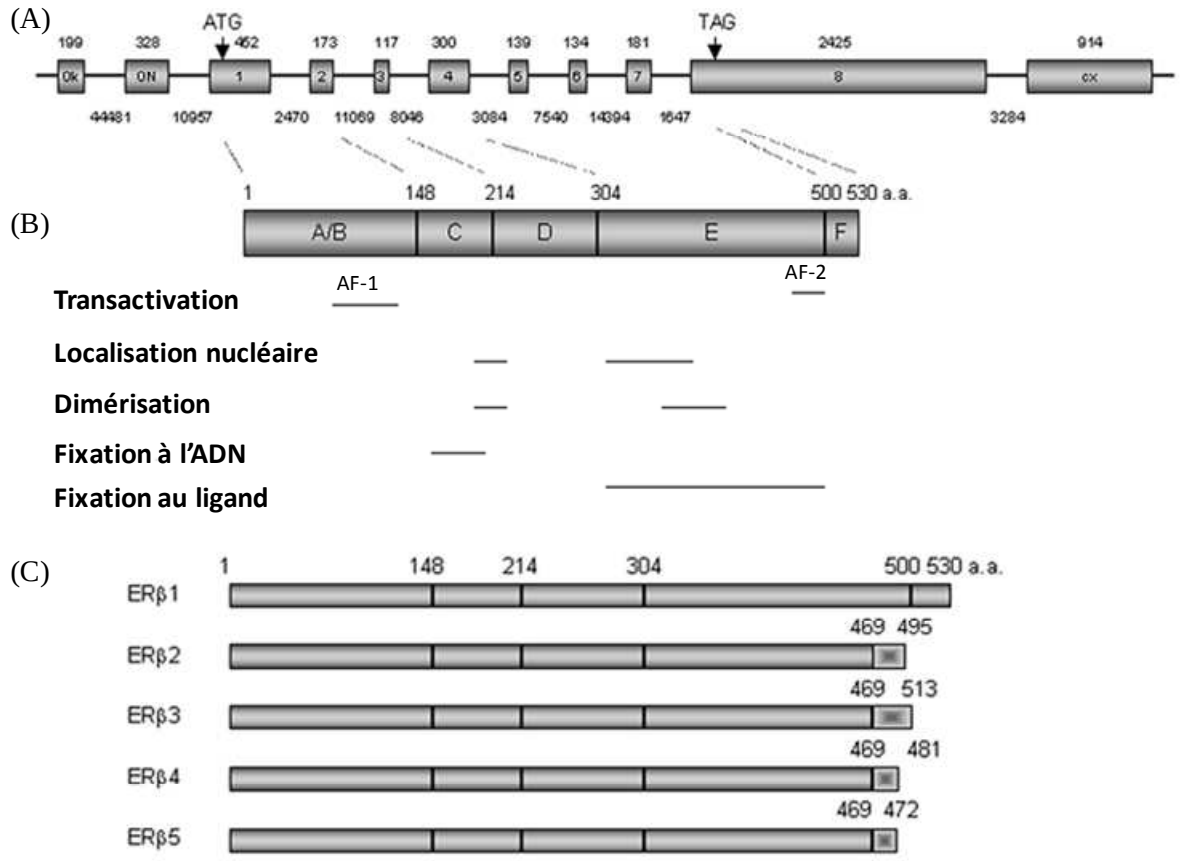


Figure 25 : (A) Gène *ERβ* humain. Les rectangles représentent les exons, les lignes entre les rectangles représentent les introns. Les chiffres au dessus des rectangles correspondent aux tailles des exons en paires de bases (pb). Les chiffres en dessous des lignes représentent les tailles des introns 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).

L'organisation du promoteur du gène codant ERβ n'est pas clairement établie. Chez l'homme, le gène *ESR2* est localisé sur le chromosome 14 en position q23.2 et s'étend sur 61,2 kb. La protéine ERβ est produite à partir de huit exons espacés par sept introns, les exons 0N et 0K en position 5' et l'exon ox en position 3' n'étant pas traduits. Un épissage alternatif entre l'exon 7 et l'exon ox permet de générer une isoforme ERβ2 (figure 25) (Zhao et al., 2008).

(b) Les différents variants d'ARNm

Chez l'homme, cinq transcrits ont été décrits et notés ERβ1 à 5 (Moore et al., 1998). La forme *ERβ1* (appelée *ERβ*) contient huit exons et correspond, après traduction, à la protéine de type sauvage de 530 acides aminés et de 59,2 kDa (Ogawa et al., 1998). Les autres transcrits sont constitués des exons 1 à 7 mais ils possèdent aussi des séquences uniques à la place de l'exon 8. Ils divergent à partir de l'acide aminé 469 à l'intérieur du LBD jusqu'à l'extrémité C terminale (figure 25) (Moore et al., 1998).

(c) Structure du récepteur ERβ

ERβ, en tant que membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, possède des caractéristiques structurales communes aux autres membres de cette famille et plus particulièrement à ERα, à savoir cinq domaines distincts A/B, C, D, E, F (figure 25). En comparant les séquences des protéines ERα et ERβ, on remarque une forte conservation des acides aminés dans le domaine C (95% d'homologie). En revanche, pour les autres domaines, le niveau de conservation est beaucoup plus faible: A/B (20%), D (30%), E (55%) et F (20%).

Malgré ces différences de séquences, ces domaines conservent des fonctions analogues à celles décrites précédemment pour ERα. Il faut noter que les domaines de liaison du ligand d'ERα et ERβ ont des structures tri-dimentionnelles très proches. Cependant, la cavité de fixation du ligand d'ERβ est significativement plus petite (environ 20%) que celle d'ERα, ce qui pourrait avoir de fortes implications pour l'affinité et la pharmacologie des ligands. De façon classique, ERβ possèdent deux domaines de transactivation AF-1 et AF-2, situés respectivement dans les régions A/B et E (figure 25) (Zhao et al., 2008).

1.2.1.3. Mécanismes d'action des ERs

Après diffusion à travers la membrane plasmique, les œstrogènes peuvent activer la transcription de leurs gènes cibles, selon différentes voies de signalisation: la voie dite génomique et la voie dite non génomique.

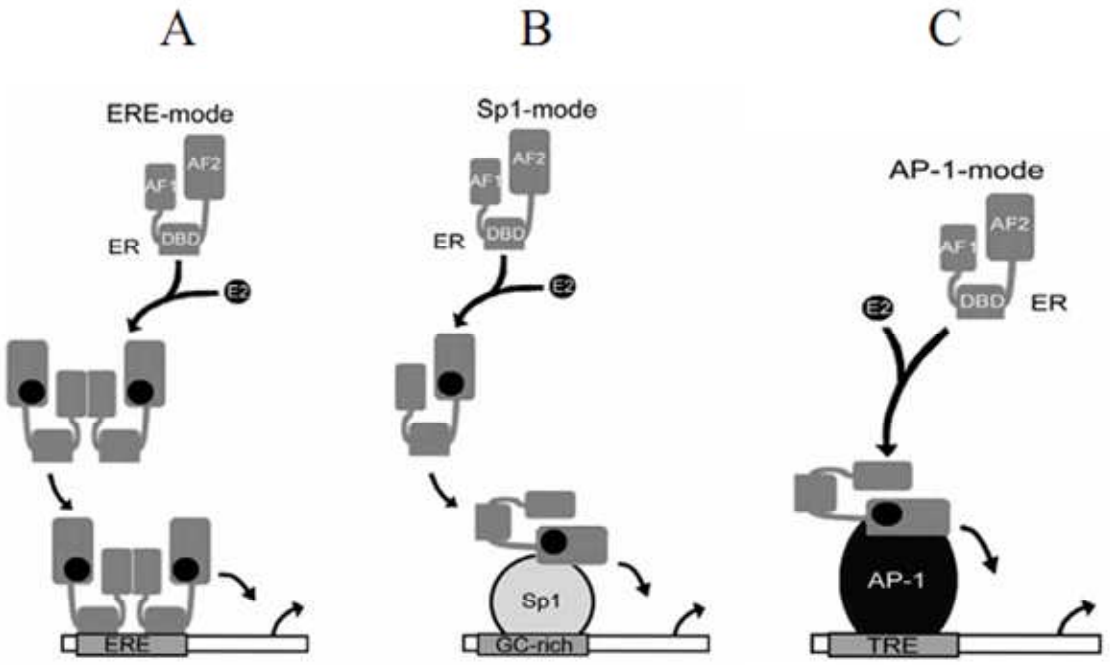


Figure 26 : Représentation schématique des trois modes par lesquels les ERs modulent la transcription des gènes cibles. La voie classique en A représente l'interaction des ERs avec un élément de réponse (ERE) consensus. Les deux autres modèles (B et C) représentent les fixations indirectes des ERs via des interactions avec des protéines sur les sites Sp1 et AP-1 de l'ADN. (D'après Ascenzi et al., 2006).

La voie d'activation de la transcription dite génomique implique la fixation du ligand sur le récepteur, la dissociation des protéines de choc thermique des récepteurs et leur dimérisation. Associés à des protéines co-activatrices, les récepteurs dimérisés interagissent avec une séquence spécifique d'ADN située dans le promoteur de gènes cibles dont ils vont moduler la transcription.

La voie dite non génomique implique des récepteurs membranaires qui détectent les signaux extracellulaires et les transmettent aux kinases cytoplasmiques. Ces dernières amplifient le signal de manière spécifique par une stimulation séquentielle de différentes cascades de signalisation. La phosphorylation des protéines kinases et leur translocation dans le noyau, peuvent modifier les facteurs de transcription, ce qui entraîne au final une régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et/ou l'apoptose. Il faut noter que les réponses cellulaires non génomiques sont rapides, elles présentent des délais de réponse de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes.

(a) Régulation de la transcription par la voie génomique

La voie génomique directe

Les ERs sont localisés dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules sous forme de monomères associés à des protéines chaperonnes HSP (Heat Shock Proteins), principalement HSP70 et HSP90 ou bien sous la forme de dimères libres. L'entrée du ligand par diffusion à travers la membrane plasmique et sa liaison au récepteur induit la dissociation des HSP du complexe. La conséquence est le repliement d'ER et en particulier de l'hélice H12 du LDB, menant à la dimérisation du récepteur de façon stable et à sa translocation nucléaire. Dans le noyau, il agit comme facteur de transcription en se fixant sur des séquences spécifiques d'ADN appelées ERE (Estrogen Responsive Element) située dans le promoteur de gènes cibles via le domaine de liaison à l'ADN. Cette fixation entraîne le recrutement des coactivateurs essentiels à l'activité transcriptionnelle, grâce aux domaines de transactivation AF-1 et AF-2. Selon le gène et le type cellulaire concernés, ces cofacteurs agissent en coopération ou de façon indépendante, et leurs activités sont modulées (figure 26) (revue dans Acconcia et Kumar, 2006).

La voie génomique indirecte

Les récepteurs des œstrogènes sont capables de réguler l'expression de gènes qui ne possèdent pas de séquence ERE au sein de leurs régions promotrices. Une fois activés par leur

ligand et leur translocation nucléaire effectuée, les ERs sont capables d'interagir directement avec des facteurs de transcription de type FOS et JUN, liés à leur site spécifique appelé AP1 (activating protein 1) dans la région promotrice des gènes cibles (figure 26) (Kushner et al., 2000). Les ERs peuvent également interagir avec le facteur de transcription SP1 (specificity protein 1) lié à son propre élément de réponse. La protéine SP1 est le premier facteur de transcription identifié en 1980. Il appartient à la famille SP/KLF (SP/Krüppel-like family) qui regroupe 25 facteurs de transcription. La particularité des membres de cette famille est de reconnaître des sites de fixation riches en bases GC dans le promoteur des gènes cibles (revue dans Safe et Kim, 2008).

(b) Activation de la transcription par la voie non génomique

Action non génomique (membranaires)

L'E_2 induit également des réponses cellulaires non génomiques. Ces actions passent par l'activation et la modulation de l'activité de voies de signalisation intracellulaires telles que les cascades des MAPKs (mitogen-activated protein kinases) ou des PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Zhang et al., 2004). Par ailleurs, les ERs nucléaires ne contiennent pas de domaine transmembranaire mais ils pourraient être localisés en faible quantité dans des micro-invaginations membranaires nommées cavéoles (Razandi et al., 2004). Ainsi, les réponses cellulaires non génomiques pourraient être en partie médiées au niveau membranaire par une interaction des ERs avec des protéines membranaires telles que la cavéoline-1. Une telle interaction se fait par l'acétylation de la cystéine 447 du domaine E d'ERα et conduit à la translocation de l'ERα aux cavéoles de la membrane plasmique (revue dans Levin, 2009).

Plus récemment, il a été montré que ERα était capable de recruter des membres de la famille des petites protéines G et ainsi d'activer des voies de signalisation non génomiques impliquant la voie MAPK (Mitogene Activated Protein Kinase), la protéine kinase A (PKA) ou encore d'agir sur des canaux calciques intracellulaires (voir paragraphe II.1.2.1.4).

Activation de la transcription en absence de ligand

En absence de ligand, l'activité des ERs peut être modulée par la phosphorylation de certains de leurs résidus. Les facteurs de croissances comme l'IGF-1 (Insuline like growth factor-1) ou l'EGF (Epidermal growth factor), et d'autres activateurs de protéines kinases déclenchent une cascade d'activation de protéines kinases MAPK (Cenni et Picard, 1999). Ces réactions peuvent aboutir à la phosphorylation des ERs, ce qui se traduit par une

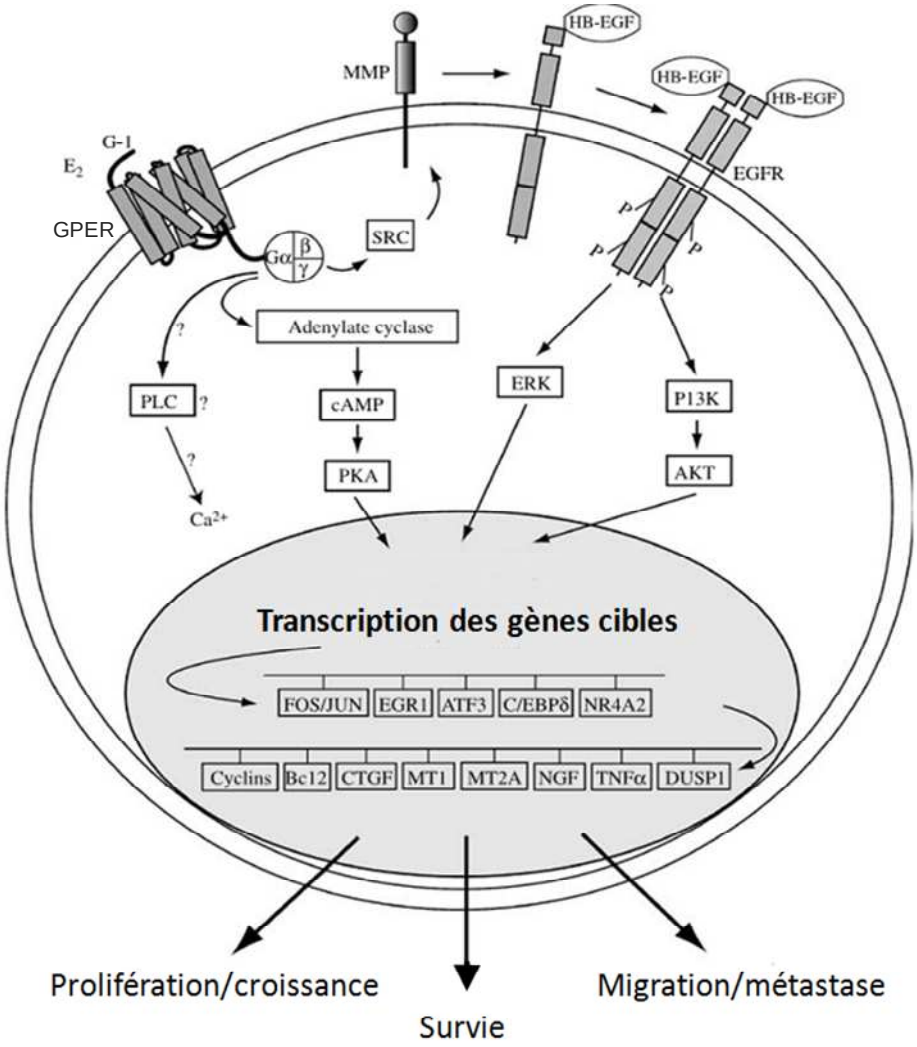


Figure 27 : Représentation schématique des voies de signalisation de GPER. À la suite de l'activation de GPER par un ligand physiologique, comme l'œstradiol (E_2) ou son ligand spécifique G-1, GPER adopte une conformation active qui conduit à l'échange de GDP par du GTP sur la protéine Gαs, la dissociation de la sous-unité α des sous-unités βγ 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, roux 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).

augmentation de l'affinité du récepteur pour la séquence ERE et une activation de la transcription de gènes cibles.

1.2.1.4. Récepteur des œstrogènes couplé aux protéines G (GPER)

Nous avons décrit dans la section précédente les récepteurs nucléaires classiques des œstrogènes (ERα et ERβ), ainsi qu'une isoforme membranaire (ERα36). Il existe aussi un récepteur membranaire qui a été proposé comme étant activé par les œstrogènes. Ce récepteur membranaire appelé GPER (G Protein-coupled Estrogen Receptor) ou GPR30, a été cloné par plusieurs équipes vers la fin des années 90 (Carmeci et al., 1997; Feng et Gregor, 1997; Takada et al., 1997). La séquence d'acides aminés codée par ce gène contient sept domaines transmembranaires caractéristiques de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). La comparaison de sa structure avec celles d'autres GPCR révèle des similitudes entre le GPER et le récepteur AT1 de l'angiotensine II (AGTR1), le récepteur alpha de l'interleukine-8 (IL8RA) et le récepteur des chémokines 1 (motif C-C) (CCR1) avec respectivement 28 %, 28 % et 24 % d'identité (Carmeci et al., 1997). Par la suite, les travaux de Filardo et al. ont démontré que la phosphorylation rapide des protéines kinases MAPK ERK1/2 (Mitogen-Activated Protein Kinase, Extracellular signal-regulated kinase) en réponse à l'E_2 était dépendante de la présence du GPER. En effet, E_2 active ERK1/2 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 qui expriment des ERs. Cette activation par E_2 a également été observée dans les cellules tumorales mammaires SKBR3 qui n'expriment pas les ERs, mais seulement le GPER. De plus, des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 ($ER\alpha^-$, $ER\beta^+$ et $GPER^-$), qui sont insensibles à l'activation des ERK1/2 par E_2, le deviennent après transfection avec un vecteur exprimant GPER (Filardo et al., 2000). Ces travaux ont également montré que l'activation de la voie ERK1/2 par E_2 résulte d'une transactivation du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor Receptor ; récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase) (figure 27). En effet, suite à l'activation de GPER, il y aurait une activation de la sous-unité de la protéine G (Gβγ) et ainsi de la protéine SRC. SRC, par son activité tyrosine kinase, phosphorylerait la protéine adaptatrice SHC, ce qui permettrait l'activation de métalloprotéinases (MMPs). Ces MMPs vont permettre le relargage du facteur de croissance homologue de l'EGF (HB-EGF; Heparan-Bound Epidermal Growth Factor) et l'activation de l'EGFR (Filardo et al., 2000). D'autre part, Revankar et al. ont rapporté, dans des cellules rénales immortalisées de singe (COS-7), que l'activation des GPER par l'E_2 donnait lieu à l'activation de la voie de PI3K (phosphoinositide 3-kinase). Cependant cette étude a montré

que la localisation cellulaire du GPER n'est pas à la membrane plasmique, mais plutôt à la membrane du réticulum endoplasmique (Revankar et al., 2005). D'autres voies non génomiques telles que la voie PKA (protein kinase A) peuvent être également induites par GPER (Filardo et al., 2002; Thomas et al., 2005).

Les travaux de Maggiolini et al. montrent que dans les cellules SKBR-3 (ERs^-) l'activation de GPER par l'E_2 est associée à des fonctions proliférives en stimulant l'expression de l'oncogène *c-fos* (Maggiolini et al., 2004). Ces résultats ont été obtenus à partir d'expériences utilisant des oligonucléotides antisens ou des ARN interférents (siRNA) afin de bloquer l'expression du messager du gène codant GPER. En utilisant les mêmes techniques, Sirianni et al. ont rapporté, dans les cellules de la lignée spermatogoniale de souris GC-1, que E_2 ainsi que G-1 (agoniste spécifique de GPER) sont capables d'induire l'expression de *c-fos* et de cycline D1 (gène impliqué dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire) et de stimuler ainsi la prolifération cellulaire via GPER (Sirianni et al., 2008).

1.2.1.5. Interactions GPER/ ERα36

Récemment, il a été montré qu'ERα36 (variant d'ERα) pourrait intervenir dans l'activation des voies de signalisation non génomiques activées par l'E_2, en aval de GPER ou indépendamment de celui-ci dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires (Kang et al., 2010; Zhang et al., 2011).

Par ailleurs, GPER est capable d'induire l'expression d'*ERα36* via le site AP1 (Activator Protein 1) situé dans la région promotrice. Celui-ci est exprimé dans les cellules SKBR3 qui expriment également GPER. Le blocage de l'expression de *GPER* par siRNA conduit à une inhibition de celle d'ERα36. De même, la transfection des cellules embryonnaires humaines de rein HEK293 qui n'expriment ni GPER ni ERα36, par un vecteur permettant d'exprimer GPER, induit l'expression d'*ERα36* (Kang et al., 2010). De plus, Zhang et al. ont montré que, dans deux lignées tumorales mammaires qui n'expriment pas les ERs (MDA-MB-231 et MDA-MB-436), ERα36 intervient dans l'activation de la voie MAPK/ERK via l'induction du récepteur à l'EGF (Zhang et al., 2011). L'ensemble de ces travaux montre qu'ERα36 est capable d'induire *in vitro* des réponses cellulaires en absence des récepteurs nucléaires des œstrogènes (ERs) et de GPER.

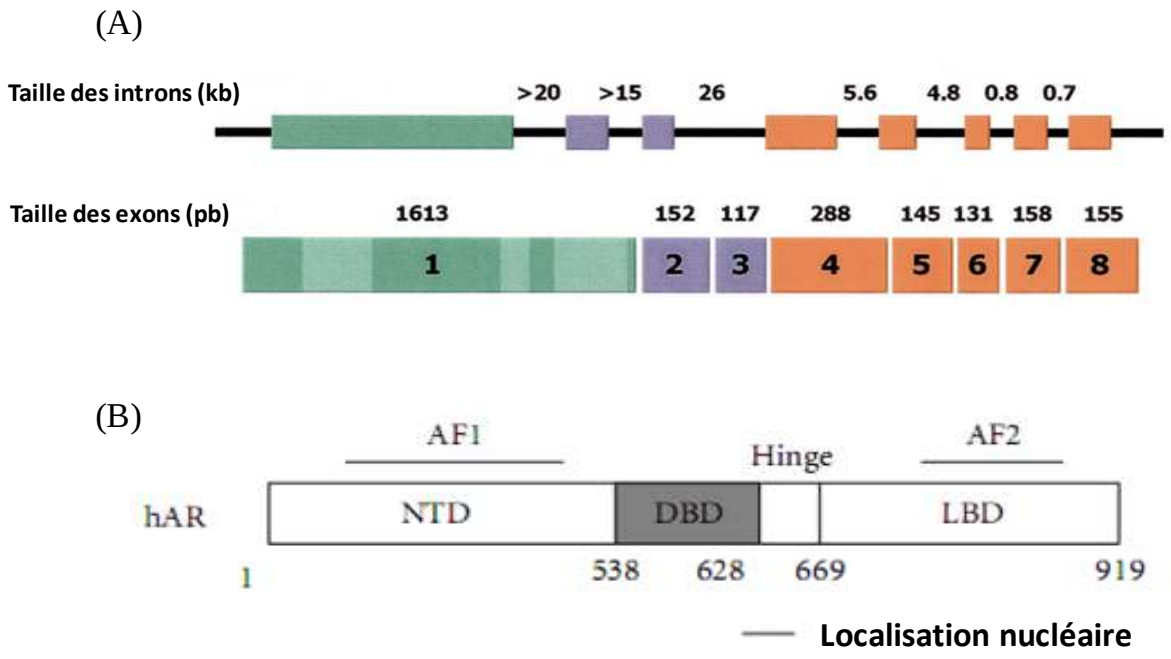


Figure 28 : (A**)** Gène codant le récepteur des androgènes humain. Les rectangles représentent les exons, les lignes entre les rectangles représentent les introns. Les tailles des exons et celles des introns sont indiquées. (B) Domaines fonctionnels de la protéine AR humaine. Le nombre d'acides aminés correspondants est indiqué en dessous de chaque domaine. (D'après Gelmann, 2002; Lavery et Bevan, 2011).

1.2.2. Les récepteurs des androgènes (AR)

Les récepteurs des androgènes (AR ou NR3C4) appartiennent à la même superfamille de récepteurs nucléaires que les récepteurs des œstrogènes.

1.2.2.1. Le gène codant AR

(a) Organisation génomique

Chez l'homme, le gène codant le récepteur des androgènes est localisé sur le chromosome X en position q11–12 et s'étend sur 61,2 kb. La protéine AR est produite à partir de huit exons séparés par sept introns (figure 28A). Le premier exon code le domaine N-terminal (NTD). Le domaine DBD est codé par les exons 2 et 3. Le domaine LBD est codé par les exons 4 à 8 (Gelmann, 2002).

(b) Structure du récepteur AR

La protéine AR possède 919 acides aminés, sa masse moléculaire est d'environ 110 kDa. Comme les autres récepteurs nucléaires, l'AR se compose de différents domaines (figure 28B). La région N-terminale contient le domaine de transactivation AF-1. Deux sous régions nommées Tau-1 et Tau-5 (Transcription activation unit 1 et 5) ont été identifiées. Tau-1 serait dépendant du LBD alors que Tau-5 serait une séquence d'activation autonome qui ne nécessite pas la présence du LBD. Tau-5 interagit fortement avec les co-activateurs de la famille SRC/p160.

Le domaine DBD, notamment les doigts de zinc, est très conservé. Trois acides aminés, Gly577, Ser578 et Val579, dans le premier doigt de zinc contiennent les informations pour la reconnaissance des éléments de réponse sur l'ADN. Cinq acides aminés dans le deuxième doigt de zinc servent à stabiliser la liaison entre récepteur et ADN. Le résidu A573 situé dans le premier doigt de zinc facilite probablement l'homodimérisation de l'AR (MacLean et al., 1997).

La région charnière située entre la dernière hélice α du DBD et la première hélice α du LBD joue un rôle important. Elle comprend un signal de localisation nucléaire. Elle comporte également une extension C-terminale (CTE) jouant un rôle dans la liaison à l'ADN, en particulier sur des éléments de réponse spécifiques de l'AR (Claessens et al., 2008).

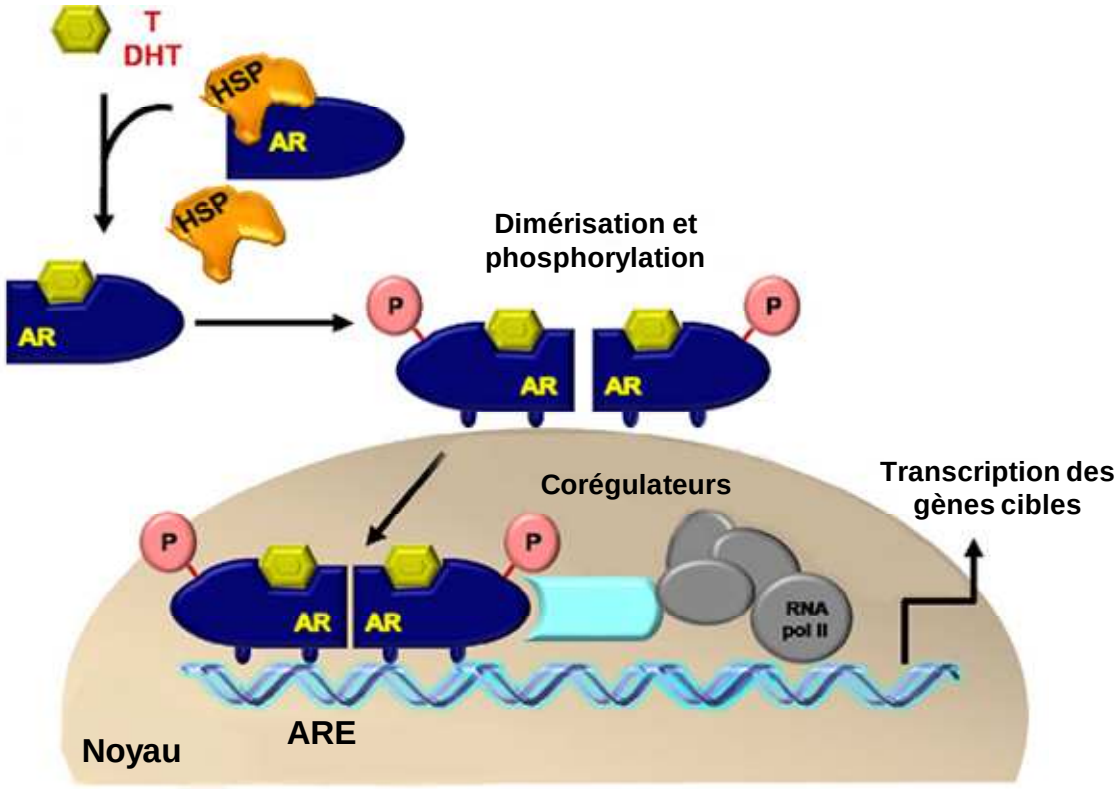


Figure 29 : Mécanismes d'action du récepteur des androgènes (AR). L'AR non activé est associé aux protéines HSPs (Heat Shock Proteins). L'activation de l'AR, par les androgènes comme la testostérone (T) et la dihydrotestostérone (DHT), conduit à la dissociation de l'AR des protéines HSPs, à sa dimérisation, sa phosphorylation et sa translocation dans le noyau. L'effet des androgènes se manifeste par la fixation des AR dimérisés sur un élément de réponse ARE (Androgen Response Element) situé dans les promoteurs de gènes cibles. (D'après Li et Al-Azzawi, 2009).

Un deuxième domaine de transactivation AF-2 a été identifié dans le domaine LBD. Ce domaine, comme pour les ERs et la plupart des récepteurs nucléaires, comprend 12 hélices α qui s'organisent en sandwich avec une cavité centrale pour la fixation du ligand.

Le fait que le LBD de l'AR soit moins variable que la même région d'autres récepteurs stéroïdiens suggère que ses acides aminés sont très importants pour la liaison des androgènes. Ceci explique pourquoi beaucoup de composés chimiques synthétiques ou naturels interagissent avec l'ER, mais très peu avec l'AR. Chez l'homme, les résidus 866 à 889 déterminent l'affinité du récepteur pour les ligands, qu'ils soient agonistes ou antagonistes (Thornton et Kelley, 1998).

1.2.2.2. Mécanismes d'action des récepteurs des androgènes

L'action des androgènes comme la testostérone et la DHT est principalement médiée par AR. La signalisation des androgènes peut passer, comme pour les œstrogènes, par la voie génomique et/ou la voie non génomique. Tout dépend de la nature des androgènes, des tissus cibles et de la localisation cellulaire de l'AR. La voie génomique de transactivation par l'AR comprend les étapes communes à tous les récepteurs nucléaires. L'AR non activé est associé aux protéines HSPs et reste principalement dans le compartiment cytoplasmique. Une fois qu'il est activé par la liaison avec un androgène, il se dissocie de l'HSP et se dimérise. La phosphorylation est primordiale pour la translocation dans le noyau. L'effet des androgènes se manifeste par la fixation des AR dimérisés sur un élément de réponse ARE (Androgen Response Element) situé dans les promoteurs de gènes cibles. L'action génomique des androgènes nécessite toujours des protéines corégulatrices, coactivateurs ou corépresseurs (figure 29) (Lee et Chang, 2003; Gao et al., 2005).

Les signalisations non génomiques des androgènes se caractérisent par leur réaction rapide, indépendamment de l'activation transcriptionelle des AR. Ce mode d'action conduit à l'activation de la voie MAPK et à celle de PKA, ainsi qu'à la libération de calcium intracellulaire (Rahman et Christian, 2007). En effet, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire a été observée *in vitro* dans des cellules de Sertoli de rat ou des cellules de cancer de prostate androgène-dépendantes (LNCaP) ou androgène-indépendantes (PC3) cultivées en présence de testostérone, DHT ou R1881 (agoniste synthétique de AR). Les mêmes résultats ont été obtenus quand ces cellules ont été traitées par de la testostérone couplée à la protéine BSA (Bovine Serum Albumine), forme de testostérone qui ne peut pas

pénétrer dans les cellules. Ceci indique que les androgènes comme les œstrogènes, peuvent activer des voies de signalisation non-génomiques (revue dans Patrão et al., 2009).

2. Stéroïdes et différenciation testiculaire/spermatogenèse

2.1. Œstrogènes et différenciation testiculaire/spermatogenèse

2.1.1. Expression et rôle des récepteurs des œstrogènes chez les mammifères

Chez les mammifères, les œstrogènes interviennent notamment dans les cycles ovariens mais aussi dans la spermatogenèse.

Les ERs sont exprimés au cours du développement testiculaire chez les rongeurs. Concernant, le récepteur ERα, son expression varie en fonction de 1) l'âge, 2) le type de cellules germinales, 3) le stade de développement de l'épithélium séminifère. Alors que l'expression de ERβ semble moins concernée (revue dans Carreau et al., 2011). Dans le testicule fœtal, ERβ est détecté dans les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les gonocytes. Tandis qu'ERα ne semble exprimé que dans les cellules de Leydig fœtales (O'Donnell et al., 2001). L'expression et la localisation de ces récepteurs dans le testicule adulte des mammifères ont fait l'objet des nombreuses études. ERα est exprimé dans les cellules de Leydig du rat et de la souris, tandis que l'expression d'ERβ est détectée dans les cellules de Leydig chez la souris mais pas chez le rat (O'Donnell et al., 2001).

Les données sur l'expression de ces récepteurs dans les cellules de Leydig chez l'homme sont contradictoires. Pelletier et El-Alfy ont détecté l'expression des deux récepteurs dans les cellules de Leydig, tandis que Saunders et al. n'ont observé que l'expression d'ERβ dans ces cellules (Pelletier et El-Alfy, 2000; Saunders et al., 2001). ERβ est la seule isoforme détectée dans les cellules de Sertoli et les spermatogonies chez l'homme (Pelletier et El-Alfy, 2000; Saunders et al., 2001). Cependant, au cours de la spermatogenèse, les deux isoformes ERα et ERβ sont détectées dans les spermatocytes, les spermatides rondes et les spermatozoïdes (Lambard et Carreau, 2005).

Chez les mammifères, l'implication des œstrogènes dans le contrôle de la prolifération des CGs et la spermatogenèse a été démontrée par des études de knock-out des ERs (ERsKO). En effet, des souris ERαKO mâles sont stériles suite à une réduction du nombre et de la motilité des spermatozoïdes dans l'épididyme. Au contraire, des souris ERβKO mâles sont

fertiles alors que les doubles mutants ERαβKO mâles ont un phénotype similaire à celui des souris ERαKO (revue dans Nef et Parada, 2000).

Les travaux de Delbès et son équipe ont montré que l'invalidation d'*Erβ* dans la lignée germinale mâle de souris conduit à une augmentation de 50% du nombre des gonocytes à 2 jours post-partum (jpp). Cela résulte d'une augmentation de l'activité mitotique des gonocytes et d'une réduction de l'apoptose. Ceci suggère un effet inhibiteur d'ERβ sur la multiplication des cellules germinales chez le mâle. Par contre, il n'y a pas d'effet sur les cellules de Sertoli et de Leydig, donc sur la production de testostérone (Delbès et al., 2004). En revanche, l'invalidation d'*Erα* ne modifie pas le nombre de cellules germinales, mais augmente la production de testostérone. Cette augmentation résulte d'une hypertrophie des cellules de Leydig fœtale et de l'augmentation de l'expression de plusieurs enzymes de la stéroïdogènese (Delbès et al., 2005). Cependant, chez le rat, un effet proliératif des œstrogènes sur les gonocytes a été rapporté. D'autres données montrent que le nombre de gonocytes est contrôlé à la fois par les œstrogènes et également par le facteur de croissance PDGF sécrétés par les cellules de Sertoli (revue dans Carreau et al., 2011).

Récemment, Sirianni et al., ont montré *in vitro* que la lignée GC-1 exprime le récepteur membranaire des œstrogènes GPER. Celui-ci peut médier les voies de signalisation oestrogéniques conduisant à la prolifération de ces cellules (Sirianni et al., 2008). Par ailleurs, l'étude de Chimento a montré que le récepteur membranaire GPER est exprimé dans les spermatocytes au stade pachytène chez le rat. Les œstrogènes peuvent activés via ce récepteur membranaire et également via ERα le cascade de signalisation EGFR/ERK/cJun aboutissant à une modulation de l'expression des gènes impliqués dans le balance prolifération/apoptose dans ces cellules (Chimento et al., 2010).

2.1.2. Expression et rôle de l'aromatase chez les mammifères

Les œstrogènes résultent de l'aromatisation des androgènes par l'enzyme cytochrome P450 aromatase (P450arom), qui est localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Cette enzyme appartenant à la superfamille des cytochromes P450 est codée par un gène unique (*CYP19*) localisé sur le chromosome 15 chez l'homme. Ce gène contient 18 exons dont neuf sont codants (Carreau et al., 2003).

Chez la plupart des mammifères étudiés, et notamment chez les rongeurs, l'aromatase est présente dans les cellules somatiques (cellules de Sertoli et de Leydig) et les cellules

germinales. Ainsi, les cellules somatiques et germinales du testicule peuvent produire des œstrogènes (Carreau et al., 2007).

Chez le rat et chez l'homme, l'aromatase est détectée dans les spermatocytes, les spermatides rondes et également dans les spermatozoïdes (Carreau et al., 2007, 2010). Des transcrits aromatase ont également été détectés dans les spermatogonies et les spermatocytes au stade préleptotène. Seules les cellules myoïdes peritubulaires n'expriment pas *Cyp19* chez le rat (revue dans Carreau et al., 2011).

La découverte chez l'homme de cas d'inactivation du gène codant l'aromatase ou de ceux codant les récepteurs des œstrogènes ont permis de décrire le rôle des œstrogènes dans le contrôle de la fonction de reproduction masculine. Ces patients présentent souvent une haute taille, une croissance continue pendant la maturité et une ostéoporose. En ce qui concerne la fonction de la reproduction, certains patients ont montré des altérations de la spermatogenèse à des degrés variables comme une réduction de la viabilité et la motilité du sperme avec un cryptorchidisme bilatéral (absence de descente du testicule dans le scrotum) (voir chapitre III), et un taux élevé de gonadotropines (FSH, LH) et de testostérone (revue dans Rochira et al., 2005; Delbès et al., 2006).

Les souris KO pour l'aromatase (AromKO) sont initialement fertiles mais la spermatogenèse cesse progressivement pour s'arrêter complètement à l'âge d'un an, démontrant une action directe sur le développement des cellules germinales et la fertilité. Ainsi, le nombre des spermatides diminue significativement suite à une apoptose, les cellules de Leydig montrent une hyperplasie (prolifération anormale), tandis que les cellules de Sertoli ne sont pas affectées. Ces souris AromKO montrent également un taux élevé de testostérone et de LH (Robertson et al., 1999).

2.2. Androgènes et différenciation testiculaire/spermatogenèse

2.2.1. Expression et rôle d'AR chez les mammifères

La sécrétion d'androgènes par les cellules de Leydig est essentielle pour la masculinisation du fœtus. La testostérone est nécessaire au maintien des canaux de Wolff, et à leur différenciation en épididyme, canal déférent et vésicule séminale. Elle est produite par les cellules de Leydig à la 8ème semaine de gestation chez l'homme, et à 13 et 15 jpc chez la souris et le rat respectivement (revue dans Patrão et al., 2009). La testostérone est convertie en

DHT dans les tissus périphériques. Cet androgène assure notamment la différenciation du tractus mâle (revue dans Nef et Parada, 2000).

Dans le testicule fœtal de rat, l'expression d'AR n'est pas détectée dans les cellules germinales ni dans les cellules de Sertoli. En revanche, les cellules myoïdes péritubulaires et les cellules interstitielles dont une petite population de cellules de Leydig fœtales semblent exprimer AR (You et Sar, 1998). Dans le testicule adulte de souris et de rat, l'expression de AR est détectée dans les cellules de Sertoli, de Leydig et les cellules myoïdes péritubulaires, mais son expression dans les cellules germinales reste controversée (revue dans Patrão et al., 2009).

Chez l'homme, les cellules de Leydig fœtales et néonatales ainsi que les cellules myoïdes péritubulaires expriment AR mais pas les cellules de Sertoli. A l'âge adulte, l'AR est exprimé dans tous ces types cellulaires (Boukari et al., 2009) et également dans les spermatozoïdes (Solakidi et al., 2005; Aquila et al., 2007).

L'AR est nécessaire pour le développement du phénotype mâle. En effet, les souris mâles invalidées pour AR (ARKO) présentent le syndrome de testicule féminisé (mutation Tfm). Ces individus XY présentent une apparence femelle. Le tractus génital mâle n'est pas développé, la concentration en testostérone sérique et la taille des testicules sont inférieures à celles des mâles sauvages. La spermatogenèse dans les testicules est arrêtée au stade de spermatocytes (Yeh et al., 2002; Matsumoto et al., 2003).

A l'âge adulte, l'AR joue également un rôle important dans la régulation des fonctions des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig, et le maintien de l'homéostasie hormonale pour assurer une spermatogenèse normale. En effet, chez la souris, l'invalidation d'AR dans les cellules de Sertoli (S-AR$^{-/y}$) conduit à une infertilité suite à un arrêt de la spermatogenèse (Chang et al., 2004). Par contre, les souris dont les cellules germinales sont invalidées pour AR (G-AR$^{-/y}$) sont fertiles (Tsai et al., 2006). Ceci explique que la présence d'AR dans les cellules germinales n'est pas nécessaire pour la spermatogenèse et que le rôle d'AR dans la spermatogenèse est indirect et se fait via les cellules de Sertoli.

Les testicules de souris dont l'AR est invalidé spécifiquement dans les cellules de Leydig (L-AR$^{-/y}$), sont petits à cause d'une altération de la fonction stéroïdogénique. La concentration de testostérone est diminuée, tandis que celle de LH est élevée. Cela conduit à une altération de la fonction des cellules de Sertoli et ainsi à un arrêt de la spermatogenèse (Zhou, 2010).

Chez l'homme, la production d'AMH dans les cellules de Sertoli durant la vie fœtale est responsable de la régression des canaux de Müller. La diminution de l'expression de l'AMH dans les cellules de Sertoli à la puberté est en corrélation avec l'induction de l'expression d'AR dans ces cellules. En effet, l'invalidation d'AR dans les cellules de Sertoli est associée à un maintien de l'expression de l'AMH dans ces cellules à l'âge adulte (Boukari et al., 2009). La même observation a été faite chez la souris et conduit à la suppression de la synthèse/sécrétion de la testostérone dans les cellules de Leydig (Chang et al., 2004).

Un dysfonctionnement d'AR conduit au syndrome d'insensibilité aux androgènes (AIS) chez l'homme. C'est une affection liée au chromosome X. Plus de 400 mutations du gène codant l'AR sont décrites. Les individus atteints ont un caryotype 46,XY et l'on distingue deux formes cliniques : l'insensibilité complète (CAIS) ou partielle (PAIS) aux androgènes. Dans le premier cas les individus présentent un phénotype féminin sans ambiguïté génitale externe. Au niveau des organes génitaux internes, les structures dérivées de canaux de Wolff (épididyme, canal déférent et vésicule séminale) et la prostate sont absents. Les structures féminines comme l'utérus sont le plus souvent absentes. A la puberté, la concentration de la testostérone est élevée. Cette dernière serait convertie en œstrogènes par aromatisation et induirait le développement des seins. Les poils pubiens sont absents. Les insensibilités partielles sont hétérogènes allant du morphotype presque féminin jusqu'aux hommes sans ambiguïté génitale mais stériles (Galani et al., 2008).

3. Interactions stéroïdes/rétinoïdes

Les expériences de carence en vitamine A ont montré l'implication des rétinoïdes dans le contrôle des fonctions testiculaires et notamment l'interaction avec les stéroïdes testiculaires. En effet, une carence modérée en vitamine A chez les rattes gestantes, provoque une augmentation de la sécrétion de testostérone par les testicules fœtaux et néonataux prélevés à 18,5 jpc et 3 jpp (Livera et al., 2004).

Parallèlement, l'AcR diminue *in vitro* la production de testostérone basale et stimulée par la LH en début de la vie fœtale des rats, mais cet effet disparaît en fin de vie fœtale et en période néonatale (Livera et al., 2004). Cette diminution de la production de testostérone résulte d'une réduction des taux d'ARNm du cytochrome P450C17, enzyme impliquée dans la synthèse de testostérone, mais pas d'une diminution du nombre de cellules de Leydig.

L'AcR diminue également les taux de P450C17 en période néonatale mais à ce moment là cette enzyme n'est plus en quantité limitante (Livera et al., 2004).

Dans les testicules adulte de rat, les rétinoïdes (rétinol et AcR) augmentent la sécrétion de testostérone basale par les cellules de Leydig en culture primaire (Chaudhary et al., 1989). Ces résultats ont été expliqués par une forte augmentation de l'expression de certaines enzymes de la stéroidogenèse comme la 17α-hydroxylase/C17-20 lyase (P45017α) et la steroidogenic acute regulatory protein (StAR) (Lefèvre et al., 1994; Lee et al., 1999).

L'effet de l'AcR sur la production de testostérone *in vitro* a été testé par Lambrot et al. sur des gonades de fœtus humains (moins de sept semaines de gestation). Ces travaux montent un effet stimulateur de l'AcR sur la production de testostérone sur une courte période (3 jours). Cet effet passe par une augmentation de l'expression de la P450C17 et de la StAR (Lambrot et al., 2006). L'AcR a donc un effet régulateur sur la fonction stéroïdogénique du testicule.

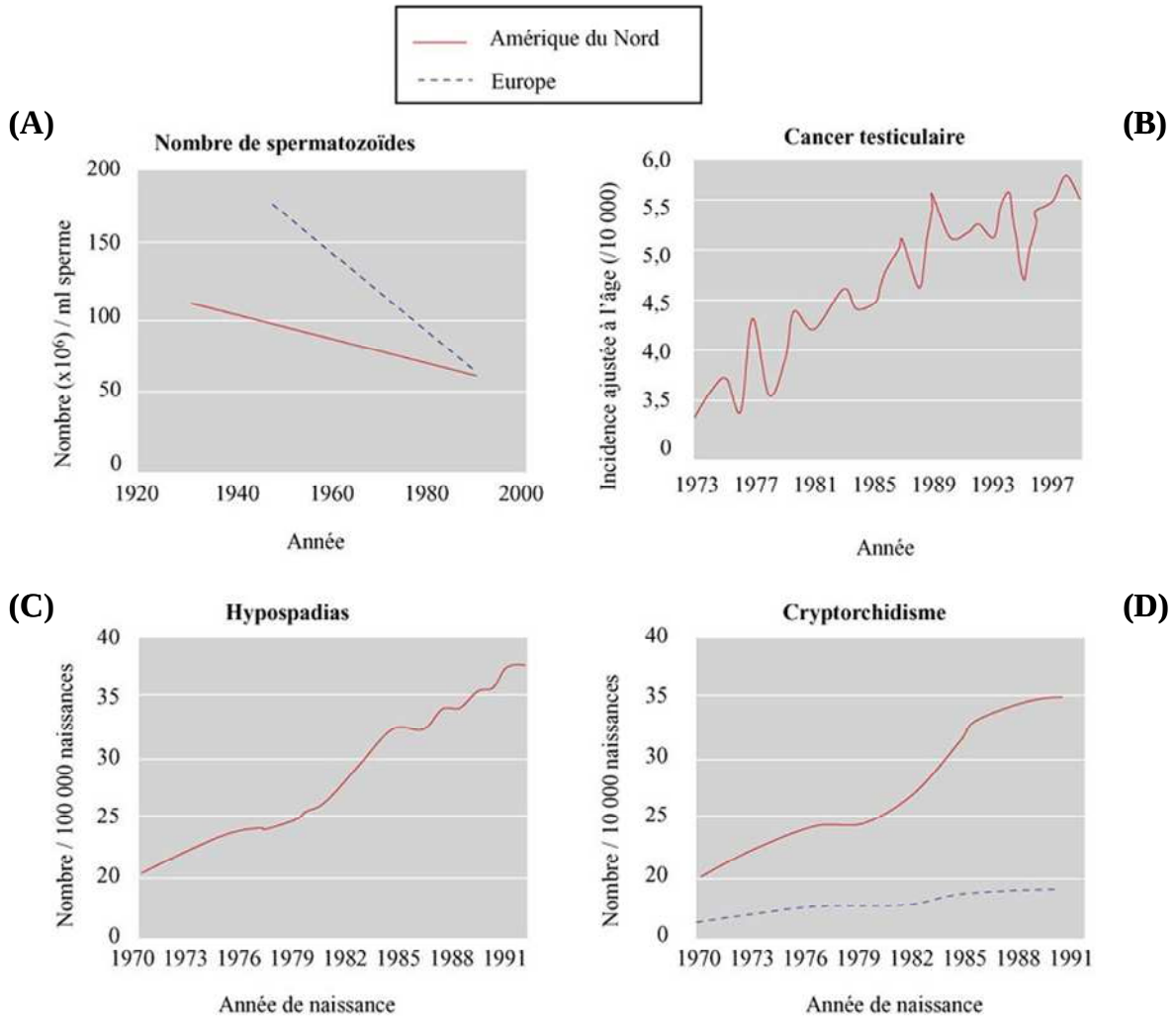


Figure 30 : Évolution du nombre de spermatozoïdes et des anomalies de l'appareil reproducteur masculin au cours des dernières décennies. (A) Le nombre de spermatozoïdes a diminué entre les années 1920 et 2000 en Amérique du Nord et en Europe. (B) L'incidence des cancers testiculaires a augmenté ; un doublement des cas est observé en Amérique du Nord entre les années 1973 et 1997. (C) Les cas d'hypospadias sont en augmentation en Amérique du Nord : on observe une augmentation d'environ 20 à 38 par 100 000 nouveau-nés entre les années 1970 et 1991. (D) L'incidence du cryptorchidisme a augmenté entre les années 1970 et 1991 en Europe et plus encore en Amérique du Nord. (D'après Sharpe et Irvine, 2004 ; Habert et al., 2006).

III. PATHOLOGIES DU DEVELOPPEMENT GONADIQUE

1. Syndrome de dysgénésie testiculaire

1.1. Définition

Au cours des cinquante dernières années, la prévalence des désordres de la reproduction humaine s'est amplifiée. De nombreuses études ont notamment démontré la forte augmentation de l'incidence de diverses anomalies de la structure et de la fonction de l'appareil reproducteur masculin. En effet, les données épidémiologiques ont montré une augmentation des cas de cryptorchidisme (absence de descente du testicule dans le scrotum) et d'hypospadias (malformation du tubercule génital conduisant à une localisation anormale du méat urétral) chez les nouveau-nés, ainsi que des cas de cancer testiculaire chez les jeunes adultes. Parallèlement, la qualité du sperme et la concentration en spermatozoïdes ont diminué d'environ 50% pendant la même période (figure 30) (Fisher, 2004; Habert et al., 2006; Thorup et al., 2010). Divers arguments laissent penser que ces anomalies sont liées. Il est clairement établi que le cryptorchidisme est un facteur de risque des autres altérations. Par exemple une fertilité réduite chez l'homme peut être associée à un problème de cryptorchidisme (Sonne et al., 2008) ; 5% des cancers testiculaires seraient également liés à cette anomalie (Thorup et al., 2010). En outre, l'hypospadias et l'oligospermie sont fréquemment accompagnés de cancer testiculaire. Il en est de même pour la fertilité qui apparaît diminuée chez les hommes qui développeront ultérieurement un cancer testiculaire (Moller et Skakkebaek, 1999). Ainsi, toutes ces altérations correspondraient vraisemblablement à différents symptômes d'un même syndrome : le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) (figure 31) (Skakkebaek et al., 2001; Wohlfahrt-Veje et al., 2009).

1.2. Origine fœtale

Les deux grandes fonctions testiculaires (la gamétogenèse et la stéroïdogenèse) se mettent en place dès la vie fœtale. Toute altération de l'une des étapes de ces processus durant cette période aura des répercussions sur la différenciation et la fonction des différents types cellulaires constituant le testicule. Cela peut concerner le développement des cellules germinales dont le stock se met en place pendant la vie fœtale, mais aussi le développement

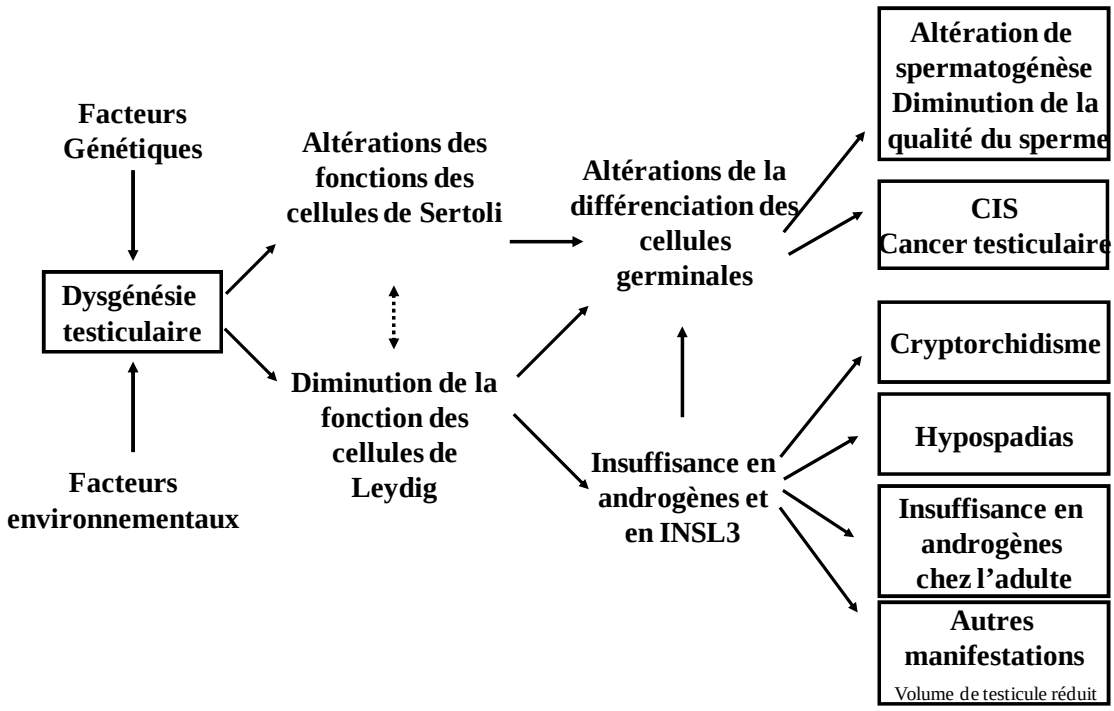


Figure 31 : Syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS). Il est dû à des facteurs génétiques ou à des facteurs environnementaux ou à une combinaison des deux. Ces facteurs pourraient induire des altérations des fonctions des cellules de Sertoli, de Leydig ou des cellules germinales. Ces altérations induisent par la suite les anomalies représentant le TDS que sont le cryptorchidisme, l'hypospadias, l'oligospermie et le cancer testiculaire. (Adapté d'après Wohlfahrt-Veje et al., 2009).

des cellules de Sertoli ou de Leydig. Ainsi, la réduction du nombre de ces cellules germinales fœtales ou des cellules de Sertoli périnatales entraîne une diminution de la production de spermatozoïdes à l'âge adulte (Habert et al., 2006; Sharpe et Skakkebaek, 2008).

Le développement de l'urètre sous l'influence des androgènes débute à la 8ème semaine de gestation. Une perturbation des sécrétions hormonales testiculaires lors de cette période pourra donc conduire à un hypospadias à la naissance (Baskin, 2000). La descente testiculaire vers le scrotum intervient en deux phases : la phase transabdominale contrôlée par l'hormone insuline-like factor 3 (INSL3) se produit au deuxième trimestre de gestation alors que la phase inguino-scrotale médiée par les androgènes a lieu au cours du troisième trimestre. Toute altération dans la production ou l'action des androgènes se manifestera par un échec de cette migration testiculaire révélé à la naissance (Hughes et Acerini, 2008). La détection de ces altérations dès la naissance renforce l'hypothèse d'une origine fœtale pour ces deux symptômes de TDS.

Concernant les cancers testiculaires, l'hypothèse d'une origine fœtale sera abordée dans le paragraphe III.3.2.2.

1.3. Causes possibles

Comme nous l'avons précédemment décrit au chapitre II avec les phénotypes de souris KO, les anomalies du développement du testicule fœtal peuvent résulter de mutations bien identifiées telles que des pertes de fonction dans les voies de synthèse ou de réponse aux stéroïdes ou des perturbations de l'axe gonadotrope. Néanmoins, seule une petite minorité des jeunes garçons atteints de cryptorchidisme ou d'hypospadias présentent une insensibilité aux androgènes ou un hypogonadisme hypogonadotrope (revue dans Toppari et al., 2010).

Les altérations de la fonction de reproduction sont particulièrement fréquentes dans les pays du nord de l'Europe (Norvège, Danemark, Finlande) mais elles touchent également les autres pays européens y compris la France, ainsi que les Etats-Unis et l'Australie (Jorgensen et al., 2002). Le cancer testiculaire, le cryptorchidisme et l'hypospadias présentent tous une incidence plus élevée au Danemark qu'en Finlande. En revanche, ces altérations sont beaucoup moins fréquentes en Asie (Thorup et al., 2010).

De ce fait, les prédispositions génétiques, les facteurs environnementaux, le mode de vie et/ou les différences ethniques semblent impliqués de façon interconnectée dans la prévalence de ces perturbations de l'ontogenèse de l'appareil reproducteur (Olesen et al., 2007; Sharpe et

Skakkebaek, 2008). Cependant, les études statistiques sont à considérer avec précaution à cause des différentes méthodes utilisées dans la sélection des populations, la comptabilisation et la classification des cas notamment pour le cryptorchidisme et l'hypospadias. Par exemple, certaines études considèrent les testicules retenus dans la région inguinale comme des cas de cryptorchidisme alors que d'autres non (Main et al., 2010). De même, les cas de cryptorchidisme unilatéral sont parfois éliminés des données.

1.3.1. Facteurs génétiques

Des facteurs génétiques semblent impliqués dans les altérations de la fonction de reproduction masculine. En effet, les données épidémiologiques ont montré que le cryptorchidisme et l'hypospadias sont dûs en partie à des facteurs héréditaires (Schnack et al., 2008a, 2008b). Des cas familiaux de cryptorchidisme ont été décrits. Une donnée récente montre que 22,7% des patients appartiennent à des familles atteintes par cette anomalie (Foresta et al., 2008).

Les données expérimentales menées sur des animaux impliquent de nombreux gènes dans le cryptorchidisme. Les souris déficientes en *Insl3* ou en son récepteur *Rxfp2* ont des testicules intra-abdominaux en raison de l'absence d'action de l'hormone INSL3. Des mutations dans le gène codant le récepteur aux androgènes AR ainsi que dans le gène codant la GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) et son récepteur semblent également impliquées. En effet, les souris mutantes pour ces gènes présentent une perturbation de la phase de migration inguino-scrotale due à l'absence d'action des androgènes. Néanmoins, ces mutations sont moins fréquentes chez l'homme (Foresta et al., 2008).

Peu d'anomalies génétiques ont été identifiées comme responsables d'hypospadias. Les mutations des fibroblast growth factor 8 et10 (FGF 8, FGF 10), du récepteur du FGF 2 et également d'ATF3 (Activating transcription factor 3) semblent associées à un risque d'hypospadias chez l'homme. Récemment, le gène *MAMLD1* (*CXORF6*) a été caractérisé comme un gène susceptible d'être impliqué dans l'hypospadias. Les mutations de ce gène sont cependant rares chez les patients atteints par ce désordre mais il pourrait être impliqué dans une cascade d'événements induisant l'hypospadias (revue dans Toppari et al., 2010).

Les facteurs génétiques impliqués dans les cancers testiculaires seront traités au paragraphe III.3.2.1.

1.3.2. Mode de vie

Puisque les anomalies décrites ci-dessus résultent d'altérations du développement de l'appareil reproducteur, les principaux facteurs de risques mis en jeu sont ceux auxquels sont exposées les femmes enceintes (et donc leur fœtus) et plus généralement les femmes en âge de procréer. Néanmoins, le principal facteur de risque de présenter une anomalie de l'appareil reproducteur reste la prématurité ou un faible poids de naissance, probablement parce qu'ils sont révélateurs d'un problème général de développement fœtal.

Des études épidémiologiques ont cependant identifié certains facteurs de risque du cryptorchidisme. Pendant la grossesse, la consommation régulière d'alcool et de nicotine (contenue dans les cigarettes ou dans les patchs anti-tabac) serait ainsi à l'origine d'une augmentation dose-dépendante du risque de cryptorchidisme (Damgaard et al., 2007, 2008; Mongraw-Chaffin et al., 2008). De plus, le tabac peut provoquer une diminution de la qualité du sperme et du volume des testicules chez les adultes (Main et al., 2010).

Parallèlement, les mères d'enfants cryptorchides sont significativement plus souvent traitées pour un diabète gestationnel que les mères de garçons normaux (Virtanen et al., 2006). Ces données suggèrent un lien entre le métabolisme du glucose et de l'insuline et la balance hormonale du fœtus en développement. Il a ainsi été proposé qu'une augmentation du taux d'insuline chez la mère et le fœtus puisse modifier de façon délétère le rapport œstrogène/androgène au cours du développement fœtal (revue dans Toppari et al., 2010). En ce qui concerne l'hypospadias, il semble que tout évènement conduisant à une modification de la biosynthèse, du métabolisme périphérique ou de l'action des androgènes chez le fœtus puisse constituer un facteur de risque.

Certaines activités professionnelles qui entraînent une exposition répétée à des xénobiotiques persistants dans l'organisme de la mère constituent aussi des facteurs de risque importants pour le développement du fœtus ou du jeune enfant nourri au sein. Ces molécules sont notamment certains pesticides et fongicides à activité anti-androgénique utilisés dans les exploitations agricoles (vinclozoline, linuron…), les PCBs (polychlorinated biphényls) et les dioxines qui sont maintenant interdits mais très répandus et persistants dans l'environnement, ou encore les PBDEs (polybrominated diphenyl ether) utilisés comme retardateurs de flamme dans une multitude de produits de consommation courante (pour revue, Toppari et al., 2010)

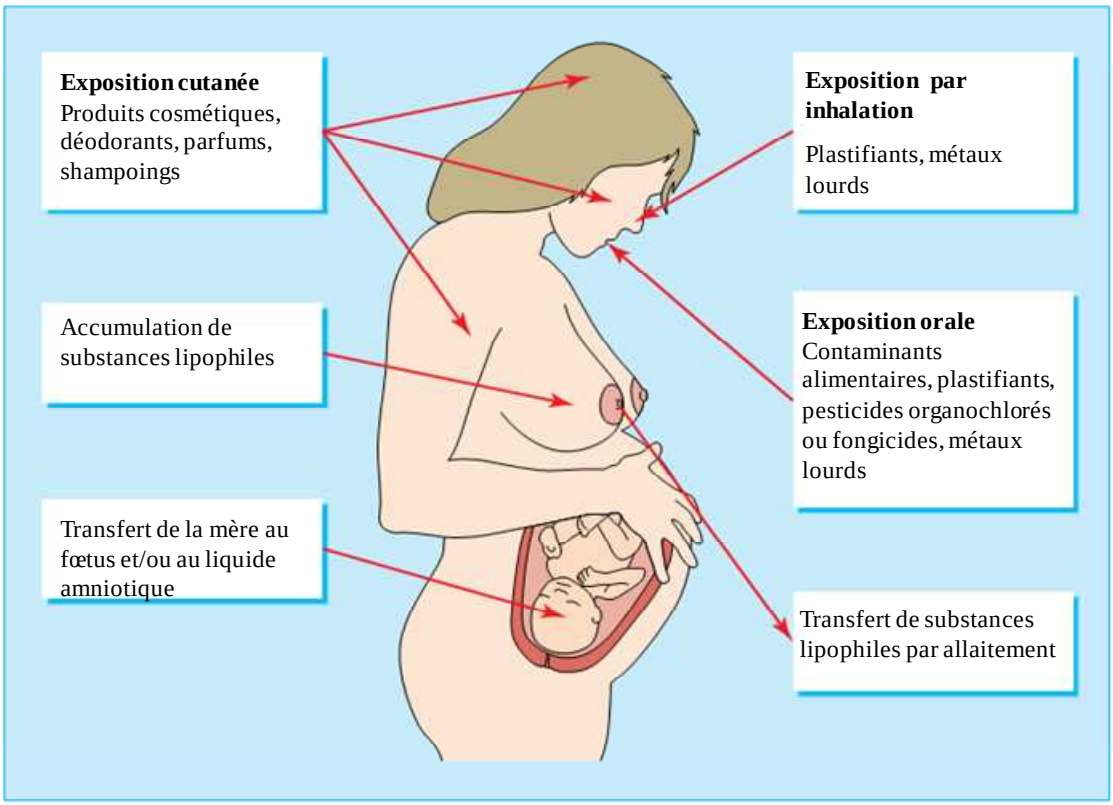


Figure 32 : Voies d'exposition du fœtus humain aux substances chimiques environnementales. (D'après Sharpe et Irvine, 2004).

1.3.3. Exposition aux perturbateurs endocriniens

1.3.3.1. Définition

De nombreuses observations et expériences réalisées au cours des dernières années confortent l'hypothèse initialement formulée par Sharpe et Skakkebaek selon laquelle les problèmes répertoriés dans le domaine de la reproduction masculine pourraient résulter de l'exposition pendant la vie fœtale à des polluants chimiques dont la concentration et la diversité augmentent régulièrement dans l'environnement (Sharpe et Skakkebaek, 1993; Sharpe et Irvine, 2004; Habert et al., 2006).

Les substances chimiques incriminées sont des perturbateurs endocriniens possédant une activité oestrogénique ou anti-androgénique. Par définition, un perturbateur endocrinien est un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme. Il est également défini comme n'importe quelle substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sur sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale (Brevini et al., 2005). Ces molécules vont dérégler la balance œstrogène/androgène en jouant sur la production et/ou l'action de ces hormones et ainsi perturber le développement gonadique.

Comme ces substances sont présentes dans l'eau, le sol, l'air et les aliments, l'homme est en contact continu avec elles dans la vie quotidienne. L'exposition à ces substances diffère d'un individu à l'autre selon son mode de vie, son régime alimentaire et son lieu de travail. Il s'agit généralement d'une exposition chronique à de faibles doses et à un grand nombre de molécules différentes. Ces polluants pénètrent dans l'organisme par ingestion, par inhalation et par absorption ou même à travers le placenta (figure 32) (Sharpe et Irvine, 2004; Main et al., 2010). Certaines substances chimiques telles que les retardateurs de flamme persistent dans l'organisme durant plusieurs années. Elles sont en effet souvent lipophiles et sont stockées dans le tissu adipeux (Main et al., 2007).

1.3.3.2. Origine

Les perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement peuvent être d'origine naturelle comme les phyto-œstrogènes ou d'origine synthétique comme les pesticides, les fongicides, les insecticides, les produits chimiques industriels et les produits pharmaceutiques

(Brevini et al., 2005). On peut distinguer deux principales catégories de perturbateurs endocriniens : les xéno-œstrogènes et les anti-androgènes.

(a) Les xéno-œstrogènes

Par définition les xéno-œstrogènes sont des perturbateurs endocriniens qui interférent avec les œstrogènes endogènes. Ces molécules peuvent agir comme agonistes ou antagonistes. Ils présentent une grande diversité structurelle mais possèdent tous en commun un cycle phénolique lipophile ainsi que des composants hydrophobes. Ils partagent ces caractéristiques avec les hormones stéroïdes (Watson et al., 2007). Dans la suite de ce paragraphe, quelques exemples de xéno-œstrogènes sont détaillés.

Le premier xéno-œstrogène synthétisé a été le diéthylstilbestrol (DES), qui est un puissant agoniste de l'ER et dont les effets sur la fonction de reproduction humaine ont fait l'objet de nombreuses études. Cette molécule a été largement utilisée entre 1938 et 1971 chez les femmes enceintes pour prévenir les avortements spontanés. Elle a été interdite suite à la constatation que cette exposition était responsable de malformations et de cancers génitaux chez les filles des mères exposées au DES (Schrager et Potter, 2004).

Les effets du DES chez les garçons sont controversés (Olesen et al., 2007). En effet, plusieurs études montrent que les fils de femmes traitées pendant leur grossesse par du DES ont eu plus de problèmes de malformations génitales à la naissance et/ou des cancers testiculaires ainsi qu'une infertilité à l'âge adulte (Gill et al., 1979 ; revue dans Olesen et al., 2007). Cependant l'étude de Strohsnitter et al. ne révèle aucune augmentation des cas de cancer testiculaire parmi les hommes exposés *in utero* au DES (Strohsnitter et al., 2001). Ces contradictions pourraient être dues à la phase de la grossesse pendant laquelle a lieu l'exposition, suggérant l'existence de périodes de sensibilité du testicule aux xéno-estrogènes (Habert et al., 2006).

Le bisphénol A (BPA) constitue un autre exemple de xéno-œstrogène largement étudié. Il s'agit d'un produit industriel utilisé comme monomère dans la synthèse des matières plastiques et des résines époxy. Il est présent dans les revêtements de boîtes de conserve, certains biberons, les résines d'obturation utilisées en dentisterie (Cravedi et al., 2007). Il a été démontré que l'exposition *in utero* ou pendant la période néonatale au BPA, altère la spermatogenèse et la stéroïdogenèse chez les rats (Wetherill et al., 2007). L'activité œstrogénique du BPA lui permet d'interagir avec le récepteur ERβ exprimé dans les cellules de Sertoli et de moduler son activité. De ce fait, l'expression de protéines de jonctions telles

que la connexine 43 et la N-cadhérine est altérée et les connexions entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont affectées (Salian et al., 2009). Le BPA peut induire une réponse cellulaire à de très faibles doses, à l'échelle pico ou nanomolaire, alors qu'à de fortes doses les effets sont invisibles (Myers et al., 2009). Les travaux de Wozniak et al. montrent que l'exposition de cellules hypophysaires de rat (GH3/B6) à une concentration de 10^{-9} M de BPA induit la sécrétion de prolactine par augmentation de la concentration du calcium intracellulaire via un récepteur membranaire des œstrogènes (mERα) (Wozniak et al., 2005). Bouskine et son équipe ont également observé l'effet délétère de l'exposition *in vitro* de la lignée JKT-1 (lignée dérivée de tumeur séminomateuse) à de faibles doses de BPA (10^{-9} à 10^{-12}M). En effet, cette exposition induit, par activation d'un récepteur membranaire GPCR (G Protein-Coupled Receptor), la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP response-element–binding protein) et de la protéine du rétinoblastome (RB) impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. L'inactivation de cette protéine par phosphorylation stimule la prolifération des cellules cancéreuses (Bouskine et al., 2009).

Les parabènes récemment retirés de nombreux produits, sont aussi des xéno-œstrogènes utilisés comme conservateurs dans les aliments, les produits cosmétiques et pharmaceutiques. Ils sont rapidement absorbés, métabolisés dans l'intestin et le foie et excrétés par l'urine. Les travaux d'Oishi ont montré que le butyl-paraben altère la production du sperme, et que le propyl-paraben induit une réduction de la concentration sérique de testostérone de façon dose-dépendante chez les rats exposés à des doses croissantes de 10, 100 et 1000 mg/Kg/poids/jour de ces substances (Oishi, 2002a, 2002b). De la même façon, les rats mâles exposés *in utero* ou par lactation au butyl-paraben présentent une diminution de la quantité de sperme à l'âge adulte (Kang et al., 2002).

(b) Les phtalates (Anti-androgènes?)

Il existe de nombreux perturbateurs endocriniens ayant des propriétés anti-androgèniques. Certains agissent comme antagonistes des récepteurs des androgènes (vinclozoline, procymidone, linuron), alors que d'autres comme les phtalates réduisent la synthèse d'androgènes (Fisher, 2004).

De nombreuses études menées sur différentes espèces ont révélé un effet perturbateur des phtalates sur le développement de l'appareil reproducteur. En effet, ces composés sont des additifs utilisés assez couramment dans divers matériaux, notamment les plastiques. Ils interviennent dans la fabrication et la composition du chlorure de polyvinyle (PVC), de

jouets, peintures industrielles, matériels électriques, détergents, solvants, produits pharmaceutiques et cosmétiques, emballages plastiques, etc. La consommation de phtalates en Europe est d'environ un million de tonnes par an. Ils sont très répandus dans l'environnement et l'on peut également les trouver dans les aliments, après leur migration à partir d'emballages (Cravedi et al., 2007).

L'effet délétère d'une exposition *in utero* aux phtalates a été montrée en détail chez les rongeurs. En effet, chez le rat, les mâles exposés *in utero* aux phtalates [mono-n-butyl phtalate (MBP), di-n-butyl phtalate (DBP), ou di-2-éthylhexyl phtalate (DEHP)] développent de façon dose-dépendante une altération de la migration testiculaire et une réduction plus ou moins importante de la production de spermatozoïdes (Shono et al., 2005; Andrade et al., 2006; Mahood et al., 2007). De même, des testicules fœtaux de souris cultivés pendant 3 jours en présence de mono-(2-ethylhexyl) phtalate (MEHP) montrent une réduction du nombre de gonocytes liée à une apoptose (Lehraiki et al., 2009). Néanmoins, le mode d'action des phtalates apparaît différent selon les espèces de rongeurs. Les données portant sur les rats indiquent un effet anti-androgénique (Scott et al., 2008). Par contre, chez la souris, ni le récepteur des androgènes, ni les récepteurs alpha ou beta des estrogènes ne sont impliqués dans les effets observés (Lehraiki et al., 2009). En revanche, l'implication de récepteurs non spécifiques des stéroïdes comme le GPER n'a pas été explorée.

Les effets négatifs des phtalates sur le développement de l'appareil reproducteur masculin sont aussi bien démontrés chez l'homme. Une corrélation a été établie entre l'exposition aux phtalates des femmes enceintes (mesurée par la concentration des phtalates dans l'urine) et l'altération du développement des cellules germinales, le risque d'hypospadias et de cryptorchidisme diagnostiqués chez les nouveau-nés (Lambrot et al., 2009; Ormond et al., 2009).

1.3.3.3. Interactions gènes-environnement

L'intrication entre facteurs environnementaux et évènements touchant le patrimoine génétique est à considérer avec attention pour comprendre les effets à long terme d'une contamination par des perturbateurs endocriniens et donc l'augmentation de l'incidence de certaines pathologies comme les désordres de la reproduction.

Bien que la plupart des perturbateurs endocriniens n'aient pas la capacité de provoquer directement des mutations dans la séquence d'ADN génomique, de plus en plus d'études

indiquent que ces molécules pourraient entraîner des effets délétères chez l'adulte, après une exposition fœtale, et ce, sur plusieurs générations d'individus.

Plusieurs études portant sur des vrais jumeaux élevés dans des endroits différents, montrent qu'ils présentent des fréquences différentes pour certaines pathologies, ce qui suggère que les facteurs environnementaux sont à l'origine des pathologies de la reproduction indépendamment des facteurs génétiques (Kukreja et Maclaren, 2002). Dans une revue récente, Skinner et al. (2010) différencient :

- les effets multigénérationnels qui correspondent aux conséquences d'une exposition directe des cellules somatiques et germinales du fœtus et se traduisent par des pathologies aux générations F1 et F2. Ces effets ont été montrés suite à une exposition à différents composés comme le BPA (Dolinoy et al., 2007; Yaoi et al., 2008), le DES (Hatch et al., 2010; Newbold et al., 2006) et le flutamide (Anway et al., 2008). Il est intéressant de noter que les phénotypes sont souvent différents selon la génération observée (pour revue, Skinner et al., 2010).

- les effets transgénérationnels qui sont transmis par la lignée germinale en absence d'exposition directe aux perturbateurs endocriniens en F3, F4…et résulteraient d'une altération épigénétique de l'ADN.

Plusieurs processus épigénétiques sont susceptibles d'intervenir comme la méthylation de l'ADN, les modifications des histones ou de la structure de la chromatine ou encore les ARN non-codants. L'effet transgénérationnel d'une exposition à un facteur environnemental sur ces processus épigénétiques n'a, pour l'instant, été démontré que chez l'animal (rat) après une exposition à un antifongique, la vinclozoline (pour revue, Skinner et al., 2010). Il semble fortement probable que des molécules tels que le DES ou le bisphénol A, pour lesquelles la génération F3 humaine est à venir modifient l'état de méthylation de l'ADN et des histones.

2. Puberté précoce

Une puberté précoce se définit par l'apparition précoce d'un ou plusieurs caractères sexuels. Il s'agit souvent d'une situation à la limite de la normale.

2.1. Symptômes hommes/femmes

Les études menées sur la puberté précoce depuis les années 50 montrent que chez les filles, l'âge de l'apparition des caractères sexuels et celui de la ménarche ont baissé. Une

récente étude danoise a constaté une diminution d'environ un an de l'âge auquel les seins se forment chez les filles examinées entre les années 2006 et 2008 par rapport à celles de la période 1991-1993 (Aksglaede et al., 2009; Mouritsen et al., 2010). Les mêmes observations ont été réalisées dans d'autres pays européens mais aussi en Chine et aux Etats-Unis (Golub et al., 2008; Ma et al., 2009). Par ailleurs, l'exposition *in utero* ou par allaitement à des substances chimiques telles que le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), le polybromobiphényle (PBB) ou les phtalates pourrait diminuer l'âge de la ménarche d'environ un an (Den Hond et Schoeters, 2006).

Chez les garçons, l'âge moyen de la puberté est également soumis à des perturbations. Contrairement aux filles, la puberté précoce est moins fréquente. Par contre, une tendance à une puberté tardive est de plus en plus observée chez les garçons. La dominance des effets oestrogéniques et antiandrogéniques de l'ensemble des polluants environnementaux explique ces observations (Mouritsen et al., 2010). Les garçons exposés par l'alimentation à des molécules extrêmement stables comme les polychlorobiphényles (PCB) et les polychlorodibenzo-furanes (PCDF) développent une puberté tardive avec un pénis de petite taille par rapport aux garçons de même âge (Toppari et Juul, 2010).

Les taux élevés de ces polluants dans l'organisme peuvent perturber le développement pubertaire et ainsi entraîner un risque de complication plus tard dans la vie, notamment un risque de cancer (Mouritsen et al., 2010).

Il apparaît que le risque de cancer mammaire et ovarien sont associés à un nombre élevé des cycles ovulatoires. Ainsi, ces risques s'élèvent chez les filles ayant une ménarche précoce (Golub et al., 2008; Walvoord, 2010).

Selon certaines études épidémiologiques, le risque élevé de cancer testiculaire est associé à la puberté précoce (Golub et al., 2008). D'autres études n'observent aucune corrélation significative entre ces deux événements (Walvoord, 2010).

2.2. Variations ethniques/Enfants adoptés

Des déclenchements pubertaires précoces ont été observés plus fréquemment dans la population d'enfants adoptés venant de pays étrangers.

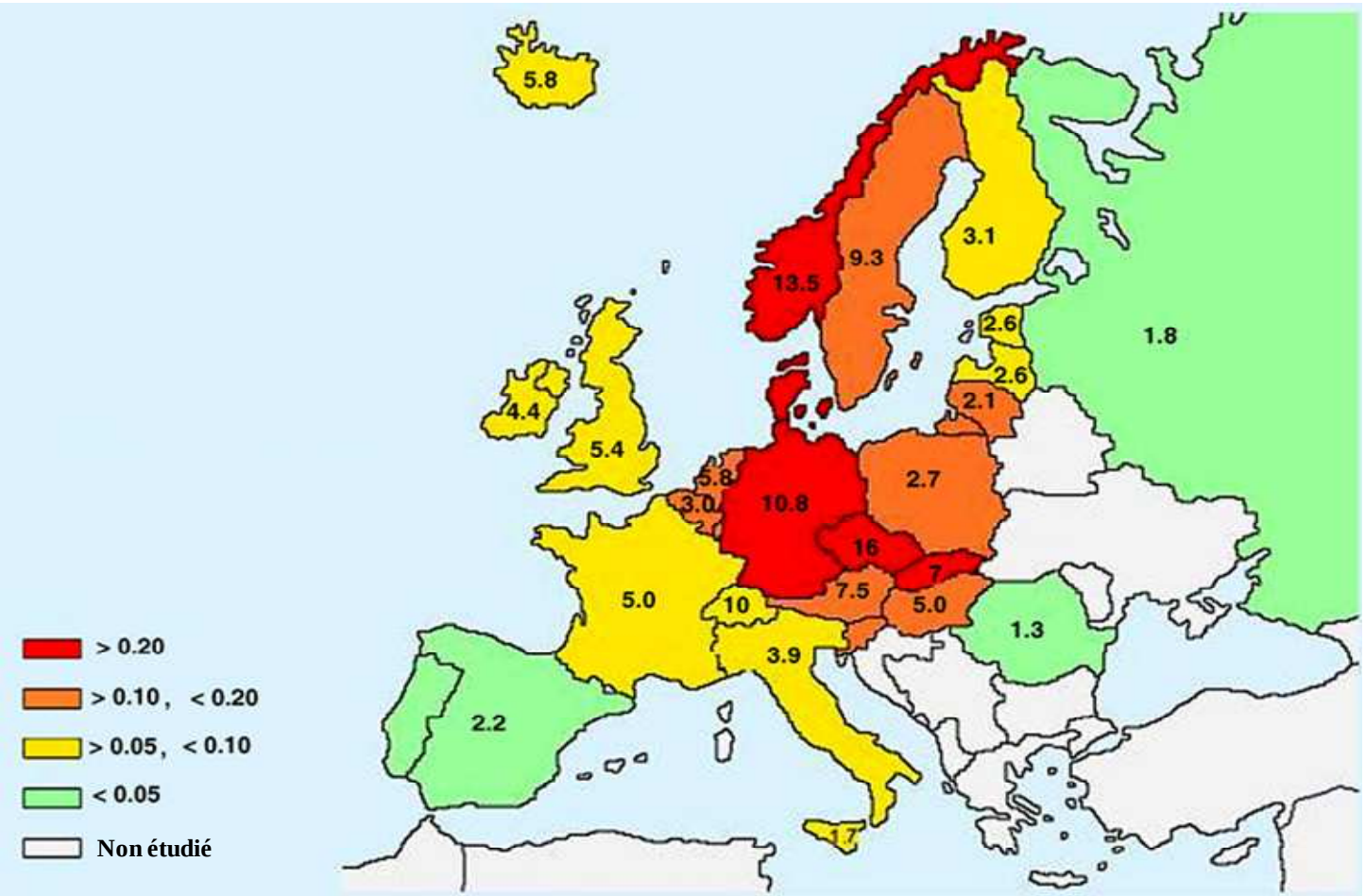


Figure 33 : Incidence des cancers testiculaires et valeur annuelle de l'augmentation de l'incidence de ces cancers en Europe. Le nombre représente l'incidence des cas de cancers testiculaires/100000. La couleur représente l'augmentation de l'incidence de cas de cancers testiculaires/100000/an. (D'après Huyghe et al., 2007).

Les facteurs étiologiques en cause sont encore méconnus. Cependant, les différences ethniques et les facteurs environnementaux (tels que l'état nutritionnel et l'exposition aux perturbateurs endocriniens, semblent jouer un rôle très important (Teilmann et al., 2006).

Selon une étude danoise, le risque de développer une puberté précoce est 10 à 20 fois plus élevé chez les filles adoptées par rapport aux filles originaires du Danemark (Teilmann et al., 2006). Ce risque est encore plus élevé (80 fois) chez des filles adoptées en Belgique par rapport à celles natives du pays. Les auteurs expliquent ce phénomène par une exposition intense aux perturbateurs endocriniens durant l'enfance dans le pays d'origine. Cette exposition à son tour accélère une activation précoce de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades (Den Hond et Schoeters, 2006).

Le risque de puberté précoce varie selon le pays d'origine, par exemple au Danemark, 83% des filles indiennes adoptées avaient une puberté précoce contre 50-60% des filles venant de l'est de l'Europe (Teilmann et al., 2009). De plus, ce risque augmente avec l'augmentation de l'âge d'adoption. En effet, le risque de déclencher une puberté précoce n'était pas élevé chez 99% d'enfants coréens adoptés au Danemark et ayant moins d'un an au moment de l'adoption (Teilmann et al., 2006). Ces observations confirment que l'exposition aux polluants chimiques pendant l'enfance a aussi des conséquences à l'âge adulte.

3. Cancers testiculaires

3.1. Données cliniques

3.1.1. Epidémiologie

Le cancer du testicule est une tumeur rare mais qui est la tumeur la plus fréquente chez les hommes âgés de 15 à 34 ans. Une augmentation de l'incidence du cancer du testicule est observée dans les dernières décades dans la majorité des pays industrialisés. Aux Etats-Unis, environ 8000 hommes sont touchés chaque année (Verville, 2009). En Europe, l'incidence du cancer du testicule varie d'un pays à l'autre : par exemple de 0,8/100000 au Portugal à 15,4/100000 au Danemark. La vitesse de l'augmentation de cette incidence est aussi différente entre les pays européens (figure 33) (Huyghe et al., 2007). Le cancer du testicule survient souvent chez des hommes présentant une infertilité, une spermatogenèse déficiente ou un cryptorchidisme (Sonne et al., 2008; Verville, 2009).

3.1.2. Diagnostic

Une tumeur du testicule se présente souvent comme une masse solide, dure, à l'intérieur du testicule. Cette masse est indolore dans la majorité des cas (une douleur testiculaire diffuse est rapportée dans seulement 10 à 20% des cas). Le patient peut se présenter pour une augmentation de la taille du testicule ou du scrotum. La masse tumorale peut déformer la surface testiculaire réalisant une tuméfaction. Un changement de la texture du testicule, un œdème peut aussi révéler le diagnostic (Verville, 2009).

Les symptômes de cancer du testicule varient en fonction du type de cancer. Il existe différents symptômes associés au cancer testiculaire et pouvant éventuellement précéder le diagnostic. Un de ces symptômes est la gynécomastie unilatérale ou bilatérale retrouvée dans 7 à 11% des patients atteints de cancer du testicule (Verville, 2009). Elle apparaît quand le rapport œstrogènes sur androgènes est augmenté du fait d'une activation inhomogène de la stéroïdogenèse engendrée par la sécrétion de l'hormone chorionique gonadotrope (hCG-β) (Hassan et al., 2008). En général, un diagnostic précoce de cancer du testicule augmente les chances de guérison (Verville, 2009).

Les examens cliniques sont souvent nécessaires afin de diagnostiquer le cancer du testicule. L'échographie scrotale constitue l'examen de référence en matière d'exploration morphologique des bourses. Elle permet de déterminer la taille de la masse tumorale et sa structure (solide ou kyste), et de préciser la différence entre une lésion intra ou extra-testiculaire (Verville, 2009).

Les marqueurs tumoraux principalement l'alpha-fœtoprotéine (AFP), la (hCG-β) et la lactate déshydrogénase (LDH), ont une valeur diagnostique. Ces marqueurs donnent des informations orientant l'histologie supposée de la tumeur (Horwich et al., 2006), mais ils sont surtout utiles au pronostic et au suivi de l'efficacité thérapeutique.

En cas de tumeur du testicule perçue cliniquement et/ou trouvée à l'échographie, une orchidectomie est réalisée, mais avant cette étape une conservation du sperme sera proposée. L'orchidectomie doit être réalisée dans la semaine, après dosage des marqueurs tumoraux, une analyse histologique extemporanée d'une section cryo-préservée devant être réalisée avant l'orchidectomie définitive afin de permettre une chirurgie sélective (tumorectomie), particulièrement en cas de tumeur bénigne (Verville, 2009).

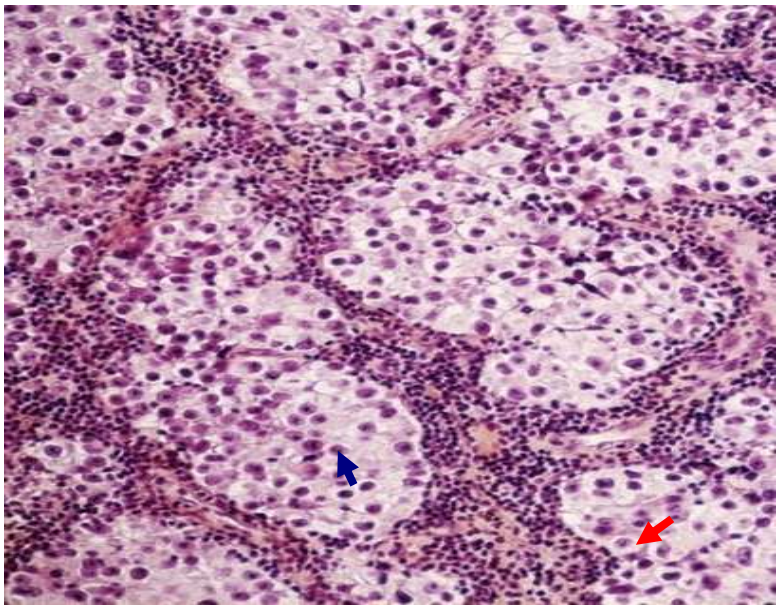


Figure 34 : Coupe histologique d'une tumeur séminomateuse. Le cytoplasme est clair (flèche rouge). Le noyau apparaît rond, dense, hyperchromatique (flèche bleue). (D'après Verville, 2009).

3.1.3. Classification histopathologique

Les tumeurs testiculaires germinales (TGCTs) représentent 95 % de l'ensemble des tumeurs testiculaires. La classification des TGCTs la plus couramment utilisée est celle proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) revue en 2004. Cette classification est basée sur les caractères histologiques des tumeurs. Elle divise les TGCTs en deux groupes : les TGCTs pures et les TGCTs mixtes.

Les TGCTs pures sont des tumeurs composées d'un seul type histologique. On distingue :

- les tumeurs séminomateuses (classiques ou spermatocytaires) ;
- les tumeurs non-séminomateuses : carcinome embryonnaire, tumeur du sac vitellin, choriocarcinome, tératome (mature, immature, à transformation maligne), polyembryome.

Par contre, les TGCTs mixtes comprennent des tumeurs germinales composées d'au moins deux types histologiques. A l'exception du séminome spermatocytaire qui se voit presque toujours sous forme pure, ces tumeurs peuvent être composées de n'importe quelle association de tumeurs séminomateuses et non-séminomateuses (Bosl et Motzer, 1997; Algaba et Sesterhenn, 2010).

Dans ce qui suit, nous allons aborder deux types de TGCTs, le séminome et le carcinome embryonnaire.

Les séminomes représentent environ 50 % des tumeurs germinales (Carver et Sheinfeld, 2005; Ulbright, 2005). Deux types de séminome sont distingués : le séminome classique ou typique, et le séminome spermatocytaire. Le séminome typique survient majoritairement au cours de la 4ème ou la 5ème décade de la vie. Ce séminome est par définition considéré comme pur mais il peut être associé à d'autres types de cellules tumorales, dans ce cas il est considéré comme tumeur mixte. L'aspect histologique est stéréotypé. La population tumorale est monomorphe, composée de cellules de grande taille (15 à 25 µm) possédant un cytoplasme clair ou discrètement éosinophile. Le noyau apparaît rond, dense, hyperchromatique, renfermant un ou deux nucléoles proéminents (figure 34). Les cellules séminomateuses présentent un marquage membranaire relativement constant après application de l'anticorps dirigé contre la Placental Alkaline Phosphatase (PLAP). De même, elles expriment constamment c-KIT et OCT3/4. En revanche, elles n'expriment pas l'AFP (Cheville, 1999;

Ulbright, 2005). En ce qui concerne le séminome spermatocytaire, cette forme représente 2 % de l'ensemble des TGCTs. La médiane de survenue se situe au-delà de 50 ans. Cette variété de séminome ne métastase quasiment pas (Cheville, 1999; Ulbright, 2005).

Le carcinome embryonnaire, tumeur germinale non-séminomateuse représente 10 % des tumeurs testiculaires pures et environ de 44% de tumeurs mixtes (Cheville, 1999; Ulbright, 2005). Il survient majoritairement chez les sujets jeunes ayant entre 15 et 34 ans. Il peut s'associer à d'autres composantes non-séminomateuses ou à un séminome, avec une capacité à se différencier en d'autres variants pathologiques (Gori et al., 2005). Histologiquement, la tumeur est composée de groupes cohésifs de cellules carcinomateuses. Ces cellules ont un cytoplasme de limites imprécises. Le noyau, volumineux, irrégulier et vésiculeux, possède un nucléole proéminent. Les études montrent que 86 à 100% de ces cellules expriment la PLAP (Cheville, 1999).

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

Il existe en outre des tumeurs non germinales du testicule. Ces tumeurs ne représentent que 5% de l'ensemble de tumeurs du testicule. 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 (Verville, 2009).

3.1.4. Traitements

L'orchidectomie constitue la première étape indispensable dans un but diagnostique, mais également thérapeutique lorsque une tumeur est détectée. L'analyse anatomopathologique de la pièce d'orchidectomie est nécessaire pour les options thérapeutiques suivantes. D'abord les TGCTs doivent être classées en fonction de leurs éléments histologiques, paracliniques et radiologiques. La classification utilisée est celle du comité American Joint Committee on Cancer (AJCC)/International Union Against Cancer (UICC), appelée tumor-node-metastasis (TNM), et adoptée en 1997 avec sa mise à jour en

pT	Stade pathologique de la tumeur primitive
pTX pT0 pTis pT1 pT2 pT3 pT4	Tumeur primitive impossible à évaluer. Aucun élément pour la tumeur primitive. Carcinome in situ (ou néoplasie intra-tubulaire). Tumeur limitée au testicule et à l'épididyme sans envahissement vasculaire ou lymphatique, pouvant envahir l'albuginée, mais pas la vaginale. Tumeur limitée au testicule et à l'épididyme avec envahissement vasculaire et/ou lymphatique, dépassant l'albuginée et la vaginale. Tumeur envahissant le cordon spermatique avec ou sans envahissement vasculaire et/ou lymphatique. Tumeur envahissant le scrotum avec ou sans envahissement vasculaire ou lymphatique.
N	Extension ganglionnaire lymphatique régional
N0 N1 N2 N3	Absence de métastases. Inférieure à 2 cm. Comprise entre 2 et 5 cm. Supérieure à 5 cm.
M	Métastases à distance
M0 M1	Absence de métastases à distance. Métastases à distance M1a : ganglions lymphatiques non régionaux ou métastases pulmonaires. M1b : autres localisations.
	Classification des marqueurs tumoraux sériques (UICC, 2002)
SX S0 S1–S3	Absence de marqueur tumoral ou examens non effectués. Marqueurs tumoraux dans les valeurs normales. Au moins un marqueur tumoral augmenté. •S1 : LDH < 1,5 fois la normale ; hCG < 5000 UI/L ; AFP < 1000 µg/L. •S2 : LDH de 1,5 à 10 fois la normale ; hCG : 5000 à 50 000 UI/L ; AFP 1000 à 10 000 µg/L. •S3 : LDH > 10 fois la normale ; hCG > 50 000 UI/L ; AFP >10 000 µg/L.

Tableau 3 : Classification TNM (T pour Tumeur, N pour nodes [ganglions], M pour métastase) selon les comités American Joint Committee on Cancer (AJCC)/International Union Against Cancer (UICC). (D'après Carver et Sheinfeld, 2005; Houlgatte et Bauduceau, 2005).

Stade	T	N	M	S
I	pT1–4	N0	M0	chaque S
IIA/B	chaque pT	N1, N2	M0	S0, S1
IIC	chaque pT	N3	M0	S0, S1
III	chaque pT	chaque N	M1	chaque S

Tableau 4 : Classification par stades selon l'AJCC. Le Stade I qui regroupe les tumeurs apparemment limitées au testicule est subdivisé suivant l'existence ou non d'une infiltration vasculaire ou lymphatique dans le cordon spermatique. Une autre sous-classe est consacrée aux patients qui présentent des marqueurs élevés sans aucune atteinte clinique ou radiologique des sites ganglionnaires ou viscéraux. Le Stade II rassemble tous les patients ayant une diffusion ganglionnaire rétro péritonéale de leur maladie, mais sans métastases viscérales, avec ou sans élévation des marqueurs. Le Stade III est réservé aux malades présentant des métastases viscérales ou des taux sériques de marqueurs tumoraux élevés.

2002 (tableau 3 et 4) (Carver et Sheinfeld, 2005). Le bilan de traitement de ces tumeurs est ensuite basé sur le type de tumeur et son stade d'extension (Verville, 2009).

Chez les patients atteints de séminomes de stade I, n'ayant pas de métastases ganglionnaires ou à distance, il y a trois stratégies thérapeutiques comparables après l'orchidectomie. Une radiothérapie qui consiste à délivrer une dose de 20 à 30 Gy sur les ganglions rétro-péritonéaux aortiques, sera effectuée en premier. Cette option thérapeutique constitue le standard de référence en raison de l'importante radiosensibilité des séminomes. Le taux de rechute des séminomes de stade I après radiothérapie est particulièrement faible, entre 3 et 5%. Une chimiothérapie aura alors de bonnes chances de guérir ces rechutes (Houlgatte et Bauduceau, 2005; Howdeshell et al., 2007; Oldenburg et al., 2009). La deuxième stratégie est le contrôle rapproché (surveillance) qui est proposé comme alternative à la radiothérapie systématique chez les patients présentant une tumeur séminomateuse apparemment limitée au testicule. La surveillance doit comporter l'analyse des marqueurs tumoraux sériques et un scanner thoraco-abdomino-pelvien. 15 à 20% de rechutes ont été observés (Warde et al., 2002). Cependant la surveillance peut être proposée comme première option dans le cas où les tumeurs n'ont pas une infiltration vasculaire ou lymphatique dans le cordon spermatique avec une taille inferieure à 4cm ; le taux de rechute est de 6% (Albers, 2007). Les limites de cette attitude sont liées au risque de rechutes tardives dont le diagnostic est effectué dans certains cas à un stade avancé. Il est également parfois reproché à cette option de prise en charge son coût élevé, lié aux examens répétitifs que nécessite la surveillance. De plus, le diagnostic tardif de ces rechutes peut conduire à un traitement plus lourd avec des effets secondaires, à une durée plus importante et à un coût très élevé (Houlgatte et Bauduceau, 2005; Sava et al., 2008). La troisième stratégie est la chimiothérapie qui constitue également pour certains une alternative à la radiothérapie. Les études montrent que l'utilisation de deux perfusions de carboplatine à 3 semaines d'intervalle apporte un bénéfice plus important. Les résultats très encourageants de cette attitude thérapeutique sont confortés par sa plus grande maniabilité, ce qui diminue également les contraintes liées à une surveillance prolongée (Houlgatte et Bauduceau, 2005).

Pour les séminomes de stade II, avec envahissement ganglionnaire pelvien ou rétro-péritonéal, le traitement des patients au stade IIA/B repose encore classiquement sur la radiothérapie, après l'orchidectomie. Le taux de rechute varie d'une étude à l'autre. Une chimiothérapie sera proposée comme alternative à la radiothérapie (Detti et al., 2009).

Régime	Taux de réponse	Réponse complète après CT avec ou sans chirurgie	Pas d'évidence de maladie	Mortalité associée au traitement
VeIP	–	49.6%	23.7%	–
VIP/VeIP	63%	44%	30%	–
HD-CEC	–	40%	21%	12%
HD-ICE	63%	21%	21%	3%
TIP premier rechute	80%	77%	73%	–
TIP BEP raté	60%	18.6%	36%	–
TIN	75%	87.5%	75%	–
TG	31%	18.7%	12.5%	–
GO	46%	5.7%	11.5%	–
TGP	50%	–	16.6%	–
IrP/N	50%	10%	45%	–
IrO	40%	22.2%	17%	–
IPO	71%	18%	32%	–

Tableau 5 : Résumé des réponses à divers traitements anticancéreux. BEP, bleomycin, etoposide et cisplatin; CT, chimiothérapie; HD-CEC, dose élevée de carboplatin, etoposide, cyclophsphamide; HD-ICE, dose élevée de carboplatin, etoposide, ifosfamide; IPO, paclitaxel, irinotecan, oxaliplatin; IrO, irinotecan, oxaliplatin; IrP/N, irinotecan, cisplatin/nedaplatin; TIP, paclitaxel, ifosfamide, cisplatin TIN, paclitaxel, ifosfamide, nedaplatin; VeIP, vinblastin, ifosfamide, cisplatin; VIP, etoposide, ifosfamide, cisplatin. (D'après Nakamura et Miki, 2010).

En ce qui concerne les séminomes de stade IIC (ganglions mesurant plus de 5 cm de diamètre) et les séminomes métastatiques de stades III, qui sont relativement rares en raison du diagnostic souvent précoce de cette tumeur, la chimiothérapie est utilisée. Elle est basée sur l'utilisation de trois cures de BEP (Bléomycine, Etoposide, Cisplatine) ou 4 cures de EP (Etoposide – Cisplatine) (Horwich et al., 2006; Oldenuburg et al., 2009). Le traitement des tumeurs non-séminomateuse de stade I après une orchidectomie est un sujet controversé, mais ce traitement repose généralement sur trois possibilités: une surveillance active qui nécessite des contrôles cliniques rapprochés et des dosages des marqueurs tumoraux, complétés par des examens radiologiques. C'est l'attitude standard chez les patients à faible risque. S'il y a la preuve d'un envahissement vasculaire et/ou lymphatique, la deuxième possibilité sera la dissection ganglionnaire lymphatique rétro-péritonéale ou la lymphadénectomie rétropéritonéale (RPLND) qui est une intervention chirurgicale importante permettant un curage ganglionnaire, mais non dépourvue de risque. Cette option thérapeutique est préconisée aux Etats-Unis, alors qu'en Europe, la préférence est donnée à une chimiothérapie adjuvante par EP sur quatre cycles ou BEP sur trois cycles (Williams et al., 2009; Nakamura et Miki, 2010). Cependant cette dernière attitude peut être associée à un risque de développer un tératome chimiorésistant quand elle est proposée comme option primaire (Williams et al., 2009).

La chimiothérapie primaire constitue le traitement de référence chez les patients atteints de tumeurs non-séminomateuses de stade II et III avec une métastase à distance. En effet, une chimiothérapie basée sur BEP sera proposée, suivie d'une exérèse des masses tumorales rétro-péritonéales résiduelles, éventuellement complétées par un curage RPLND. Certaines équipes, américaines notamment, préconisent une RPLND primaire chez les patients présentant une simple atteinte ganglionnaire régionale avec un dosage normal des marqueurs tumoraux (Oldenburg et al., 2009). Néanmoins, de nombreux agents anticancéreux ont été utilisés dans ces 50 dernières années en montrant des réponses plus ou moins attendues tableau 5 (Nakamura et Miki, 2010).

Après la chimiothérapie, les masses tumorales résiduelles doivent être disséquées par curage RPLND, en raison de leurs capacités à grandir et se transformer en tumeurs malignes. C'est le cas des tératomes qui présentent plus de 30% de masses résiduelles. Cependant, après dissection des tumeurs résiduelles par RPLND, 50% des cas peuvent rechuter. Dans ce cas, une chimiothérapie supplémentaire est nécessaire (Nakamura et Miki, 2010).

En dehors des effets secondaires de la radiothérapie à court terme comprenant la fatigue et les troubles gastro-intestinaux de type nausées et vomissements, il faut essentiellement retenir les complications à long terme tels que la toxicité cardiaque potentielle et le risque de développer un second cancer (Zagars et al., 2004; Verville, 2009). Le risque potentiel carcinogène de ces irradiations apparaît faible pour les doses et les champs actuellement utilisés dans les stades I. En revanche, il apparaît non négligeable pour les stades N1 et N2 avec des doses plus importantes (Houlgatte et Bauduceau, 2005).

Le risque d'infertilité lié à la chimiothérapie peut toucher un pourcentage appréciable d'hommes. Selon les travaux de Brydøy et al., après une durée moyenne de 12 ans, 20% d'hommes traités par cisplatine ont toujours des problèmes de fertilité (Brydøy et al., 2010). Ce risque diffère selon l'âge, les doses cumulées et les associations de médicaments cytotoxiques utilisées au moment du traitement. La technique de préservation de la fertilité éprouvée est la cryoconservation de sperme (Magelssen et al., 2006).

3.2. Origine des TGCTs

3.2.1. Facteur génétiques

Les données épidémiologiques ont montré que les cancers testiculaires, de même que le cryptorchidisme et l'hypospadias, seraient dus en partie à des facteurs héréditaires. Czene et son équipe ont analysé la part des facteurs génétiques dans 15 types de cancers différents au sein de la population suédoise : les cancers testiculaires occupent la troisième place derrière les cancers de la thyroïde et des glandes endocrines avec implication de facteurs génétiques dans 25% des cas (Czene et al., 2002). Un argument supplémentaire en faveur d'une composante héréditaire dans le développement de ce cancer vient d'une étude selon laquelle le risque de cancer testiculaire est deux fois plus élevé chez les garçons ayant un père atteint (Westergaard et al., 1996). Il est 12 fois plus élevé chez les hommes ayant un frère atteint (Greene et al., 2010).

Les gènes impliqués dans les cancers testiculaires familiaux sont encore méconnus. En effet, les tumeurs apparaissent souvent au sein de gonades dysgénésiques (voir plus haut) et il est alors difficile de distinguer les facteurs liés aux altérations d'ontogenèse gonadique en général, de ceux spécifiquement impliqués dans le développement d'un cancer testiculaire. Certes, un gène de prédisposition en Xq27, appelé *TGCT1* (Testicular Germ Cell Tumour 1), ainsi que d'autres régions telles que 2p23, 3p12, 3q26, 12p13-q21, et 18q21-q23 sont

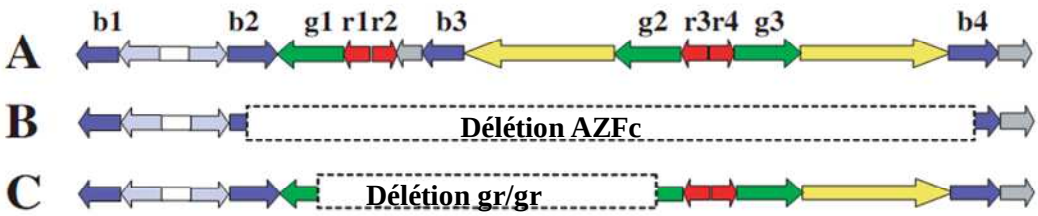


Figure 35 : La région AZFc du chromosome Y humain. (A) Structure de référence de la région AZFc avec les séquences répétées en différentes couleurs. (B) Délétion de la région AZFc. (C) Délétion gr/gr de la région AZFc. (D'après Yen, 2007).

suspectés, mais aucune donnée statistique n'est significative (Greene et al., 2010). La délétion partielle gr/gr d'une séquence d'ADN de 1,6 Mb de la région AZFc (suite à une recombinaison homologue entre les séquences gr répétées) sur le bras long du chromosome Y (Yq11) (figure 35) qui est associée à l'infertilité, semble aussi impliquée dans les cancers testiculaires : elle a été retrouvée dans 3% des cas de cancers familiaux et dans 2% des cas de cancers sporadiques (Nathanson et al., 2005).

Une autre pièce du puzzle provient de l'étude des patients présentant des dysgénésies gonadiques d'origines diverses. En effet, ceux qui possèdent un chromosome Y dans leur caryotype présentent un risque accru de développer une tumeur testiculaire suggérant la présence d'un « locus oncogénique » sur ce chromosome (Mendonca et al., 2009). Le gène *TSPY* (testis-specific protein Y) humain, est localisé dans la région GBY gonadoblastoma (locus oncogénique sur le chromosome Y). Ce gène, absent chez la souris mais présent chez le rat, code une phosphoprotéine de 38 KDa (308 acides aminés). Cette dernière contient un domaine conservé de 160 acides aminés dit SET/NAP, initialement identifié dans la séquence protéique d'un oncogène appelé SET (suppressor of variegation, enhancer of zeste, and Trithorax) et également dans la protéine NAP-1 (nucleosome assembly protein-1). Ces protéines constituent une famille dite TSPY/SET/NAP dont les membres sont impliqués dans diverses fonctions telles que la réplication d'ADN, la modulation de la transcription et la régulation du cycle cellulaire (revues dans Lau et al., 2009). Récemment, Lau et son équipe ont constaté l'implication de *TSPY* dans les tumeurs testiculaires. Ce gène est normalement exprimé dans les gonocytes/pré-spermatogonies fœtales, les pré-spermatogonies néonatales et les spermatogonies du testicule adulte. Il contrôle la prolifération des cellules germinales souches et la division méiotique chez le mâle. Il est sur-exprimé dans les gonadoblastomes (tumeur bénigne avec un fort potentiel de transformation maligne), les tumeurs testiculaires germinales (TGCTs) et leurs précurseurs (les cellules de carcinome in situ CIS). Son expression est fortement corrélée aux autres marqueurs exprimés dans les gonadoblastomes, les CIS et les TGCTs tels que PLAP, OCT3/4 et c-KIT. Enfin, cette équipe a démontré que TSPY est capable de se fixer sur les cyclines de type B (B1, B2, et B3) grâce au domaine SET/NAP, et ainsi d'activer le complexe BA-CDK1 *in vitro* permettant une accélération de la transition G2/M du cycle cellulaire (Lau et al., 2009). Dans les gonades dysgénésiques, il exerce donc ses effets oncogéniques en accélérant la prolifération des cellules germinales.

L'étude de McIntyre et son équipe s'est intéressée aux autres gènes dont l'expression est fréquemment dérégulée dans les cancers testiculaires d'origine germinale et a notamment

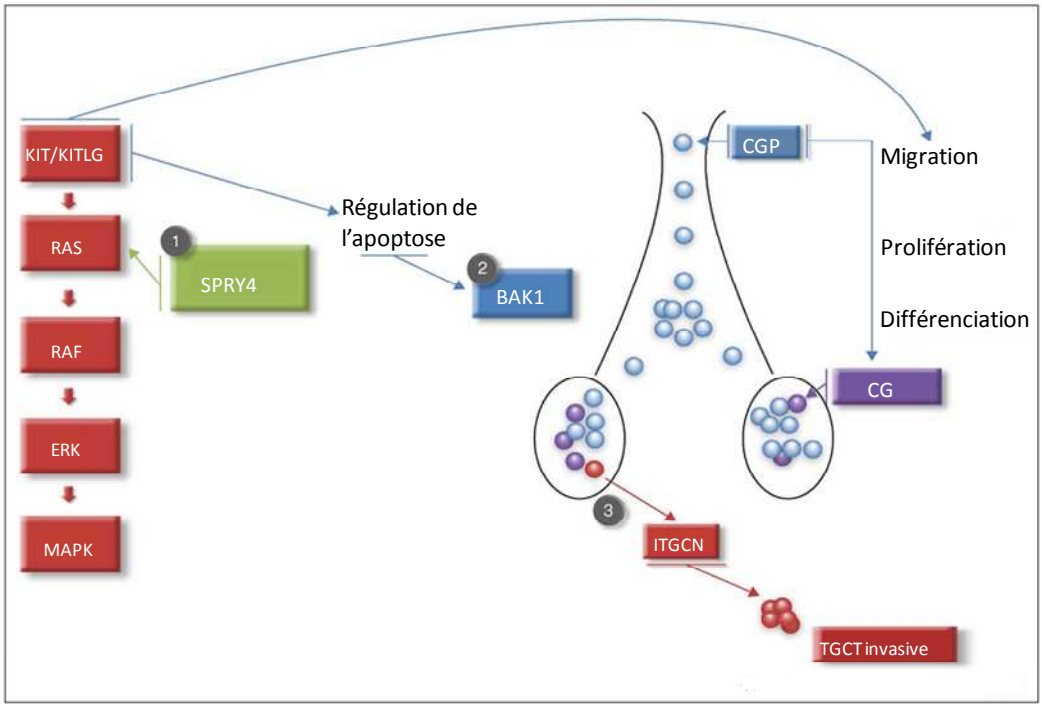


Figure 36 : Base moléculaire et génétique des tumeurs testiculaires. Le système KITLG/KIT est impliqué dans la migration, la prolifération et la différenciation des cellules germinales primordiales (CGPs). 1) KITLG/KIT induit l'expression de SPRY4, ce dernier inhibe à son tour l'activation de la voie MAPK. 2) BAK1 est impliqué dans l'induction de l'apoptose des cellules germinales (CGs), son expression est inhibée par KITLG/KIT. 3) Une perturbation du développement des CGs suite à un arrêt de différenciation des CGPs pourrait induire des tumeurs testiculaires germinales (TGCT). (D'après Rapley et Nathanson, 2010).

révélé des amplifications du gène *c-KIT* dans les TGCTs (McIntyre et al., 2005). Ce gène est localisé sur la région 4q12, il code un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de type III, également appelé CD117. Il est exprimé dans les cellules de Leydig et les spermatogonies. Une augmentation de l'expression de *c-KIT* a été observée dans 21% des tumeurs séminomateuses. Cependant, ces amplifications ne sont pas observées dans les cellules précurseurs de TGCTs (CIS). D'ailleurs, l'augmentation de l'expression de *c-KIT* (surexpression) est indépendante de son nombre de copies (amplification), ce qui suggère l'implication de mécanismes alternatifs dans l'augmentation de l'expression de ce gène (McIntyre et al., 2005). Les mutations somatiques de *c-KIT* ont été également observées dans les tumeurs testiculaires familiales dans les travaux de Rapley et al., mais aucune mutation germinale n'a été révélée dans ces tumeurs (Rapley et al., 2004).

Récemment, une équipe britannique a découvert trois variants génétiques associés aux cancers testiculaires. D'abord, le gène *KITLG* localisé dans la région 12q22, code un facteur de croissance appelé KIT ligand, Stem Cell Factor (SCF) ou steel factor. Cette protéine est exprimée dans les cellules de Sertoli chez l'homme. Il s'agit d'un ligand du récepteur c-KIT (Rapley et al., 2009). En outre, les interactions entre le récepteur c-KIT et son ligand sont indispensables dans la régulation de la survie, la prolifération et la migration des CGPs ; la diminution de l'expression de *KITLG* induit une apoptose de ces cellules (Runyan et al., 2006). De plus, les mutations germinales homozygotes de *Kit* ou *Kitlg* induisent une infertilité chez les souris mâles suite à un échec de développement des CGPs. Le rôle physiologique joué par c-KIT et son ligand les implique dans les tumeurs testiculaires (Rapley et Nathanson, 2010).

Le deuxième variant est le gène *SPRY4* localisé sur le chromosome 5 (5q31.3), c'est un inhibiteur de la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Rapley et Nathanson, 2010). En effet, l'expression de *SPRY4* est induite par le système KITLG-KIT. Cette expression diminue significativement quand la voie KIT est inhibée par le mésylate d'imatinib (Gleevec, Novartis) (traitement de certains types de cancer comme les tumeurs du stroma gastro-intestinal et les leucémies myeloides chroniques), ce qui montre une interaction fonctionnelle entre les deux protéines (Frolov et al., 2003). Enfin, un locus sur le chromosome 6 (6p21.3-p21.2) implique le gène *BAK1* (BCL2-antagonist/Killer 1) dans les tumeurs testiculaires. Ce gène est impliqué dans l'apoptose des CGPs. Son expression est réprimée par KITLG dans les cellules germinales testiculaires (figure 36) (Rapley et al., 2009; Rapley et Nathanson, 2010).

3.2.2. Hypothèse d'une origine fœtale (ontogénèse perturbée)

3.2.2.1. Données histologiques

L'origine cellulaire des cancers testiculaires reste hypothétique. Plusieurs arguments suggèrent que les TGCTs proviendraient des CGPs ou des gonocytes qui n'auraient pas connu une différenciation normale pendant la vie fœtale, et au contraire auraient subi une transformation néoplasique. Ces cellules pré-invasives appelées carcinome in situ (CIS) ou néoplasie germinale intratubulaire (ITGCN) sont les précurseurs de la majorité des tumeurs germinales invasives (Skakkebaek et al., 1987 ; revue dans Rajpert-De Meyts, 2006). En effet, les cellules de CIS ressemblent énormément aux CGPs et aux gonocytes au niveau de leur morphologie mais également de l'expression de marqueurs tels que PLAP, OCT3/4, c-KIT, AP2γ (Rajpert-De Meyts et al., 2004; Rajpert-De Meyts, 2006; Rajpert-de Meyts et Hoei-Hansen, 2007). De plus, des CIS ont été découverts chez des enfants âgés de quelques mois, ce qui renforce l'hypothèse d'une origine fœtale des cellules cancéreuses (Habert et al., 2006; Kristensen et al., 2008).

3.2.2.2. Données transcriptomiques

Les mécanismes provoquant cette transformation maligne des cellules germinales fœtales sont encore mal connus. L'étude de Sonne et al. montre que les cellules de CIS correspondent à des cellules germinales fœtales survivant dans le testicule postnatal grâce à une perturbation d'origine somatique dans leur microenvironnement (Sonne et al., 2009). L'analyse par puces à ADN et la microdissection laser utilisés dans cette étude confirment que les cellules de CIS sont des gonocytes arrêtés au cours du processus de différenciation mais pas des cellules malignes ou en prolifération active, car aucun gène suppresseur de tumeurs ni oncogène n'a été retrouvé parmi les gènes fortement exprimés dans ces cellules. De plus, le profil d'expression génique de cellules de CIS est très similaire à celui des gonocytes. La différence porte sur cinq transcrits. Deux gènes sont surexprimés dans les cellules de CIS par rapport aux gonocytes : le gène *DEFB119*, qui code un peptide antimicrobien exprimé dans les testicules et qui est régulé par les androgènes et le gène *NMNAT2* (nicotinamide mononucléotide adenylyl-transférase 2), qui code une enzyme impliquée dans le métabolisme du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide). Les trois autres gènes sont réprimés dans les CIS par rapport aux gonocytes. La diminution de l'expression de ces gènes pourrait être impliquée dans la transformation néoplasique des cellules de CIS. Ce sont le gène *PTPRZ1* qui code un récepteur de la famille des protéines tyrosines phosphatases

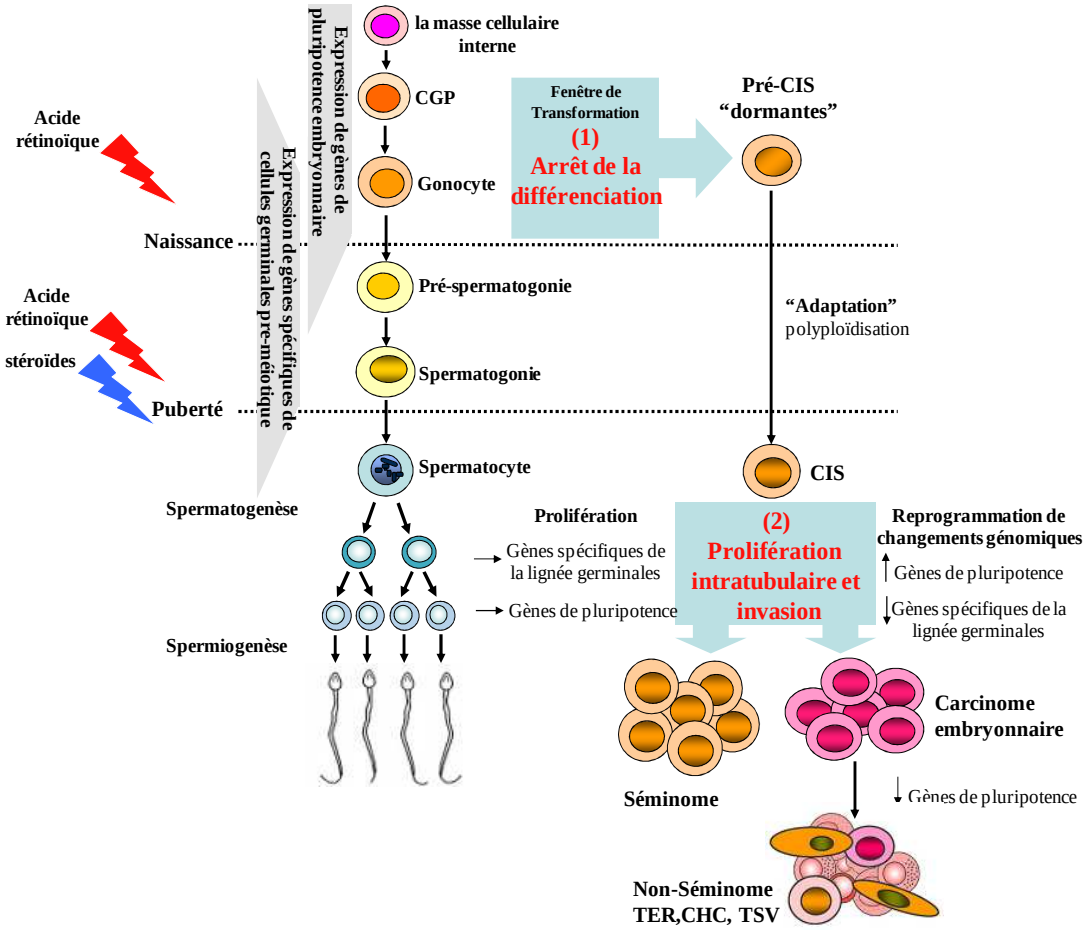


Figure 37 : Origine du carcinome in situ (CIS) testiculaire.
À gauche, le développement normal des cellules germinales mâles. Au cours du développement embryonnaire normal, l'absence d'acide rétinoïque est nécessaire pour leur entrée en quiescence. C'est à la puberté sous l'effet combiné des hormones 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).

impliqué dans plusieurs types de cancers, le gène *ASXL3* qui est l'homologue humain du gène « additional sex combs » de drosophile, et le troisième gène *AF318333* n'a pas de fonction connue (Sonne et al., 2009). Cette étude confirme la ressemblance entre les cellules de CIS et les gonocytes observée dans les études précédentes (citées au début du paragraphe). Certaines cellules de CIS sont polyploïdes. Ce caractère laisse penser que les CIS sont originaires soit de cellules spermatocytaires dupliquant leur génome avant l'entrée en méiose, soit de gonocytes non suffisamment virilisés et qui mimeraient l'entrée en méiose pendant la vie fœtale des ovogonies. Cependant, les auteurs n'ont pas observé de gènes spécifiques de la méiose parmi les gènes exprimés dans les CIS, ce qui suggère que ces cellules ne dérivent pas des cellules méiotiques mais probablement des gonocytes (Sonne et al., 2009).

Ces cellules de CIS restent en dormance après la naissance jusqu'à la puberté. A la puberté, ces cellules pluripotentes de CIS forment des tumeurs. Elles prolifèrent dans les tubules séminifères sous l'effet des hormones stéroïdes en remplaçant la majorité des cellules spermatogoniales normales pour se développer soit en séminomes en 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 les tératomes (tissu embryonnaire), les tumeurs du sac vitellin et les choriocarcinomes (tissu extra-embryonnaire) (figure 37) (Kristensen et al., 2008).

3.2.2.3. Données Epigénétiques

Récemment, Almstrup et al. ont analysé les modifications épigénétiques des cellules de CIS. Ils ont constaté que les modifications activant la chromatine sont très présentes (H3K4me, H3K9ac, et H2A. Z) par rapport à celles réprimant la chromatine (H3K9me2 et H3K27me3). De même, l'ARN polymérase II est exprimée fortement dans ces cellules, suggérant une activité transcriptionelle élevée. Ces observations indiquent que les cellules de CIS ont une structure génomique ouverte qui pourrait aboutir à une instabilité chromosomique et à un phénotype malin. Les auteurs suggèrent que la capacité proliférative élevée de ces cellules résulte de la structure ouverte de la chromatine et que cette capacité proliférative dans le testicule post-pubère est due en partie à la stimulation par les gonadotropines et les androgènes (Almstrup et al., 2010). Cette étude a également comparé le profil épigénétique des cellules de CIS avec celui des gonocytes. Les modifications de chromatine sont similaires chez les deux types cellulaires avec une exception concernant la méthylation et la diméthylation/triméthylation de la lysine 4 sur l'histone H3 (H3K4me1, H3K4me2/3) qui sont

Modification	Fonction	CIS	Gonocytes
5-methyl-cytosine	Répression de chromatine	- Sertoli: ++	- Sertoli: ++
H3K9me2	Répression de chromatine	- Sertoli: +++	- Sertoli: ++
H3K27me3	Répression de chromatine	-/+ Sertoli: +++	-/+ Sertoli: ++
H3K4me1	Activation de chromatine	+++ Sertoli: +	-/+ (cytoplasme) Sertoli: -
H3K4me2/3	Activation de chromatine	++/+++ Sertoli: +	-/++ Sertoli: -/+
H3K9ac	Activation de chromatine	+++ Sertoli: -/+	+++ Sertoli: -/+
H2A.Z	Activation de chromatine	+++ Sertoli: -/+	+++ Sertoli: -/++

Tableau 6 : Modifications épigénétiques de cellules germinales testiculaires normales (gonocytes) et néoplasiques (CIS). -, négative ; +, légère coloration ; ++, coloration évidente ; +++, forte coloration. (D'après Almstrup et al., 2010).

très présentes dans les cellules de CIS contrairement aux gonocytes (Almstrup et al., 2010). La similarité de structure épigénétique des cellules de CIS et des gonocytes rajoute un argument pour renforcer l'hypothèse d'une origine fœtale des TGCTs.

Par ailleurs, Lambrot et Kimmins ont montré dans les tissus testiculaires sains que la distribution de la méthylation de l'histone H3 était dépendante du stade de développement des CGs, alors que dans les tumeurs testiculaires non-séminomateuses la méthylation de l'histone H3 (H3K4 et H3K9) était détectée dans tous les types des tumeurs non-séminomateuses (carcinome embryonnaire, tératome et tumeur du sac vitellin). Les auteurs suggerent que la méthylation de l'histone H3 semble associée à une expression génique anormale dans les tumeurs non-séminomateuses (Lambrot et Kimmins, 2011).

Le tableau 6 indique les modifications épigénétiques des cellules germinales testiculaires normales et néoplasiques.

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

La compréhension des mécanismes de la différenciation des cellules germinales chez les vertébrés est importante non seulement d'un point de vue fondamental mais aussi pour appliquer les connaissances à la santé humaine pour le diagnostic de pathologies de l'appareil génital ou pour leurs thérapies.

Dans la première partie de la thèse, nous avons étudié les mécanismes régulant la différenciation des cellules germinales et leur entrée en méiose chez un amphibien urodèle « *Pleurodeles waltl* ». Les travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire sur cet amphibien consistaient en la détermination des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle et en l'étude des effets de stéroïdes sexuels et de perturbateurs endocriniens sur cette différenciation. Ces travaux ont montré que les hormones stéroïdes sexuelles jouent un rôle primordial dans la différenciation sexuelle du pleurodèle. Elles sont également capables d'induire des inversions sexuelles fonctionnelles. Au moment où cette thèse a débuté, il avait été montré que l'acide rétinoïque était impliqué dans l'induction de l'entrée en méiose des cellules germinales chez la souris. Notre but était de savoir si l'acide rétinoïque était aussi capable d'induire l'entrée en méiose chez le pleurodèle et de comprendre les interactions stéroïdes/rétinoïdes et leurs implications dans la différenciation des cellules germinales.

Des altérations de la reproduction masculine ainsi que des cas de cancers testiculaires ont été observés au cours de ces dernières décennies avec une incidence croissante. Ces pathologies diagnostiquées chez l'adulte pourraient résulter d'une exposition anormale aux stéroïdes ou à des perturbateurs endocriniens pendant la vie fœtale et/ou néonatale. Cette exposition aux perturbateurs endocriniens pourrait notamment jouer un rôle dans le développement et la progression des cancers testiculaires d'origine germinale. Ainsi, dans la seconde partie de la thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet des stéroïdes sur la prolifération de la lignée TCam2, seule lignée pure issue de tumeur séminomateuse disponible à ce jour.

RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE I

DIFFERENCIATION NORMALE DES CELLULES GERMINALES : ENTREE EN MEIOSE

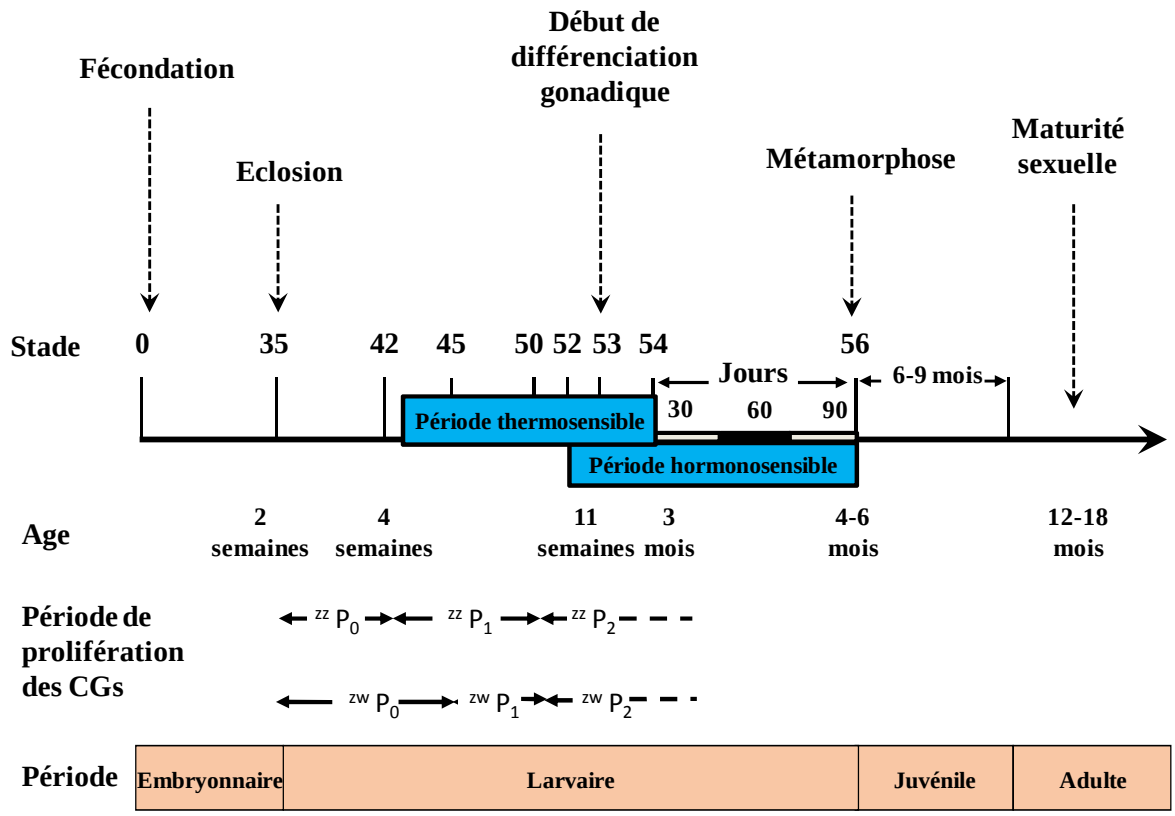


Figure 38 : Table de développement de *Pleurodeles waltl*. P0, P1, P2 représentent les périodes de prolifération des cellules germinales (CGs) chez les individus mâles (ZZ) et femelles (ZW) (D'après Dournon et al., 1990).

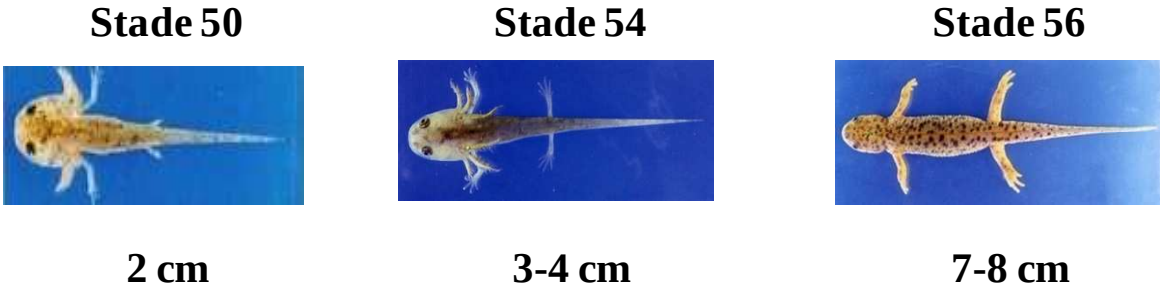


Figure 39 : Pleurodèles à différents stades du développement. Des larves aux stades 50 (membres postérieurs au début de leur formation) et 54 (membres postérieurs entièrement formés) ainsi qu'un individu au stade 56 (les branchies externes à l'arrière de la tête ont disparu) sont montrés et leur taille réelle est indiquée (D'après Shi et Boucaut, 1995).

DIFFERENCIATION NORMALE DES CELLULES GERMINALES : ENTREE EN MEIOSE

1. Le modèle *Pleurodeles waltl*

Le pleurodèle est un amphibien urodèle de la famille des Salamandridés. Il vit en Afrique du nord, au sud du Portugal et de l'Espagne. Les larves et les adultes mènent une vie essentiellement aquatique. Son utilisation comme modèle expérimental en biologie du développement remonte aux années 1950.

Dans le laboratoire de Nancy, les animaux sont élevés dans l'eau du robinet à 20±2°C. (Les conditions d'élevage et de reproduction de *Pleurodeles waltl* en laboratoire ont été précisées par Gallien, 1952). La période de reproduction s'étend de Septembre à Avril. Les accouplements sont effectués dans des aquariums dont le fond est couvert de cailloux en plaçant un mâle et une femelle. Les cailloux servent de support pour les spermatophores déposés par le mâle puis pour les œufs déposés par la femelle.

1.1. Développement morphologique et différenciation histologique des gonades

Les différents stades du développement ont été définis par des critères morphologiques et sont répertoriés dans une table de développement (Gallien et Durocher, 1957). Le développement embryonnaire dure environ deux semaines, jusqu'à l'éclosion au stade 35. Les stades de la période 42 à 54 sont déterminés par le nombre de doigts présents au niveau des membres antérieurs et postérieurs. Les larves sont assez petites : leur taille est d'environ 1,5 cm pour le stade 42. Au laboratoire, comme le stade 55 pendant lequel s'effectue la métamorphose dure 3 mois, nous le divisons en sous-stades 54+30 jours, +60 jours et +90 jours. Le développement larvaire s'achève au stade 56, la fin de la métamorphose étant marquée par la première mue de l'animal. La taille atteint 7 cm pour le stade 56. Le stade juvénile est assez long (8 mois au minimum) et la maturité sexuelle est atteinte entre 12 et 18 mois. Une table simplifiée du développement est montrée dans la figure 38 et quelques stades sont illustrés dans la figure 39.

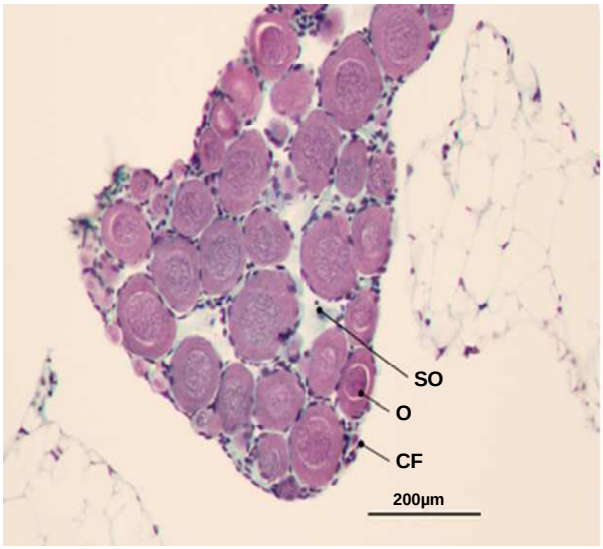


Figure 40 : Coupe histologique de l'ovaire juvénile de *Pleurodeles waltl*. Coloration hématoxyline/éosine. O – ovocyte ; CF – cellules folliculaires ; SO – sac ovarien.

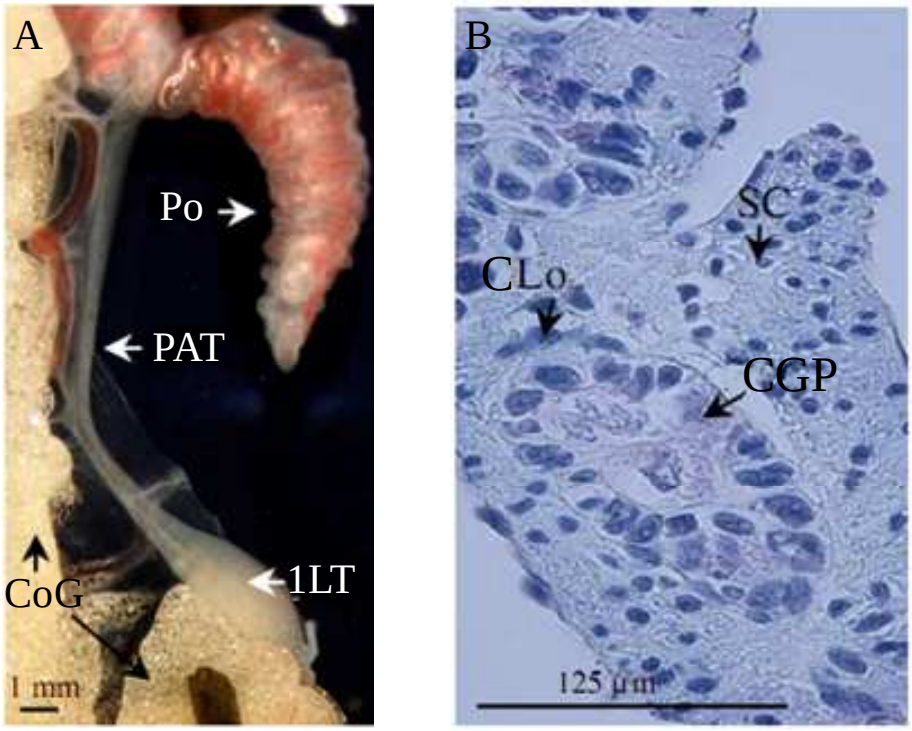


Figure 41 : Association entre le poumon et le testicule chez *Pleurodeles waltl*. A) Le testicule d'un individu âgé de 9,5 mois est constitué de deux parties : la partie antérieure du testicule (PAT) attachée au poumon (Po) et la partie postérieure qui présente le premier lobe testiculaire (1LT). Le Corps gras (CoG) associé au testicule est bien développé. B) Coupe histologique dans la partie antérieure du testicule attachée au poumon qui montre des lobules constitués de cellules lobulaires (CLo) qui renferment des cellules germinales primordiales (CGP). Ces cellules sont reconnaissables à leur grande taille et à leur grand noyau polylobé. À l'extérieur du lobule, le cortex renferme des cellules somatiques (SC) qui possèdent des noyaux très petits. (D'après Flament et al., 2009).

En ce qui concerne la formation des gonades, les crêtes génitales se forment au stade 35 sur la face ventrale du mésonéphros. Il est à noter que chez les amphibiens, le mésonéphros est le rein définitif (pas de métanéphros comme chez les amniotes). Aux stades 44 et 45, les éléments somatiques médullaires se mettent en place et les gonades sexuellement indifférenciées se constituent, ces dernières restent indifférenciées jusqu'au stade 52. La gonade indifférenciée comporte un cortex où se positionnent les cellules germinales reconnaissables à leur grande taille et à leur noyau polylobé, et une médulla qui est initialement dépourvue de cellules germinales.

La prolifération des CGPs s'effectue selon trois phases successives. D'abord, les CGPs colonisant les crêtes génitales entrent dans une période dite P0 pendant laquelle elles ne prolifèrent pas pendant deux semaines (figure 38). Dans la deuxième période dite P1, les CGPs reprennent leur prolifération. Cette période débute au stade 42 et 45 chez les larves ZZ et ZW respectivement. Ainsi, à la fin de la période P1, qui s'étend jusqu'au stade 50, le nombre des CGs est plus élevé chez les individus ZZ que chez les ZW. La prolifération de ces cellules s'accélère pendant la phase P2 chez les larves ZZ et ZW. Cependant cette prolifération est moins élevée chez les larves ZZ. Ainsi au stade 53 (début de la différenciation gonadique), le nombre des CGs est moins élevé chez les individus mâles (489 ± 56) que chez les femelles (634 ± 95) (Dournon et al., 1990).

Par analyse histologique, le premier signe de la différenciation des gonades est détecté au stade 53. Durant la différenciation ovarienne les cellules germinales se maintiennent dans le cortex de la gonade et l'on aboutit à la formation d'un ovaire creux résultant de la dégénérescence médullaire (figure 40). Un certain nombre de cellules germinales entrent en méiose à la fin de la vie larvaire et deviennent des ovocytes I arrêtés au stade diplotène de la prophase I. Ces derniers ont un noyau circulaire avec de la chromatine condensée. Ils sont entourés d'une seule couche de cellules folliculaires.

Au contraire, pendant la différenciation testiculaire, les cellules germinales quittent le cortex pour coloniser la médulla tandis que le cortex se réduit et participe à l'élaboration de l'albuginée. Il est à noter que la différenciation de la gonade mâle est régionalisée : un premier lobe se différencie en position caudale tandis que la partie antérieure emballée par un tissu conjonctif qui entoure aussi le poumon reste indifférenciée (figure 41) (Flament et al., 2009). Le lobe différencié contient différents lobules au sein desquels les cellules germinales s'associent à des cellules de Sertoli pour constituer des cystes (figure 42). Dans chaque cyste

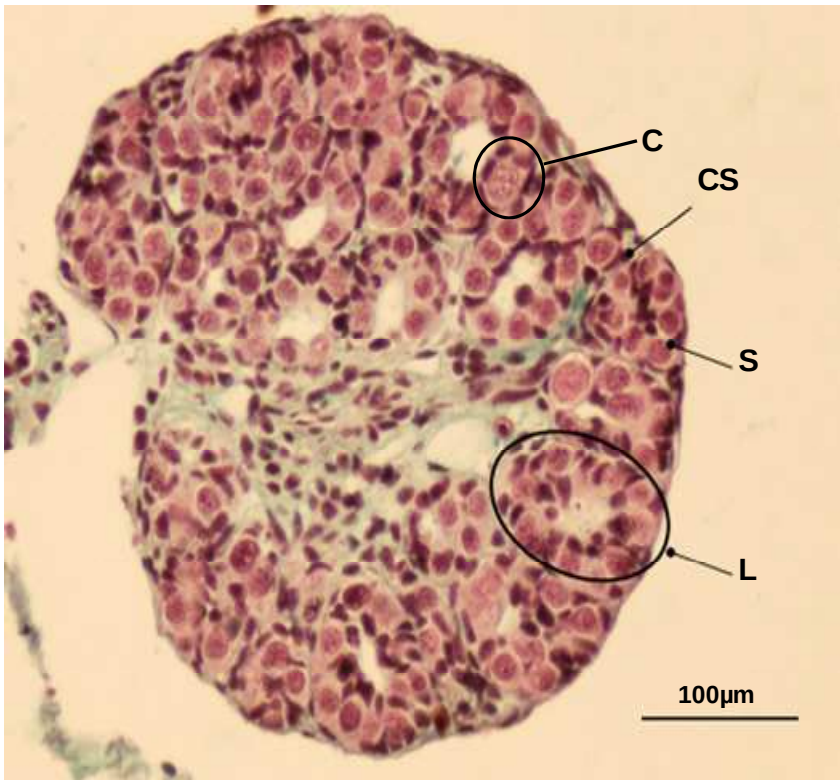


Figure 42 : Coupe histologique du testicule juvénile de *Pleurodeles waltl*. Coloration hématoxyline/éosine. La coupe est réalisée dans le premier lobe différencié dans la région caudale du testicule. L – lobule (un lobule renferme plusieurs cystes) ; C – cyste (un cyste contient des cellules germinales qui évolueront de façon synchrone au cours de la méiose) ; S – spermatocyte; CS – cellule somatique.

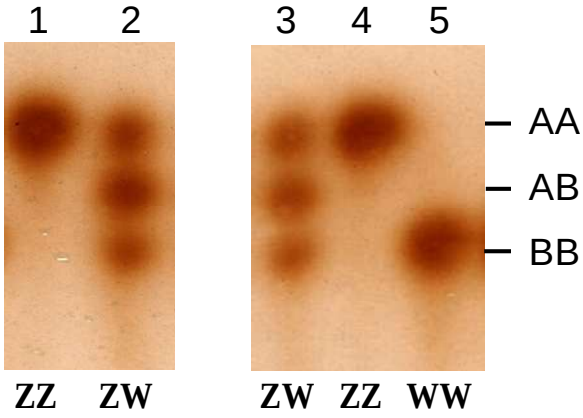


Figure 43 : Profil électrophorétique sur gel d'amidon de l'enzyme peptidase-1, enzyme liée au sexe. La présence de dimères AA est caractéristique d'un génotype mâle Z^AZ^A (piste1). La présence de dimères AA, AB et BB est typique d'un génotype femelle Z^AW^B (piste 2). L'enzyme est également un excellent marqueur du génotype sexuel pour les animaux inversés sexuellement. Ainsi, piste 3, on peut observer un néomâle ZW obtenu par augmentation de la température d'élevage. La piste 4 correspond à une néofemelle ZZ obtenue après un traitement au benzoate d'œstradiol. Enfin, la piste 5 correspond à une femelle thélygène W^BW^B obtenue par croisement entre une femelle standard ZW et un néomâle ZW.

la méiose s'effectuera de façon synchrone mais celle-ci ne débutera qu'après la métamorphose. Le testicule du pleurodèle comme celui des urodèles est qualifié de testicule multiple car plusieurs lobes se formeront successivement chez l'adulte, à l'arrière du lobe précédent (Flament et al., 2009).

1.2. Le déterminisme du sexe

Le pleurodèle se caractérise par un déterminisme génétique du sexe de type ZZ/ZW, où les femelles sont hétérogamétique (ZW). L'homogamétie mâle (ZZ) a été démontrée à partir des expériences d'inversion sexuelle obtenue sous l'effet de l'œstradiol (Gallien, 1951, 1954). Le croisement des mâles standard (ZZ) avec les femelles issues des mâles inversés par l'œstradiol (ZZ^{E2}) produit une descendance unisexuée mâle (ZZ). L'hétérogamétie femelle (ZW) a été confirmée après l'analyse de descendances d'individus ayant subi des greffes embryonnaires de mésoderme intermédiaire prélevé au stade 24. Une gonade primordiale de femelle (ZW) greffée chez un individu mâle (ZZ) se développe en un testicule fonctionnel. Ainsi, l'animal receveur du greffon contient une gonade mâle (ZW) et son croisement avec une femelle standard (ZW) présente, parmi leurs descendants, des femelles dites thélygènes WW. Le croisement de ces dernières avec des mâles standard (ZZ) donnent une descendance unisexuée femelle ZW (Collenot, 1973).

Depuis les années 1980, le génotype sexuel chez le pleurodèle est déterminé par l'analyse du profil électrophorétique de la peptidase-1. Il s'agit d'une enzyme dimérique codée par deux gènes co-dominants localisés sur les chromosomes sexuels Z et W. Le gène codant la peptidase A est localisé sur le chromosome Z et le gène codant la peptidase B ou β est lié au chromosome W (Ferrier et al., 1983). Ce gène s'exprime dans tous les tissus et le sexage des larves peut être réalisé aisément à partir d'une biopsie caudale (figure 43).

1.3. Modification de la différenciation sexuelle

Le sexe chez le pleurodèle est déterminé génétiquement par la présence des chromosomes sexuels, mais la différenciation du sexe peut être modifiée par des facteurs environnementaux comme la température d'élevage ou par la présence d'hormones stéroïdes sexuelles dans l'eau d'élevage.

1.3.1. Influence de la température

Chez le pleurodèle, l'élevage des larves à la température ambiante (de 18° à 22°C) conduit en règle générale au sexe ratio égal à 1. Cependant l'élevage de ces larves à la température de 30 à 32°C entraîne une modification du sexe ratio en faveur du sexe mâle (Dournon et Houillon, 1984). Ces températures élevées provoquent une réduction de la longueur totale des larves et une accélération du développement larvaire (Dournon et Houillon, 1985). A 30°C un traitement commencé au stade 43 doit être poursuivi jusqu'à la métamorphose (stade 56) pour être efficace (70% d'inversion sexuelle) alors qu'à 31 ou 32°C, le traitement est totalement efficace lorsqu'il est appliqué du stade 43 au stade 54. Cependant un traitement à 32°C est sans effet s'il est interrompu au stade 50, même lorsqu'il est commencé tôt (stade 40). Les conditions optimales permettant d'obtenir une inversion de la totalité des femelles génétiques ZW ont été définies : celle-ci est obtenue lors d'un élevage à 32°C du stade 42 au stade 54. Cette période dite thermosensible dure 2 mois (figure 38) (Dournon et Houillon, 1985). Les néomâles ZW ainsi obtenus sont fertiles et leur croisement avec des femelles standard ZW permet d'obtenir des femelles WW (25%).

1.3.2. Influence des hormones stéroïdes sexuelles

Les hormones stéroïdes sexuelles peuvent modifier la différenciation sexuelle chez le pleurodèle. Elles ont une action plus tardive par rapport à la température : la période hormonosensible s'étend du stade 52 au stade 56 (figure 38). L'utilisation de stéroïdes chez le pleurodèle a montré que la production d'œstradiol est importante pour la différenciation femelle. En effet, le traitement de larves au benzoate d'œstradiol conduit à une féminisation des individus génétiquement mâles ZZ (Gallien, 1951, 1954).

L'aromatase, enzyme codée par le gène *Cyp19* qui convertit les androgènes en œstrogènes, est également impliquée dans la différenciation ovarienne chez le pleurodèle. L'activité de cette enzyme a été mesurée au cours du développement du pleurodèle par Chardard et al. A température ambiante, chez les larves ZW, l'activité aromatase devient élevée avant la différenciation des gonades femelles, tandis que chez les larves ZZ, l'activité de cette enzyme reste très faible dans les gonades mâles avant et après le début de leur différenciation sexuelle (Chardard et al., 1995). La corrélation entre un haut niveau d'activité aromatase et la différenciation ovarienne a été démontrée par différents traitements : l'activité augmente lors de la féminisation de larves ZZ par l'œstradiol tandis qu'elle diminue lors de la

masculinisation de larves ZW par l'application d'un inhibiteur d'aromatase, le fadrozole (Chardard et Dournon, 1999).

Un effet paradoxal a été décrit avec le traitement par la testostérone : les larves génétiquement mâles (ZZ) sont féminisées et cela n'affecte pas les individus ZW. Ce résultat est dû à l'aromatisation de la testostérone et confirme le rôle clef de l'aromatase. Par contre, l'utilisation d'un androgène non-aromatisable comme la DHT induit la masculinisation des larves génétiquement femelles (ZW) mais n'inverse pas les mâles (ZZ) (Chardard et al., 2003; Kuntz et al., 2003).

Chez certains urodèles, il est possible de réaliser des parabioses qui consistent en des associations de deux embryons au stade bourgeon caudal (stade 22). Les associations peuvent être de même sexe génétique ZZ/ZZ, ZW/ZW ou de sexe génétique différent ZZ/ZW. Ces embryons peuvent se développer jusqu'à l'âge adulte comme des siamois avec une circulation sanguine croisée. Dans un système de parabiose embryonnaire associant les deux sexes génétiques (ZZ et ZW) chez le pleurodèle, les gonades ZZ se différencient en testicules normaux ; alors que le développement de gonades ZW semble être altéré (Dumond et al., 2008a). La différenciation des CGs dans ces gonades est également altérée. En effet, ces gonades possèdent moins de CGs, qui ne rentrent pas en méiose par la suite. L'expression de de l'aromatase et son activité sont aussi réduites dans ces gonades ZW. A l'âge adulte, ces gonades sont dépourvues des CGs, leur compartiment somatique ne semble pas masculinisé, puisque le marqueur testiculaire, DMRT1, est absent. La différenciation ovarienne du pleurodèle est donc inhibée par la présence d'un environnement hormonal mâle (Dumond et al., 2008b).

1.4. Origine des CGPs chez le pleurodèle

Des études menées par plusieurs équipes de recherche, ont révélé l'origine mésodermique des CGPs chez les urodèles y compris le pleurodèle (revue dans (Dumond et al., 2008b). Par exemple, des cultures de parties ventrales ou ventro-latérales d'embryons au stade blastula dans le blastocoele de jeunes gastrulas ont démontré que les précurseurs des CGPs sont localisés dans le mésoderme présomptif (Maufroid et Capuron, 1973). Lorsque l'ectoderme et l'endoderme de jeunes gastrulas sont associés et cultivés in vitro, l'endoderme dorsal induit principalement de la chorde, des somites et des tubules pronéphrétiques alors que l'endoderme ventral induit la différenciation de tubules pronéphrétiques, de mésenchyme

et des CGPs (Maufroid et Capuron, 1977a,b). En effet, les CGPs sont spécifiées à partir des cellules de la région latérale du mésoderme sous l'influence de signaux produits par l'endoderme durant la gastrulation (revue dans McLaren, 2003 ; Extavour et Akam, 2003). Ces signaux stimulent, en plus, la formation d'autres types de cellules somatiques mésodermiques comme le mésonéphros et les cellules sanguines, d'où leur nom : « Mesoderm Inducing Factors » (Johnson et al., 2003).

Chez le pleurodèle, la ségrégation des CGPs se fait donc selon le mode épigénétique par interactions cellulaires au cours du développement embryonnaire. L'association d'ectoderme avec de l'endoderme ventral d'embryons de différents stades a permis de déterminer la période durant laquelle s'effectue la ségrégation de la lignée germinale (Maufroid et Capuron, 1977b). Elle débute au stade 8a (gastrulation) et elle est définitive au stade 13 (neurulation) (revue dans Dumond et al,. 2008a).

Après l'éclosion (stade 35), la prolifération des CGPs s'effectue selon trois phases successives (Dournon et al., 1990) (voir page 65).

2. Justification de l'étude et Objectifs

Les modes de spécification des cellules germinales sont similaires chez les amphibiens urodèles et les mammifères. En effet, chez ces deux espèces les cellules germinales primordiales sont spécifiées suite à une induction par des signaux émis par les cellules somatiques voisines. Chez les mammifères, les CGs entrent en méiose au cours de la vie fœtale chez la femelle tandis que chez le mâle, l'entrée en méiose des CGs n'a lieu qu'à la puberté. Comme cela a été décrit dans l'introduction bibliographique (voir chapitre I). deux études menées chez la souris ont montré que l'entrée en méiose des CGs dépend de la présence d'AcR qui est synthétisé par l'enzyme RALDH2 dans le mésonéphros chez les embryons mâles et femelles (Koubova et al., 2006 ; Bowles et al., 2006). Chez la femelle, les CGs entrent en méiose à 13,5 jpc, alors que la méiose est retardée dans le testicule fœtal par l'action de l'enzyme CYP26B1 qui dégrade l'AcR (Bowles et Koopman, 2007). Les auteurs de ces publications concluent que CYP26B1 est le facteur inhibiteur de la méiose.

Chez le pleurodèle la cinétique d'entrée en méiose des CGs chez les mâles et les femelles n'a jamais été étudiée par une approche moléculaire. Nous avons donc déterminé le stade du développement auquel les CGs entrent en méiose chez le mâle et la femelle en analysant l'expression de l'orthologue d'un gène marqueur de la méiose (*Dmc1*) cloné chez le

Anti-CYP26B1 direct	5'-AAAGGATCCGTGTTTAAGACGCATTTGTTGGGCC-3'
Anti-CYP26B1 reverse	5'-CACAAGCTTTCACTGGATCTTGGGCAGGTAACTCTC-3'
Anti-RALDH2 direct	5'-AAAGGATCCATCCCATGGAACTTCCCACTGC-3'
Anti-RALDH2 reverse	5'-CACAAGCTTTCATCTTCCAGCTGCTTCTTGGATCATCTTTCC-3'

Gene	Longueur de fragment	Plasmide recombinant	Taille de protéine recombinante
Cyp26b1	240 pb	pTST101-CYP26B1	53kDa
Raldh2	282 pb	pTST101- RALDH2	54kDa

Tableau 7 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la construction des plasmides pTST101-CYP26B1 et pTST101- RALDH2.

pleurodèle (*PwDmc1*). Les facteurs déclencheurs et régulateurs de l'entrée en méiose étant encore méconnus, nous avons ensuite étudié l'effet de l'acide rétinoïque sur l'entrée en méiose des CGs en mettant notamment au point un système de culture organotypique. Nous avons aussi cloné les ADNc des gènes codant RALDH2 et CYP26b1 chez le pleurodèle. Enfin, nous avons analysé la possibilité d'une influence des stéroïdes sexuels sur le métabolisme de l'acide rétinoïque et l'entrée en méiose. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans une revue internationale à comité de lecture.

3. Publication

Evidence for a Conserved Role of Retinoic Acid in Urodele Amphibian Meiosis Onset. Wallacides, A., Chesnel, A., Chardard, D., Flament, S., et Dumond, H. *Developmental Dynamics*. (2009). 238, 1389 -1398.

3.1. Matériels et méthodes

Les matériels et méthodes sont décrits dans la publication mais j'ai tenu à préciser quelques points qui n'y avaient pas été détaillés.

Pour réaliser l'étude de l'entrée en méiose des CGs chez le pleurodèle, les orthologues des gènes *Raldh2* et *Cyp26b1* de souris ont été clonés au laboratoire -*PwRaldh2* (MN_EU213037), *PwCyp26b1* (MN_EU213038). J'ai ensuite été amenée à produire des protéines recombinantes de PwRALDH2 et PwCYP26B1 en vue d'obtenir des anticorps dirigés contre les enzymes de pleurodèle. Cela permet d'étudier l'expression de ces enzymes au niveau protéique par western blot et immunohistochimie.

Les peptides d'environ 9 et 8 kDa, correspondant respectivement à différentes zones spécifiques de PwRALDH2 et PwCYP26B1, sont injectés à des lapins « New Zealand » afin de produire les anticorps polyclonaux.

Voici une description du protocole que nous avons utilisé :

3.1.1. Production d'une protéine recombinante

Les ADNc issus de testicule de pleurodèle adulte sont amplifiés par PCR à l'aide des amorces portant les sites de restriction BamH1 en 3' et HindIII en 5' (tableau 7). L'amplification est réalisée dans 25 µL de volume final d'une solution comprenant 0,5 U *Taq*

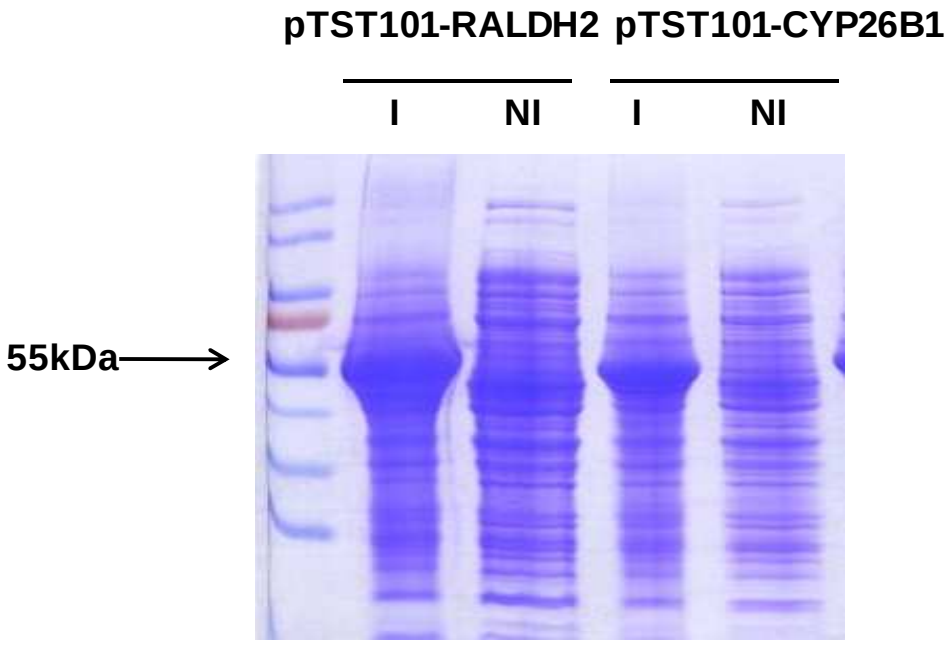


Figure 44: Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Les pistes I (pour induit) montrent le plasmide pTSTA101-RALDH2 ou pTST101-CYP26B1 dont l'expression est induite par le rhamnose. Les pistes NI (pour non induit) indiquent les plasmides codant ces peptides d'intérêt dont l'expression est non induite.

ADN polymérase (Invitrogen), 25 mM de chaque désoxyribonuclétotide triphosphate, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 pmol de chaque amorce. Après 35 cycles d'amplification, les produits de PCR obtenus, longs de 282 pb pour *PwRaldh2* et 240 pb pour *PwCyp26b1*, ont été extraits d'un gel d'agarose et élués grâce au kit QIAEX II Agarose Gel Extraction (Qiagen).

Ces fragments sont dans un premier temps clonés dans le plasmide pGEM-T easy (Promega). Les inserts sont ensuite excisés par une double digestion BamH1 et HindIII (Fermentas), puis clonés dans le plasmide pTST101 (6464 pb) (Oelschlaeger et al., 2003) préalablement linéarisé avec les mêmes enzymes. Ce plasmide permet la production d'une protéine de fusion comprenant le peptide d'intérêt fusionné à la « Maltose Binding Protein » (MBP). Une fois la séquence des clones vérifiée, les plasmides pTST101-peptides sont transférés dans la souche *E.coli* DH5α (Oelschlaeger et al., 2003) afin de réaliser la production des peptides.

L'expression des peptides est induite en culture liquide par l'ajout 0,2% de rhamnose (Fluka) comme inducteur du promoteur P*rhaP* en phase exponentielle de croissance. Trois cultures témoins sont aussi effectuées en même temps : le plasmide pTST101 original non-induit et/ou induit, et les plasmides pTST101-peptides non-induits par le rhamnose. L'efficacité de l'induction est vérifiée sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (figure 44). Dans la culture témoin pTST101 induite, une protéine de fusion MalE (Maltose Binding Protein : MBP)-eGFP de 70 kDa est produite ; alors que les peptides fusionnés avec la protéine MalE donnent des protéines de 54 et 53 kDa environ pour PwRALDH2 et PwCYP26B1, respectivement.

3.1.2. Purification de la protéine recherchée

Les bactéries sont séparées du milieu de culture par centrifugation (4000 rpm, 5 min, 4°C) et les protéines sont extraites par un tampon (*Tris HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM*) après lyse de la membrane bactérienne par sonication. Les protéines solubles sont prélevées après centrifugation (13000 rpm, 15 min, 4°C). L'extraction fractionnée des protéines bactériennes est réalisée pour récupérer la fraction précipitée avec 40% de sulfate d'ammonium, où sont présentes les protéines de fusion.

La purification des protéines de fusion est réalisée par chromatographie sur colonne d'amylose suivant le protocole décrit par le fournisseur (BioLabs E8021S). Pour cela, les protéines sont reprises dans du tampon (*Tris HCl 20 mM pH 7,4 ; NaCl 0,2 M ; EDTA 1 mM*),

puis 1mg est mis en contact avec 500 µL de résine d'amylose à 4°C pendant 2 heures. Les résines couplées sont ensuite chargées dans une colonne, celle-ci est lavée avec 8 volumes de tampon Tris pour éliminer toute trace d'impureté. Enfin, les protéines de fusion sont éluées avec le tampon Tris contenant 10 mM de maltose. Toutes ces opérations sont effectuées à 4°C. Après dosage (Bio-Rad Laboratory) et vérification sur gel d'acrylamide, les protéines sont utilisées pour immuniser des lapins.

3.1.3. Immunisation des lapins

Les immunisations ont été réalisées chez des lapins « New Zealand » par injection sous-cutanée de 0,5 mg de protéine. Trois injections sont pratiquées, à trois semaines d'intervalle, en présence d'adjuvant de Freund complet (1ère injection) ou incomplet (2ème et 3ème injection). La présence d'anticorps est recherchée dans un premier prélèvement sanguin pratiqué 11 jours après la dernière injection. Le stock d'anticorps est réalisé par un second prélèvement effectué 11 jours après une injection de rappel.

3.1.4. Purification des anticorps

Deux protocoles de purification des anticorps ont été testés. Le premier consiste à précipiter toutes les protéines excepté les immunoglobulines G. Cette précipitation est réalisée en présence d'acide caprylique (0,75 mL/10 mL anticorps) et de 2 volumes d'acétate de sodium 60 mM à pH 4,8 à température ambiante pendant 30 min sous agitation. Après centrifugation (6000 rpm, 10 min), le surnageant est dialysé contre du PBS (Phosphate Buffer Saline). A l'issue de cette première étape de purification, la pureté n'était pas satisfaisante.

Un deuxième protocole basé sur la formation d'un complexe protéine-anticorps a été adopté. Ainsi, les protéines recombinantes (5-10 mg), préalablement purifiées sur résine d'amylose selon le protocole décrit ci-dessus, sont dialysées contre une solution de $NaHCO_3$ 50 mM et adsorbées sur des billes de CNBr sépharose (Healthcare) par incubation à 4°C pendant une nuit. Les billes sont ensuite lavées une première fois avec du Tris HCl 1 M à pH 8 pendant 1 heure à flux continu (pour bloquer les sites libres des billes de CNBr sépharose) ; le deuxième lavage est réalisé avec du $NaHCO_3$ 50 mM (30 min) et le troisième avec un tampon TE (*Tris HCl 30 mM pH 8 ; EDTA 1 mM*). Le sérum contenant les anticorps est passé en flux continu sur la colonne de billes contenant les protéines recombinantes pendant une nuit à 4°C. Un dernier lavage de la colonne est fait avec 20 mL de TE puis avec 20 mL de TE NaCl 500 mM. Enfin, les anticorps sont élués avec 10 mL d'acide acétique

50 mM et neutralisés directement dans des tubes contenant 200 µL de Tris HCl 1 M pH 8. La quantité de protéines obtenue est évaluée par mesure de l'absorbance à 280 nm.

3.2. Principaux résultats

L'entrée en méiose des CGs chez *Pleurodeles waltl* a été déterminée en mesurant l'expression de gène *PwDmc1* cloné au laboratoire (MN_DQ265801). Celui-ci est un orthologue du gène *Dmc1* de souris, qui code une recombinase spécifique de la méiose appartenant à la famille RecA/Rad51. La présence des CGs a été détectée par l'expression de gène orthologue de *Vasa* « *PwVasa* » également cloné au laboratoire (MN_DQ265800), qui code un membre de la famille DEAD box RNA-helicase.

Les complexes gonades-mésonéphros (GM) de larves ZZ et ZW ont été prélevés au stade 54, alors que des gonades séparées des mésonéphros ont été prélevées depuis le stade 54+30 jours jusqu'à 14 semaines après la métamorphose. Afin de diminuer la variabilité inter-individuelle, nous avons réalisé des mélanges de 3 complexes GM ou de 3 gonades isolées pour chaque échantillon pour les stades larvaires. L'expression de l'ARN messager *PwDmc1* a ensuite été analysée par RT-PCR semi-quantitative (30 cycles). Nous avons détecté un signal dès le stade 54+45 jours chez les femelles. Cette expression est ensuite maintenue chez les juvéniles. En revanche, chez les mâles, l'expression de *PwDmc1* n'est détectée qu'à la 8ème semaine après la métamorphose et se maintient chez les juvéniles.

Il a été montré que 0,7 µM d'AcR induit l'entrée en méiose des CGs chez la souris (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006) et également chez le poulet (Smith et al., 2008). Pour étudier l'effet d'AcR sur l'entrée en méiose chez *Pleurodeles waltl*, nous avons cultivé des complexes GM, prélevés aux différents stades de développement, pendant deux jours en présence d'AcR tout trans (1 ou 2 µM). L'expression de *PwDmc1* a été analysée par RT-PCR semi-quantitative et par PCR en temps-réel. Un signal a été détecté aux stades 50 chez les femelles et 54 chez les mâles dans les GM traités par 2 µM d'AcR. Ceci indique qu'*in vitro*, l'ajout d'AcR induit une entrée en méiose précoce des CGs chez les deux sexes.

Pour étudier l'effet de l'AcR endogène sur l'entrée en méiose *in vitro*, les complexes GM prélevés au stade 54 chez le mâle ont été traités pendant deux jours par du R115866 (Johnson and Johnson, New Brunswick, NJ), inhibiteur de CYP26b1. L'analyse par RT-PCR de l'expression de *PwDmc1* montre un niveau élevé des transcrits. Ceci suggère une accumulation d'une quantité d'AcR endogène suffisante pour induire une entrée en méiose

précoce chez le mâle. Cela indique aussi que la dégradation d'AcR par PwCYP26b1 pourrait être responsable du retard d'entrée en méiose chez le mâle. Ces hypothèses sont étayées par des expériences réalisées chez la femelle. Le traitement des complexes GM prélevés au stade 54+90 jours, auquel les CGs sont déjà entrées en méiose, par le Citral (inhibiteur de RALDH) pendant deux jours bloque l'expression de *PwDmc1*.

Pour étudier le rôle de l'AcR endogène sur l'entrée en méiose *in vivo*, deux gènes, *PwRaldh2* (MN_EU213037) et *PwCyp26b1* (MN_ EU213038) codant respectivement les enzymes capables de synthétiser et de dégrader l'AcR ont été clonés chez le pleurodèle. Les complexes GM sont disséqués aux stades 54 et 54+60 jours chez les deux sexes. Les expressions de PwRALDH2 et PwCYP26B1 sont analysées par western blot en utilisant les anticorps polyclonaux préparés et purifiés dans notre laboratoire (voir chapitre 3.1 matériels et méthodes). Les résultats montrent que PwRALDH2 est exprimé aux stades 54 et 54+60 au même niveau dans les deux sexes. En revanche, l'expression de PwCYP26B1 est moins forte chez la femelle au stade 54+60 jours, durant lequel les CGs entrent en méiose. L'analyse par immunohistochimie de ces enzymes indique également une plus forte expression de PwCYP26B1 dans la gonade et le mésonéphros au stade 56 chez les mâles que chez les femelles.

Les hormones stéroïdes jouent un rôle important dans la différenciation sexuelle chez *Pleurodeles waltl*. Afin de déterminer l'effet potentiel des hormones stéroïdes sur la biosynthèse de l'AcR endogène chez le pleurodèle *in vivo*, nous avons traité les larves ZZ par l'œstradiol (100µg/L) et les individus ZW par la DHT (400µg/L) à partir du stade 50. Nous avons ensuite prélevé les gonades de ces individus au stade 56 pour analyser l'expression de *PwDmc1* par RT-PCR. Un signal a été détecté chez les ZZ traités par l'œstradiol, alors qu'aucune expression n'est détectée chez les larves ZW traitées par la DHT. Les coupes histologiques des gonades de ces individus montrent une inversion sexuelle dans les deux cas. Les individus ZZ traités par l'œstradiol possèdent des ovaires avec une cavité ovarienne et des CGs méiotiques ou non localisées dans le cortex. Les individus ZW traités par la DHT développent des testicules contenant peu de CGs localisées dans la médulla et non encore entrées en méiose à ce stade.

Les expressions des *PwRaldh2* et *PwCyp26b1* ont été également mesurées par RT-PCR chez ces individus traités par l'œstradiol ou chez des mâles et des femelles témoins (non-traités). Les résultats montrent un niveau similaire de l'expression de *PwRaldh2* dans les

gonades de tous ces individus, alors que le niveau d'expression de *PwCyp26b1* est beaucoup moins élevé voire absent dans les gonades des femelles témoins ou des mâles traités par l'œstradiol. Ainsi, les hormones stéroïdes affectent non seulement les cellules somatiques de la gonade mais aussi la différenciation des CGs dont la cinétique d'entrée en méiose est modifiée probablement en raison de la modulation du métabolisme de l'AcR.

Au final, l'ensemble de ces résultats indique que l'induction de l'entrée en méiose des CGs par l'AcR pourrait être un mécanisme de différenciation des CGs conservé chez les vertébrés. De plus, notre étude suggère que la biosynthèse de l'AcR pourrait être régulée par les stéroïdes dans les gonades d'amphibien urodèle.

SPECIAL ISSUE RESEARCH ARTICLE

Evidence for a Conserved Role of Retinoic Acid in Urodele Amphibian Meiosis Onset

Angelina Wallacides, Amand Chesnel, Dominique Chardard, Stéphane Flament, and Hélène Dumond*

***Pleurodeles waltl* is a urodele amphibian displaying a ZZ/ZW genetic mode of sex determination. Gonad differentiation can later be modulated by hormone treatment. To investigate germ cell differentiation, we analyzed the expression of the meiosis marker PwDmc1 and show that germ cells enter meiosis in late larval life in females, and 2 months after metamorphosis in males. Organotypic cultures of gonad–mesonephros complexes demonstrated that retinoic acid triggers meiosis entry in *P. waltl*. In vivo analyses of both PwRaldh2 and PwCyp26b1 expressions, the enzymes required for RA synthesis and degradation respectively, indicate that meiosis onset depends on PwCyp26b1 repression in the gonad during normal or steroid-induced sex-reversed development. Taken together, our results show that RA-dependent meiosis entry could be a conserved mechanism of germ cell differentiation in vertebrates and provide evidence for crosstalk between steroid and RA signaling in the course of sex differentiation. *Developmental Dynamics 238:1389–1397, 2009.* © 2009 Wiley-Liss, Inc.**

Key words: *Pleurodeles waltl*; meiosis entry; sex differentiation; steroids; germ cells

Accepted 3 March 2009

INTRODUCTION

The newt *Pleurodeles waltl* is a urodele amphibian that obeys female ZW heterogamety. Z and W sex chromosomes cannot be distinguished by conventional karyotypes but the genotype can be deduced at early larval stage from the analysis of a sex-linked marker, peptidase 1 (Ferrier et al., 1980). Of interest, ZW but not ZZ sex determination can be reversed by rearing the animals at 32°C instead of 20°C (reviewed in Dumond et al., 2008a).

When compared with other vertebrates, gonad differentiation is a slow process in amphibians and especially in *Pleurodeles*: it takes place mainly during larval life but goes on after metamorphosis and even in adulthood with differentiation of multiple testes (Dournon et al., 1990; Dumond et al., 2008a). Although the somatic compartment of the gonad and the role of steroid hormones have been studied extensively in this species (Kuntz et al., 2003a), little is known about germline differentiation due to the lack of molecular markers up to now. Using embryonic surgery experiments, Maufroid and Capuron (1985) showed that germ cells are induced by endodermal cells from the presumptive mesoderm. However, germ cells resulting from this induction cannot be identified until much later, just before hatching (stage 35) by using morphological features. From stage 35 to 41, primordial germ cells (PGCs) enter a resting period in both sexes while migrating to colonize the somatopleure, leading to the formation of genital ridges (Dournon et al., 1989, 1990). Then, proliferation of both germ cells (stage 42 in ZZ larvae and stage 44 in ZW larvae) and somatic cells starts in the undifferentiated gonad. Beyond stage 53, ovarian differentiation in ZW larvae is characterized by the development of the cortical part, which includes large follicles while medulla

EA 3442 Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Reproduction et du Développement, Nancy-Université, Nancy, France
Grant sponsor: "Université Henri Poincaré (BQR)", of the "Ligue contre le Cancer" and of the "Association pour la Recherche sur le Cancer"; Grant sponsor: Syrian Government; Grant sponsor: Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development; Grant number: R115866.
***Correspondence to: Hélène Dumond, Nancy-Université, Faculté des Sciences, EA3442 Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Reproduction et du Développement, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France. E-mail: helene.dumond@scbiol.uhp-nancy.fr**

DOI 10.1002/dvdy.21948
Published online 3 April 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

Developmental Dynamics

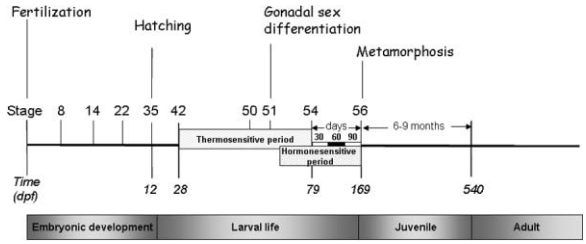


Fig. 1. Timetable of *Pleurodeles waltl* development. Until stage 54, larvae are staged according to Gallien and Durocher (1957). Timing of development is expressed as "days postfertilization" (dpf). Sex differentiation process is first observed at stage 51 through induction of aromatase activity in females and is detected histologically at stage 53. Metamorphosis occurs at stage 56, approximately 90 days after the beginning of stage 54. During the thermosensitive period (from stage 42 to stage 54), females can be reversed to fertile males if reared at 32°C. During the hormonesensitive period (stage 52 to stage 56), males treated with estradiol are reversed into females, while females treated with DHT are reversed into males.

regression leaves a cavity. In contrast, testis differentiation results from a strong development of the medulla. In *Pleurodeles*, stage 53 is the first stage at which gonadal sex may be ascertained by histological examination. Vitellogenic oocytes can be detected at metamorphosis and spermatogenesis begins during juvenile stage (see Fig. 1). Nevertheless, the precise time course of germ cell meiosis entry in both sexes and the factors triggering this process are still completely unknown.

As observed in other nonmammalian vertebrates, steroid hormones play a key role in *Pleurodeles waltl* sex differentiation wherein the P450-aromatase enzyme (P450arom) responsible for estrogen synthesis, is a major player (Kuntz et al., 2003b). Measurements of P450arom activity in gonad–mesonephros (GM) complexes reveal a higher activity in ZW larvae from stage 52 than in their ZZ counterparts (Chardard et al., 1995) and treatment of ZW larvae with an aromatase inhibitor induces sex reversal (Chardard and Dournon, 1999). These results indicate that elevation of P450arom expression is the actual first sign of ovarian determination. The role of steroids in sex differentiation is also evidenced by the fact that, when added to the rearing water of ZZ larvae from stage 52 until metamorphosis, estradiol induces a male-to-female sex reversal whereas nonaromatizable androgens drive ZW larvae to differentiate as males (Chardard et al., 2003). Although these experimental data clearly demonstrate the effect of exogenous steroids on gonad differentiation, we have no knowledge about their potential effect on germline.

In mammals, meiosis entry followed by prophase I arrest is initiated during fetal development in females, whereas in males, spermatogenesis begins only after birth. Until recently, it was commonly believed that female germ cells have the intrinsic property to enter meiosis, whereas this process was thought to be delayed in males by an unknown factor. However, two studies from Koubova et al. (2006) and Bowles et al. (2006) demonstrated the involvement of retinoic acid (RA) in determining germ cell fate in mouse. They showed that RA is released from the mesonephros of both sexes following Aldh1A2 (also called Raldh2) activity from 10.5 days post-conception (dpc), while Cyp26b1, a P450-cytochrome enzyme that degrades RA, is expressed in the gonad. At 12.5 dpc, by the time of meiosis entry in females, Cyp26b1 is no more expressed in females, leading to high levels of RA in the developing ovary, and becomes strikingly male-specific. Moreover, inhibition of Cyp26b1 in the testis induces expression of specific premeiotic (Stra8) and meiotic (Dmc1, Scp3) markers, whereas blockade of RA signaling pathway in the ovary delays meiosis entry. Therefore, the authors conclude that Cyp26b1 is the "meiosis-inhibiting factor" in male mice.

More recently, the picture became more complex: Best et al. (2008) showed that changes in membrane trafficking in Sertoli cells of embryonic mouse testis induces male-to-female sex reversal and concluded to the existence of a secreted meiosis preventing substance (MPS). By using an organotypic culture system, Trautmann et al. (2008) further demonstrated that RA could in turn inhibit this MPS which is also necessary for mitotic arrest at 13.5 dpc and, therefore, induce germ cell death probably due to misunderstanding between somatic and germinal compartments in the embryonic testes. Finally, results from Suzuki and Saga (2008) indicated that Nanos2 is part of this germ cell sex-determining pathway because from 13.5 dpc, it is (1) required to maintain the suppression of meiosis by preventing Stra8 expression, (2) shown to force male differentiation when expressed in female germ cells, and (3) down-regulated by RA. Altogether, these data emphasize the complex relationship between soma and germ during gonad development as well as the key role of RA in this process but also strongly suggest the involvement of other factors. Finally, a recent molecular analysis of meiosis onset in avian embryo further suggested that a regulatory role of retinoic acid may be conserved in higher vertebrates (Smith et al., 2008).

In the present study, we analyzed meiosis onset in the amphibian *Pleurodeles waltl*. To determine at which developmental stage meiosis entry takes place in standard male (ZZ) and female (ZW) animals, we first analyzed the expression of the meiosis marker PwDmc1 (Dumond et al., 2008b). Then, we designed a protocol for organotypic cultures of GM complexes to evaluate the involvement of retinoid and steroid hormones in meiosis initiation. Altogether, our results demonstrate for the first time the conservation of RA-dependent mechanisms for germ cell differentiation in a urodele amphibian.

RESULTS

Meiosis Entry Occurs During Larval Life in Females and After Metamorphosis in Males

The first aim of the study was to follow germ cell differentiation during development in vivo. Therefore, partial cDNA of *P. waltl* Dmc1 ortholog (PwDmc1), which encodes a Rad51-

Developmental Dynamics

like protein in the synaptonemal complex, was cloned by degenerated reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends-PCR (RACE-PCR). Deduced amino acid sequence is 98% identical to the urodele amphibian *Cynops*, 92% to human and chicken. Expression of PwDmc1 mRNA was examined from stage 48 to adulthood as a marker of meiosis entry in male and female gonads (Fig. 2). At each stage, PwVasa transcript expression was measured to verify the presence of a detectable amount of germ cells. In females, the earliest expression of PwDmc1 mRNA was observed at stage 54 + 45 days (Fig. 2A) whereas in males, PwDmc1 mRNA was not detected until 8 weeks after metamorphosis (Fig. 2B). These results indicating an earlier meiosis entry in females were confirmed by a histological analysis (Fig. 3). Germ cells that have not yet entered meiosis are characterized by a very large polylobular nucleus whereas meiotic germ cell nuclei are circular and contain condensed chromatin. Once initiated, meiosis seems to be maintained all through the juvenile stage.

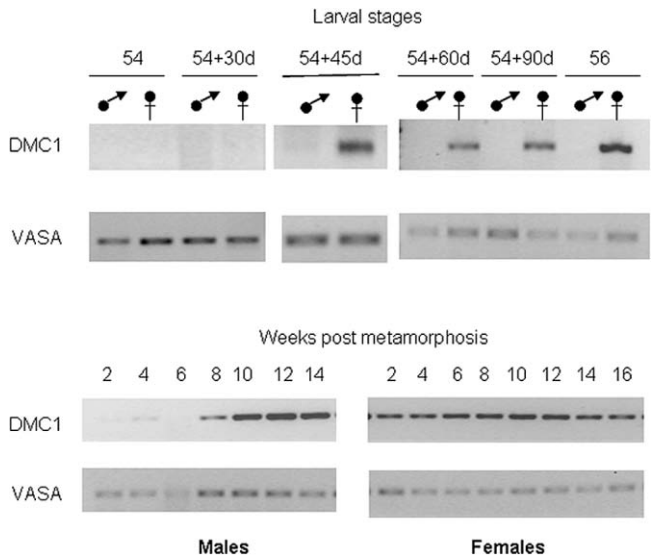


Fig. 2. Onset of meiosis during development of *Pleurodeles waltl*. Gonad–mesonephros (GM) complexes (stage 54) or isolated gonads (from stage 54 + 30 days to stage 56) were harvested from males or females. Before metamorphosis, analyses were performed on pools from 3 larvae whereas after metamorphosis, isolated gonads were sampled. Total RNA was reverse transcribed and amplification of the meiotic marker PwDmc1 was performed as described in the Experimental Procedures section. PwVasa amplification served as a control for relative germ cell amounts. Analyses were repeated twice on two RNA samples independently. The "54+xd" indicates stage 54 plus x days.

Exogenous RA Induces Meiosis Entry In Vitro

To understand the physiological process initiating meiosis in *Pleurodeles waltl* and based on recent data highlighting the role of RA in mouse and chicken, we investigated the effect of all-*trans* RA on germ cells in vitro. GM complexes were carefully dissected at different stages from males or females and individually grown in presence or absence of 1 or 2 μM RA (see the Experimental Procedures section for further details). After 2 days of culture, 3 complexes were pooled for RNA extraction and PwDmc1 mRNA expression was checked by qualitative RT-PCR (Fig. 4A). Such analyses performed either in females at stage 50 or in males at stage 54 (that is before meiosis entry in vivo) revealed that 2 μM RA treatment for 2 days induces PwDmc1 transcription.

Furthermore, we repeated the culture experiment on stage 54 male GM complexes for 2 or 5 days in presence of 2 μM RA and measured PwVasa and PwDmc1 mRNA expressions by quantitative RT-PCR. Such analyses revealed that: (1) PwVasa expression is unaffected by 5 days organ culture; (2) PwDmc1 is transiently expressed; (3) PwDmc1 mRNA is no more detectable after 5 days in presence of RA (Fig. 4B).

These results suggest that, like in mouse and chicken, exogenous RA can trigger meiosis entry in *Pleurodeles waltl*. Nevertheless, in our hands, RA may be necessary but not sufficient to promote complete meiosis and/or endogenous factors rapidly degrade RA in the cultured gonads. Indeed, we cloned the RA degrading enzyme encoding gene PwCyp26b1 (GenBank accession no. EU213038) and observed a strong induction of its transcription under a 48h treatment in the presence of 2μM RA (data not shown).

Endogenous RA Induces Meiosis Entry In Vitro

To demonstrate the involvement of endogenous RA metabolism, we cloned PwRaldh2 (GenBank accession no. EU213037), the enzyme that synthesizes RA. RT-PCR analyses showed that this enzyme was expressed in organotypic cultures of GM complexes at all the stages studied. Then we tried to modulate the activity of either PwCyp26b1 or PwRaldh2. GM complexes from males at stage 54 were treated for 2 days with 2 μM R115866, an inhibitor of PwCYP26 enzyme. RT-PCR revealed a high level of PwDmc1 mRNA in response to R115866 (Fig. 5A), demonstrating that the amount of RA produced endogenously in male GM complex at stage 54 is sufficient to induce meiosis entry.

Moreover, this finding suggests that an in vivo PwCYP26-dependent degradation of RA could be responsible for delaying meiosis entry in male. The latter hypothesis was further supported by results from another organotypic culture experiment. We treated GM complexes from male at stage 54 with 1 nM Am580, a nondegradable analogue of RA that specifically binds to RAR-alpha receptors, and observed both the induction of PwDmc1 expression after 2 days (Fig. 5A) and the typical condensed chromatin of meiotic nuclei after 3 days (Fig. 5B). However, after 5 days, we were not able to perform RT-PCR analysis because cultured GM complexes displayed many dying germ cells with picnotic nuclei and altered structure of mesonephros. Finally, we treated female GM complexes, harvested at stage 54 + 90d (after natural meiosis initia-

Developmental Dynamics

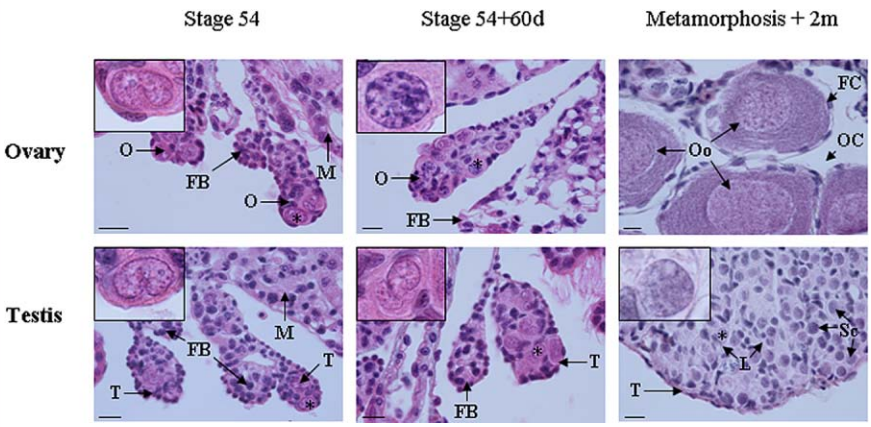


Fig. 3.

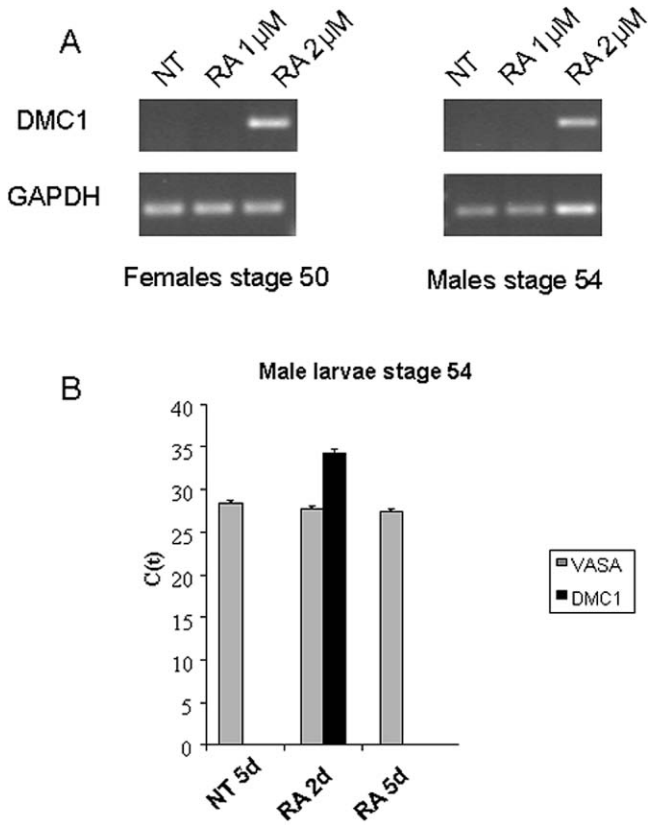


Fig. 4.

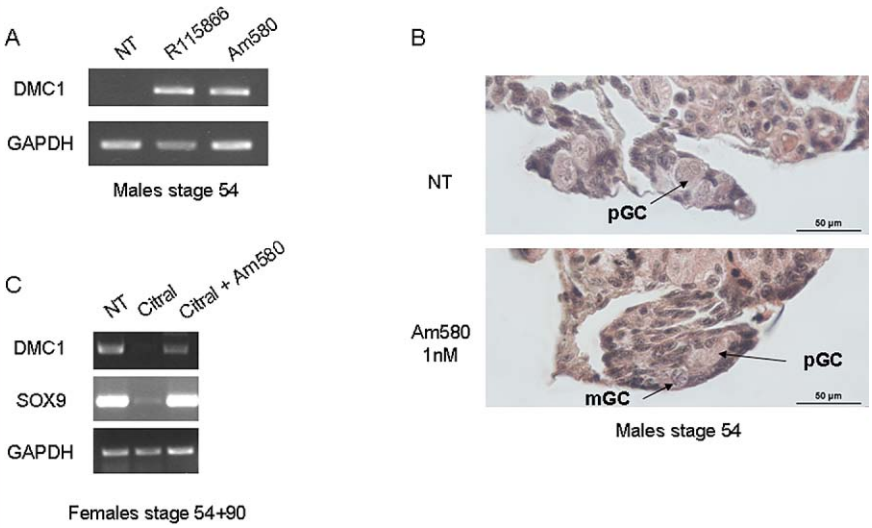


Fig. 5.

tion), with 60 μM Citral, an inhibitor of retinoic acid synthesizing aldehyde dehydrogenase (RALDH), and observed an inhibition of PwDmc1 expression, which can be reversed by a cotreatment with Am580 (Fig. 5C). In the latter experiment, endogenous PwSox9 expression was used as a control of RA signaling pathway inhibition since Afonja et al. (2002) described SOX9 up-regulation by RARalpha-selective (like Am580) but not RXR-selective agonists in breast cancer cell lines.

Fig. 3. Histology of ovary and testis at stage 54, 54 + 2 months, and metamorphosis + 2 months. FB, fat body; L, testis lobe; M, mesonephros; O, ovary; OC, ovarian cavity; Oo, ovocyte; Sc, Spermatocytes; T, testis. Asterisks indicate typical germ cells from each stage presented with higher magnification. At stage 54, neither female nor male gonads contain meiotic germ cells. Such cells are observed at stage 54 + 2 months in the ovary but only 2 months after metamorphosis in the testes. Scale bars = 20 μm.

Fig. 4. Exogenous retinoic acid (RA) triggers premature meiosis entry in male and female gonad–mesonephros (GM) complexes cultured ex vivo. **A:** Three GM from females at stage 50 or males at stage 54 were exposed to 1 or 2 μM RA for 2 days. One microgram of total RNA was reverse transcribed and qualitative amplification of PwDmc1 was performed as previously described. Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) amplification served as a control for relative RNA amounts. **B:** Real-time polymerase chain reaction (PCR) analyses of PwVasa and PwDmc1 expression were performed on cDNA samples obtained from male GM complexes cultured in 2 μM all-*trans* RA containing medium for 2 or 5 days. Results are expressed as the mean of C(t) ratios from triplicates. PwVasa amplification served as a control for relative gem cell amounts.

Fig. 5. PwCyp26b1 activity modulates meiosis entry in male and female gonad–mesonephros (GM) complexes cultured ex vivo. **A:** Three GM from males at stage 54 were exposed for 2 days to 2 μM of the Cyp26b1 inhibitor R11866 or to 1 nM of the nondegradable analogue of RA Am580. One microgram of total RNA was reverse transcribed and qualitative amplification of PwDmc1 and PwGapdh were performed as previously described. **B:** Histology of GM complexes cultured for 2 days in 1 nM Am580 containing medium. pGC, primordial germ cell; mGC, meiotic germ cell with condensed chromatin. **C:** Three GM from females at stage 54 + 90 days (after onset of meiosis) were exposed for 2 days to 60 μM of the PwRaldh2 inhibitor Citral alone or with 1 nM Am580. One microgram of total RNA was reverse transcribed and qualitative amplification of PwDmc1 and PwGapdh were performed as previously described. PwSox9 expression analysis serves as control for Citral treatment efficiency.

Developmental Dynamics

PwCyp26b1 Expression Is Repressed in Female Gonad at Meiotic Stage In Vivo

Because RA seems to play a key role in meiosis entry in organotypic cultures, we underwent in vivo experiments wherein GM complexes were dissected from males and females at stage 54 and stage 54 + 60d, *id est* before or after female meiosis onset, respectively. Western-blotting analyses of PwCYP26 and PwRALDH expressions were performed in both sexes and stages using specific polyclonal antibodies prepared and characterized in the laboratory (see the Experimental Procedures section for further details). The results presented in Figure 6A indicate that PwRALDH is expressed at the same level in males and females at both stages, whereas PwCYP26 expression is diminished in female gonads at the time of meiosis onset (54 + 60d). These results were further confirmed by quantification of the two enzyme expression levels in both sexes from stage 50 to adult stage (Fig. 6B). Before metamorphosis, protein expression was measured in GM complexes because dissection of individual gonads does not give sufficient material. Immunohistological analyses performed at stage 56 with the same antibodies confirmed a higher level of PwCYP26b1 expression in male mesonephros and gonad than in female ones, which correlates with the presence of meiotic germ cells in the ovaries but not in the testes. Such analysis also provided further information on PwRALDH and PwCYP26 localization in male or female GM complexes at the time of metamorphosis. Both enzymes are expressed in mesonephric ductules, with a higher level of CYP26b1 expression observed in male ones. RALDH2 expression is also observed into somatic and germ cells of the gonads, whereas CYP26b1 appears to be mainly expressed into testicular germ cells (Fig. 6C).

After metamorphosis, Western blots were performed on gonads separated from adjacent mesonephroi. Quantification of enzyme expression levels clearly show that, before male meiosis onset occurs, PwCYP26b1 is still expressed at a higher level in male gonads than in female ones, whereas in the adult stage, this difference is no more observed. The same sex-dependent differential expression level was also obtained in kidney, but to a lesser extent (data not shown).

Hormonal Status of the Gonad May Alter Germ Cell Differentiation

Steroid hormones play a major role in sex differentiation in urodele amphibians and can even lead to complete functional sex reversal (Kuntz et al., 2003a). In *Pleurodeles waltl*, aromatase activity that leads to estradiol (E_2) production increases in female gonads from stage 52 (Chardard et al., 1995; Kuntz et al., 2003a,b). This induction is also observed even if delayed until late stage 54, in males feminized with E_2 treatment. Therefore, we investigated if the hormonal status of the gonad could modify endogenous production/degradation of RA and alter germ cell differentiation.

We analyzed PwDmc1 expression in ZZ larvae treated with E_2 (100 μg/L from stage 50), or ZW larvae grown in presence of the nonaromatizable androgen DHT (400 μg/L from stage 50). No expression was detected until stage 54 + 60d (not shown). At the time of metamorphosis (stage 56), PwDmc1 expression was observed in E_2-treated ZZ larvae but not in DHT-treated ZW ones (Fig. 7A). This result was correlated to the morphology of the gonad (Fig. 7B). Indeed, E_2-treated ZZ animals were sex-reversed and possessed an ovary with an ovarian cavity and germ cells (meiotic or not) localized in the cortex, whereas the gonad from DHT-treated ZW larvae showed testes containing a few primordial germ cells with a polylobular nucleus in the medulla, surrounded by nonorganized somatic cells.

In an attempt to correlate germ cell phenotype and the presence of RA in hormone-treated or standard animals, we measured the mRNA expression levels of PwRaldh2 and PwCyp26b1 in vivo. At stages 54 + 90d and 56 (metamorphosis), high level of PwCyp26b1 expression was detected in gonads from standard males but not from standard females or E_2-treated males. Similar levels of PwRaldh2 transcripts were observed in all samples (Fig. 7C). Therefore, the low level or absence of PwCyp26b1 expression seems to correlate with meiosis entry in sex-reversed animals.

DISCUSSION

In this study, we investigated the mechanisms that trigger germ cell differentiation in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. We show that female germ cells enter meiosis at the end of larval life (54 + 60d), whereas in male germ cells, meiosis is delayed until juvenile stage (metamorphosis + 2 months). This result is correlated with morphological changes in germ cell nuclei. Using an organ culture system, we demonstrate for the first time in an amphibian model that RA determines germ cell fate in male gonad because addition of exogenous all-*trans* RA is sufficient to trigger premature meiosis entry. The same situation was described in mouse where exposure of embryonic testis to RA induces the expression of the meiotic markers Stra8, Dmc1, and Scp3 (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Recently, a key role of RA in regulating the premeiotic marker Stra8 was also demonstrated in avian embryos through a comprehensive analysis of genes involved in RA metabolism during development (Smith et al., 2008).

To test if PwCyp26b1, the enzyme degrading RA in vivo, could be a meiosis inhibiting factor in male *Pleurodeles*, GM complexes were explanted before meiosis entry and grown in the presence of the specific Cyp26b1 inhibitor, R115866. This experiment demonstrated that inhibition of PwCyp26b1 (i.e., actual raise of endogenous RA level) was also able to induce PwDmc1 mRNA expression and chromatin condensation in larval male germ cells. However, prolonged exposure to RA through a 5-day treatment with Am580 is associated with nuclei picnosis. This may reflect a more general feature of Cyp26b1 activity, which was recently demonstrated in the mouse model to be not only necessary for germ cell differentiation in ovaries but also for their survival in testes (Maclean et al., 2007). Moreover, it was shown that mouse embryonic testes exposed to RA on 13.5 dpc in organotypic culture display an inhibition of mitotic arrest,

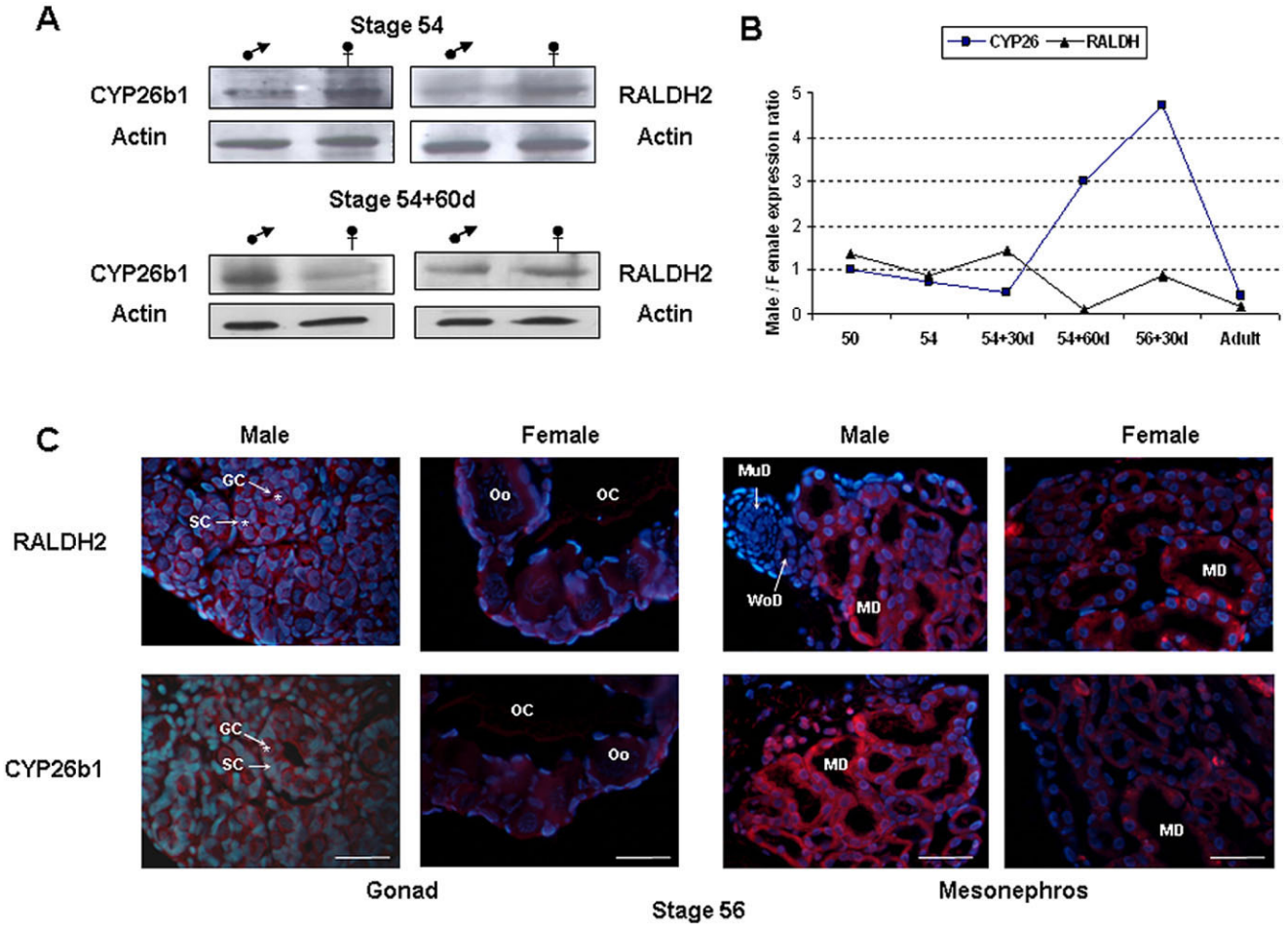


Fig. 6.

which in turn, induces germ cell death with typical picnotic nuclei (Trautmann et al., 2008).

To identify the source of RA in vivo and the time course of its synthesis/degradation, we measured the expression of both PwCyp26b1 and PwRaldh2 at the protein level. In *P. waltl*, both enzymes are expressed in both gonad and mesonephros. Until stage 54, PwRaldh2 and PwCyp26b1 are expressed in GM complexes of both sexes at a similar level, as described in mouse and chicken before female meiosis onset (Bowles et al., 2006; Smith et al., 2008). At stage 54 + 60 days, by the time of female meiosis entry, we observed a reduction of PwCyp26b1 protein level in female complexes, suggesting that an elevation of RA level at least contributes to meiosis entry in vivo. In fact, when the same experiments are performed after metamorphosis, PwCyp26b1 transcript and protein levels also appear to be correlated to meiotic status because standard females as well as sex-reversed males display low level of PwCyp26b1 transcripts in their gonads which contain meiotic germ cells, whereas standard males or neomales (sex-reversed ZW larvae) display high levels of

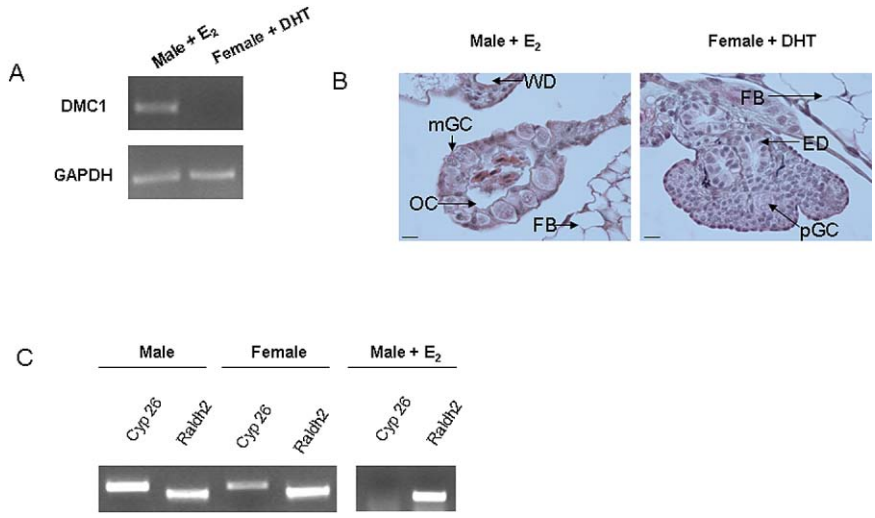


Fig. 7.

Developmental Dynamics

PwCyp26b1 transcripts but no meiotic cells. Therefore, *Pleurodeles waltl* germline may follow an RA-dependent differentiation process as in mouse and chicken.

In mammals, steroid hormones control genital ducts differentiation and secondary sex characteristics development, whereas in lower vertebrates like urodele amphibians, steroids act at primary steps of sex differentiation (Jost, 1953; Hayes, 1998). Indeed, treatments of *P. waltl* larvae with hormones, anti-hormones, or steroidogenesis enzyme inhibitors can lead to sex reversal (Kuntz et al., 2003a). For example, E_2-treated males differentiate fertile ovaries, while treatments with androgens lead to various results: testosterone-treated males give rise to functional neofemales due to aromatization of the androgen by P450-aromatase while vestigial testes are observed in females treated with the nonaromatizable DHT (Chardard et al., 2003). Therefore, we finally addressed the question of steroid effects on meiosis entry and RA synthesis/degradation pathway in vitro and in vivo.

First, we observed that seasonal variation appeared in PwDmc1 expression in adults (from 18 months old), with male meiosis occurring all year long, whereas females seem to renew their oocyte stock only during summer (May to September) after the reproduction period (data not shown). These seasonal fluctuations of detectable number of germ cells in meiotic prophase in females are in agreement with an elevated ratio of [E_2-17 beta]/[Androgen] which is stable (ratio = 0.2 to 0.3) during the major part of the year, except in July and August, when it reaches the value of 1.0 (Garnier, 1985a). However, no relationships were found between the presence of meiotic germ cells that are observed along the reproductive season in males (September to May) and the two peaks of androgen plasmatic levels (October–November and March) (Garnier, 1985b).

Second, we showed that meiosis entry occurs in males treated with E_2 at the same time as in standard females, whereas it is delayed until after metamorphosis in DHT-treated females. Therefore, hormone-dependent sex reversal cannot only promote the reorganization of the gonad somatic compartment but also affect the germ cell differentiation process, at least in part, through the modulation of RA metabolism. Moreover, our results indicate that the transcription level of PwCyp26b1 is higher in male than in female and E_2-treated neofemale, respectively, suggesting that a high level of E_2 in gonad environment is associated with a high repression level of PwCyp26b1 expression.

Connections between RA signaling and E_2 transduction pathways appear to be also relevant at the molecular level and seem to be a general feature of cells from mesodermic origin that undergo epithelium formation. From 13.5 dpc, mouse male germ cells stop mitotic proliferation and associate to somatic cells to form testicular cords. In fact, RA was demonstrated to block this process through PI3-kinase signaling (Trautmann et al., 2008). In addition, Giretti and Simoncini (2008) pointed out the regulatory actions of E_2 in regulating, focal adhesion assembly involved in epithelial–mesenchyme transition (EMT), namely through the PI3-kinase pathway. Therefore, it would be interesting to address the potential effects of PI3K inhibitors on male gonad differentiation in the course of normal development or during E_2-mediated sex reversal in *Pleurodeles waltl*.

Here, we currently bring the first data about the regulation of RA biosynthesis by steroids in the gonads of an amphibian species. Because it was demonstrated that the gonadic promoter of aromatase, which also drives gene expression in breast cancer, can be negatively regulated by retinoid receptors RAR and RXR (Chen et al., 2002; Rubin et al., 2002), the molecular basis of the crosstalk between RA and steroids during sex differentiation might be more complex than expected up to here and remain to be determined.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Embryos and larvae were staged (Fig. 1) according to the development timetable stages described by Gallien and Durocher (1957). During larval life, animals were analyzed from stage 48 to stage 56 at which metamorphosis takes place. Juveniles were also harvested every 2 weeks to study meiotic process. Before manipulation, animals were anesthetized with 0.03% benzocaine. The local Animal Care and Use

Fig. 6. Expression of the enzymes synthesizing (PwRaldh2) and degrading (PwCyp26b1) retinoic acid (RA) in larval gonad–mesonephros (GM) complexes of both sexes. **A:** Western blotting analysis of PwCYP26 and PwRALDH expression. A total of 30–50 μg of total protein were probed with 1:1,000 polyclonal-specific antibodies obtained and purified in our laboratory as described in the Experimental Procedures section. **B:** Male/female expression ratios of CYP26b1 and RALDH2 during Pleurodeles development. At stage 50, 54, 54 + 30, and 54 + 60, analyses were performed on pools of either 10 male or female gonad-mesonephros complexes; at juvenile and adult stages, expression level was determined on pools of 3 isolated gonads. Measurements were performed once at stage 50, on 2 pools at stage 54, 54 + 30, and 54 + 60 and juvenile and three times in adults. The graph shows the results of a representative experiment where all stages were analyzed on the same blot. **C:** Immunolocalization of the cells expressing both enzymes in male and female GM complexes at stage 56. Seven-micrometer sections of paraffin-embedded GM complexes were incubated with specific primary rabbit antibody, anti-PwCYP26 or anti-PwRALDH at the dilution 1:1,000 and then exposed to Alexa fluor 555 goat anti-rabbit IgG antibody diluted to 1:1,000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). DNA was stained with Hoechst 33342 to visualize the nuclei. Scale bars = 100 μm. GC, germ cell; MD, mesonephric duct; MuD, Müllerian duct; OC, ovarian cavity; Oo, oocyte; SC, somatic cell, WoD, Wolffian duct; asterisks indicate stained cells in testis.

Fig. 7. Molecular and histological phenotype of sex-reversed animals after metamorphosis (stage 56). **A:** Expression of the meiotic marker PwDmc1 was assessed by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) on isolated gonads sampled from E_2-treated males or DHT-treated females. Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) amplification served as a control for relative RNA amounts. **B:** The global morphology of the gonads and the differentiation status of germ cells were observed after hematoxylin–eosin staining of gonads from animals of the same batch at the same stage. ED, efferent duct; FB, fat body; pGC, primordial germ cell; MGC, meiotic germ cell; OC, ovarian cavity; WD, wolffian duct. Scale bars = 20 μm. **C:** Transcription levels of enzymes synthesizing (PwRaldh2) or degrading (PwCyp26b1) retinoic acid were also measured in nontreated or treated animals by semiquantitative RT-PCR. One microgram total RNA was reverse transcribed, and amplifications of PwRaldh2 and PwCyp26b1 were performed as described in the Experimental Procedures section.

Developmental Dynamics

Committee approved the experimental protocols, and guidelines for laboratory procedures were followed at all times.

Chemicals and Solutions

Leibovitz medium (L15) was diluted in sterile water (2:1) to respect the low osmotic pressure required for amphibian tissue culture and supplemented with 1% L-glutamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 10% stripped fetal calf serum (Sigma-Aldrich, France), 100 U/ml penicillin G, 100 μg/ml streptomycin (Invitrogen). The concentrations of compounds in culture media were as follows: all-*trans* RA 2 μM, Am580 2 μM, Citral 60 μM (all three from Sigma-Aldrich), and CYP26 inhibitor R115866 2 μM (gift from Johnson and Johnson, New Brunswick, NJ). In vivo treatments were performed by addition of hormones in rearing water: Estradiol (Sigma-Aldrich) 100 μg/L, Dihydrotestosterone (Fluka, Sigma-Aldrich) 400μg/L.

Determination of Sexual Genotype and Phenotype

For sexual genotype analysis, at stage 48, a biopsy was obtained from the tail of the animals anesthetized with 0.03% benzocaine. The tissue was homogenized in 50 mM Tris-HCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 25 mM NaCl buffer. Samples were electrophoresed in a 0.7% agarose stacking – 10.5% starch running horizontal gel, in 25 mM Tris-Citrate pH 8.0 buffer. The patterns of peptidase-1 were revealed by specific hydrolysis of valyl-leucine substrate coupled with peroxidase colored reaction as previously described (Dournon et al., 1988).

RT-PCR

The detailed protocol for reverse transcription has been previously described (Kuntz et al., 2003b). Total RNA was extracted from pools of three GM complexes at stages 53, 54, or 54 + 60 days or from 20–50 mg of adult tissues using 200 μl of TRIzol reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and quantified. Total RNA (1 μg) was reverse transcribed using hexamer primers and 100 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 25 μl. A 2-μl aliquot of resultant cDNA was used for PCR.

The amplification was performed with 0.5 U of *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mM $MgCl_2$, and 10 pmol of each primer in a total volume of 25 μl. Specific primers and conditions of amplification for PwGapdh, PwVasa, and PwDmc1 cDNAs have been described previously (Dumond et al., 2008b). Primers for PwCyp26b1 (dir 5′-GAC-AAG-AGC-TGC-AAG-CTG-CC-3′; rev 5′-GCT-GGA-TCT-TGG-GCA-**GGT-A-AC**-3′), PwRaldh2 (dir 5′-CCC-ATT-GGA-GTG-TGT-GGA-CAG-ATC-3′; rev 5′-CTT –CTT-CCA-GCT-GCT-TCT-TG-3′), and PwSox9 (GenBank accession no. EU872027) (dir 5′-GAG-GGC-TCC-GAG-CAA-ACG-CAC-3′; rev 5′-GCT-CTG-CTC-GCT-GCC-CAG-TGT-3′) were used for a 35 cycles PCR (1 min 95°C; 1 min 55°C, 52°C, and 66°C, respectively; 1 min 72°C).

PCR products (12 μl) were run in a 1% agarose gel containing 0.5 μg/ml ethidium bromide.

Quantitative real-time PCR analysis was performed on an Opticon 2 System (BIO-RAD laboratories) by using SYBR-green labeling. Each cDNA sample was analyzed in triplicate with specific PwVasa or PwDmc1 primers (Dumond et al., 2008b). PwDmc1 expression was normalized to PwVasa transcript expression as a germ cell control gene.

Western Blotting

Pools of 3 gonad-mesonephros complexes from larvae were sonicated on ice in PY lysis buffer (Etique et al., 2006) for 5 sec (Branson sonifier 150, Branson Ultrasonics, Danbury, MA). After 10 min at 13,000 rpm centrifugation, supernatants were sampled and boiled for 5 min in Laemmli buffer. Total proteins (30–50 μg) were separated on a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred to an Amersham Hybond enhanced chemiluminescence membrane (Amersham Bioscience Corp, Piscataway, NJ). The membrane was blocked for 1 hr at room temperature in Tris buffered saline containing 0.1% Tween and 5% bovine serum albumin. After blocking of nonspecific binding, membrane was incubated overnight at 4°C with a specific polyclonal anti-PwCYP26 (amino acids 2–80) or anti-PwRALDH (amino acids 6–98) rabbit serum, produced in the laboratory and diluted to 1:1,000 in the blocking buffer. The secondary anti-rabbit antibody was used following manufacturer's instructions (Amersham Bioscience Corp). Immunoreactive proteins were detected using enhanced chemiluminescence (ECL kit, Amersham Bioscience Corp).

Organ Culture

GM complexes were removed aseptically from the larvae anesthetized with 0.03% benzocaine (stage 48 to 54) under a binocular microscope. Whole explants were transferred to the in vitro culture system: the complexes were placed on a single Millipore filter (HA, pores size: 0.45 μm; Bedford, MA). The filters bearing the explants were floating on 1 ml of culture medium in tissue culture dishes and incubated at room temperature (20 ± 2°C) under noncontrolled gas composition. The complexes were maintained for 2–5 days with the medium being replaced once a day. Cultured explants were harvested for RNA extraction and RT-PCR analyses, or incubated for 48 hr in Bouin's fixative for histological analysis. No necrosis was ever observed in any part of the tissues.

Histology

GM complexes were fixed in Bouin's solution, embedded in paraffin, and sectioned at 7 μm. Sections were stained with hematoxylin–eosin–light green as described previously (Dumond et al., 2008b).

Immunohistochemistry Analysis

GM complexes were fixed overnight in 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 7 μm. PwCYP26 and PwRALDH immunolabeling were performed on sections deparaffinized in Histolemon (Carlo-Erba Corp., Val de Reuil, France) and gradually rehydrated. Slices were incubated with BSA 4% for 10 min at

room temperature to block nonspecific binding. Then these sections were incubated for 30 min with specific primary rabbit antibody, anti-PwCYP26 or anti-PwRALDH at the dilution 1:1,000. After two washes with Tris-HCl buffer, they were exposed for 30 min to Alexa fluor 555 goat anti-rabbit IgG antibody diluted to 1:1,000 (Invitrogen). Finally, the sections were rinsed with Tris-HCl buffer for 10 min and DNA was stained with Hoechst 33342 to visualize the nuclei. Fluorescence labeling was observed under a Nikon microscope.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Eric Gelhaye for his kind help and abundant advice for antibody purification. We also thank Martine Chillet for her excellent work in histology, and Alexandra Kleinclauss and Elia Bouvry for technical assistance and animal rearing. A.W. was funded by a Syrian Government fellowship.

REFERENCES

Afonja O, Raaka BM, Huang A, Das S, Zhao X, Helmer E, Juste D, Samuels HH. 2002. RAR agonists stimulate SOX9 gene expression in breast cancer cell lines: evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition. Oncogene 21: 7850–7860.

Best D, Sahlender DA, Walther N, Peden AA, Adams IR. 2008. Sdmg1 is a conserved transmembrane protein associated with germ cell sex determination and germline-soma interactions in mice. Development 135:1415–1425.

Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science 312:596–600.

Chardard D, Dournon C. 1999. Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt Pleurodeles waltl. J Exp Zool 283:43–50.

Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dournon C. 1995. Aromatase activity in larval gonads of Pleurodeles waltl (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. Gen Comp Endocrinol 99:100–107.

Chardard D, Kuntz S, Chesnel A, Flament S. 2003. Effects of androgens on sex differentiation of the urodele Pleurodeles waltl. J Exp Zoolog A Comp Exp Biol 296:46–55.

Chen S, Itoh T, Wu K, Zhou D, Yang C. 2002. Transcriptional regulation of aromatase expression in human breast tissue. J Steroid Biochem Mol Biol 83:93–99.

Dournon C, Collenot A, Lauthier M. 1988. Sex-linked peptidase-1 patterns in Pleurodeles waltlii Michah (Urodele Amphibian): genetic evidence for a new codominant allele on the W sex chromosome and identification of ZZ, ZW and WW sexual genotypes. Reprod Nutr Dev 28: 979–987.

Dournon C, Demassieux C, Durand D, Lesimple M. 1989. Primordial germ cell proliferation in the salamander Pleurodeles waltl: genetic control before gonadal differentiation. Int J Dev Biol 33:477–485.

Dournon C, Durand D, Demassieux C, Lesimple M. 1990. Differential germ cell proliferation in the salamander Pleurodeles waltl: controls by sexual genotype and by thermal epigenetic factor before differentiation of sexual phenotype of gonads. Int J Dev Biol 34:365–375.

Dumond H, Kuntz S, Chesnel A, Ko CI, Wallacides A, Chardard D, Flament S. 2008a. Sexual development of the urodele amphibian Pleurodeles waltl. Sex Dev 2:104–114.

Dumond H, Maufroid JP, Ko CI, Chardard D, Chesnel A, Flament S. 2008b. Freemartin in the amphibian Pleurodeles waltl: parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. Mol Reprod Dev 75: 439–449.

Etique N, Grillier-Vuissoz I, Flament S. 2006. Ethanol stimulates the secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in MCF-7 human breast cancer cells. Oncol Rep 15:603–608.

Ferrier V, Jaylet A, Cayrol C, Gasser F, Buisan JJ. 1980. Etude électrophorétique des peptidases érythrocytaires chez Pleurodeles waltlii (Amphibien, Urodèle): mise en évidence d'une liaison avec le sexe. C R Acad Sci 290:571–574.

Gallien L, Durocher M. 1957. Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltl. Bull Biol Fr Belg 91:97–114.

Garnier DH. 1985a. Androgen and estrogen levels in the plasma of Pleurodeles waltl, Michah., during the annual cycle. I. Male cycle. Gen Comp Endocrinol 58: 376–385.

Garnier DH. 1985b. Androgen and estrogen levels in the plasma of Pleurodeles waltl, Michah., during the annual cycle. II. Female cycle. Gen Comp Endocrinol 60:414–418.

Giretti MS, Simoncini T. 2008. Rapid regulatory actions of sex steroids on cell movement through the actin cytoskeleton. Steroids 73:895–900.

Hayes TB. 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. J Exp Zool 281:373–399.

Jost A. 1953. Fetal intersexuality induced by methylandrostenediol in the rat; with reference to a probably similar clinical observation. C R Seances Soc Biol Fil 147:1930–1933.

Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 103:2474–2479.

Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Flament S. 2003a. Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt Pleurodeles waltl. Cytogenet Genome Res 101:283–288.

Kuntz S, Chesnel A, Duterque-Coquillaud M, Grillier-Vuissoz I, Callier M, Dournon C, Flament S, Chardard D. 2003b. Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt Pleurodeles waltl. J Steroid Biochem Mol Biol 84:89–100.

Maclean G, Li H, Metzger D, Chambon P, Petkovich M. 2007. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. Endocrinology 148:4560–4567.

Maufroid JP, Capuron AP. 1985. A demonstration of cellular interactions during the formation of mesoderm and primordial germ cells in Pleurodeles waltlii. Differentiation 29:20–24.

Rubin GL, Duong JH, Clyne CD, Speed CJ, Murata Y, Gong C, Simpson ER. 2002. Ligands for the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor inhibit aromatase cytochrome P450 (CYP19) expression mediated by promoter II in human breast adipose. Endocrinology 143:2863–2871.

Smith CA, Roeszler KN, Bowles J, Koopman P, Sinclair AH. 2008. Onset of meiosis in the chicken embryo; evidence of a role for retinoic acid. BMC Dev Biol 8:85.

Suzuki A, Saga Y. 2008. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. Genes Dev 22:430–435.

Trautmann E, Guerquin MJ, Duquenne C, Lahaye JB, Habert R, Livera G. 2008. Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. Cell Cycle 7:656–664.

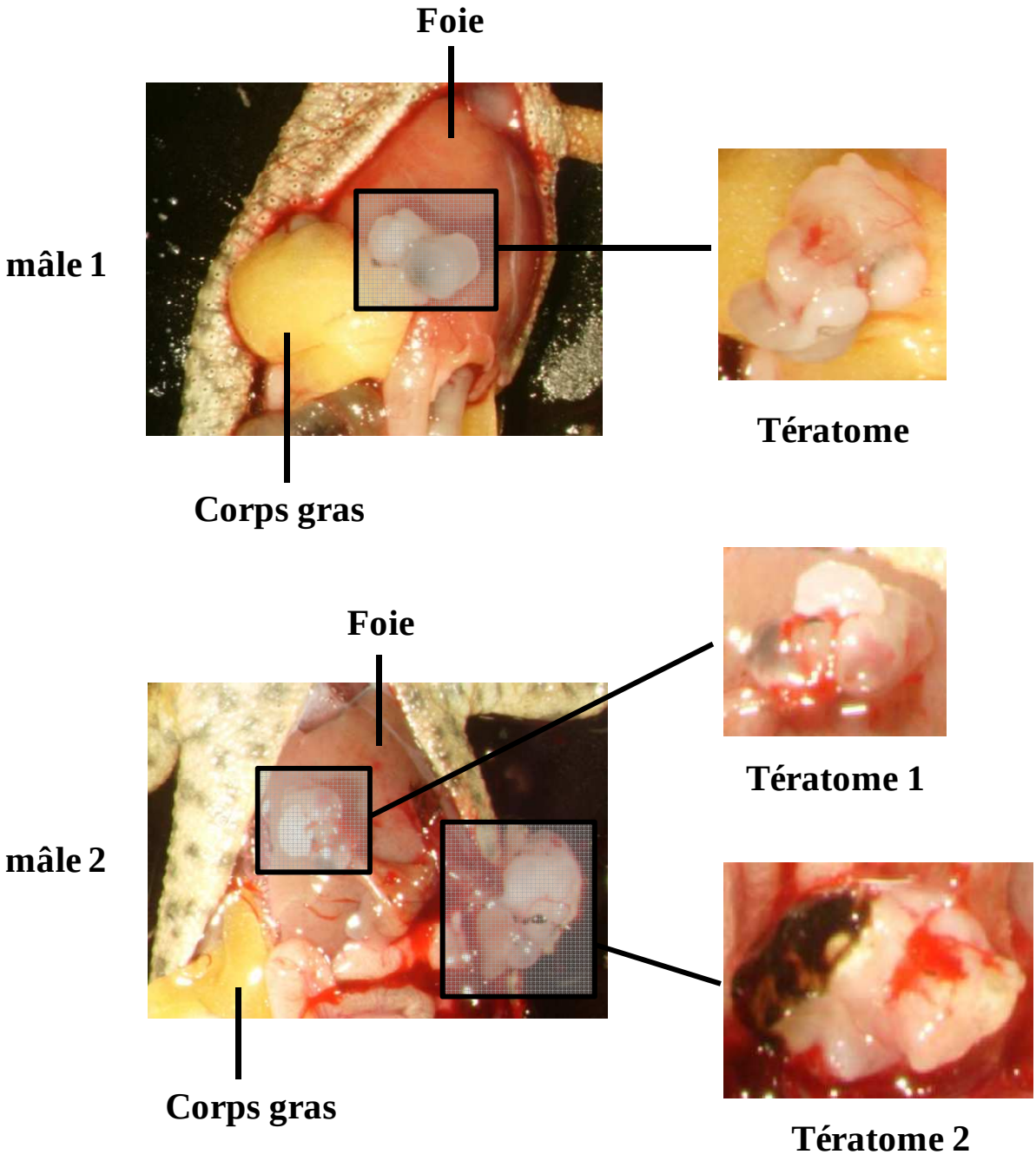


Figure 45 : Tératomes obtenus expérimentalement à partir d'implants embryonnaires chez *Pleurodeles waltl.* Deux mâles ont développé des tératomes six mois après l'implantation. Le premier a développé un tératome lié au corps gras, alors que le deuxième a développé deux tératomes associés au foie.

4. Résultats supplémentaires : production de tératomes expérimentaux à partir d'implants embryonnaires chez *Pleurodeles waltl*

Contrairement à la souris, la différenciation gonadique du pleurodèle est un processus lent et graduel. En outre, nos essais d'induction de la méiose par injection intra-péritonéale d'AcR n'ont pas abouti. Nous avons donc essayé de produire des dérivés des CGs immortalisées *in vitro* à partir de tératomes expérimentaux, afin d'étudier dans des CGs en culture *in vitro*, les voies de signalisation ainsi que les gènes cibles de l'AcR et des stéroïdes.

Les tumeurs spontanées chez les amphibiens, en particulier chez les urodèles, sont peu fréquentes (Houillon, 1988). La rareté des tumeurs naturelles tout comme la difficulté à induire des tumeurs par les substances cancérigènes chez les urodèles, ont conduit Houillon à rechercher l'aptitude du pleurodèle à produire des tératomes. Des embryons de pleurodèle depuis la segmentation jusqu'à l'éclosion, ont été implantés dans la cavité générale de larves, d'individus en cours de métamorphose ou métamorphosés depuis peu (Houillon, 1988).

Nous avons voulu reproduire le protocole décrit par Houillon. Des embryons de pleurodèle, du stade 4 au stade 22, sont implantés dans la cavité générale de pleurodèles tout juste métamorphosés. Après une courte incision latérale des larves hôte anesthésiées, les embryons sont inoculés dans la cavité générale à l'aide d'une pipette. Le nombre d'embryons implantés varie de 2 à 4 par individu. L'animal est ensuite placé sur des papiers humides pendant quelques heures pour le suivi post-opératoire. L'élevage se poursuit ensuite dans l'eau selon les conditions ordinaires décrites précédemment.

Sur 18 animaux opérés dont seize femelles et deux mâles, seuls les deux mâles ont développé un tératome six mois plus tard : un des deux tératomes était lié au corps gras, alors que le deuxième était associé au foie (figure 45). Le tératome lié au foie a été fixé dans le Bouin pour préparer des coupes histologiques (figure 46). Le deuxième tératome a été coupé en deux parties, une partie a servi pour l'histologie tandis que la deuxième a été utilisée pour la culture primaire. La dissociation des cellules a été réalisée par broyage au Potter, puis par traitement à la collagénase. Les cellules ont été mises en culture dans du milieu L15 contenant 20% de sérum de veau fœtal (SVF). Elles ont adhéré au fond de la boîte sous forme de petits amas (figure 47). Cependant, après quelques passages et plus de trois semaines de culture, aucune cellule immortalisée ne s'est multipliée jusqu'à former un clone utilisable pour la suite du travail.

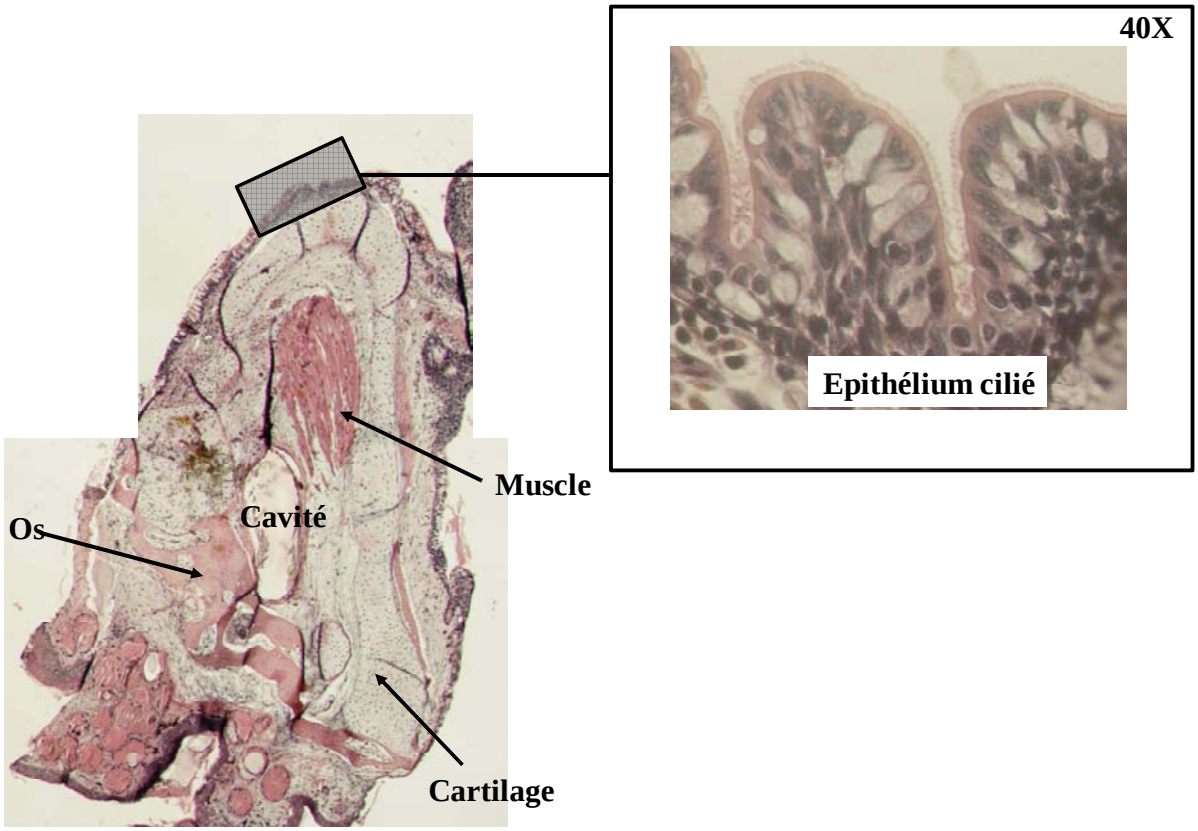


Figure 46 : Coupe histologique d'un tératome de pleurodèle composé de nombreux tissus plus ou moins différenciés. On peut distinguer des tissus d'origine mésodermique : cartilage, os, muscle et vaisseaux, entouré par épithélium cilié et sécrétoire (digestif ?).

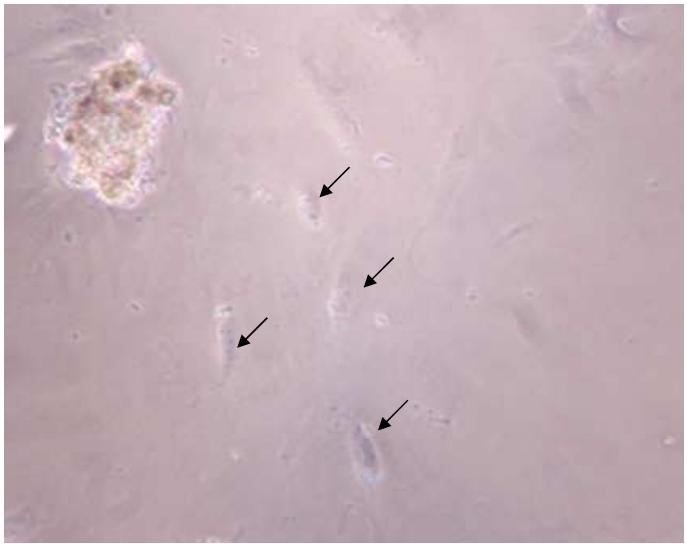


Figure 47 : Culture d'un tératome de pleurodèle. Les flèches indiquent les cellules qui s'extirpent de l'amas après environ 48 heures de culture. Observation au microscope inversé à contraste de phase (10X).

5. Discussion et perspectives

La première partie de la thèse s'inscrit dans une meilleure compréhension de l'entrée en méiose des CGs chez le pleurodèle et du rôle de l'AcR et des hormones stéroïdes dans ce processus. La discussion de la problématique de recherche qui suit sera basée sur trois points en comparant notre modèle d'étude, l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*, avec les mammifères.

Chez les amphibiens, le premier signe de la différenciation histologique des gonades est observé lors de la modification de la localisation des CGs. Chez *Pleurodeles waltl*, la différenciation morphologique des gonades est observée histologiquement vers la fin de la vie larvaire (stade 53). En revanche, l'entrée en méiose des CGs mâles et femelles ainsi que les facteurs qui influencent ce processus étaient largement inconnus.

5.1. La cinétique de la différenciation des CGs est elle comparable entre le pleurodèle et les mammifères ?

Lors de la différenciation testiculaire qui se déroule à la fin de la vie larvaire chez *Pleurodeles waltl*, les cordons médullaires restent massifs. Le cortex se réduit et forme l'albuginée qui couvrira la partie médullaire. Les CGPs colonisent les cordons médullaires (Hayes, 1998). Le testicule est constitué de deux parties : la partie postérieure présente un lobe contenant des lobules au sein desquels les spermatogonies s'associent avec des cellules de Sertoli en formant des unités appelées cystes localisés dans des lobules. La partie antérieure du testicule est proche du poumon, les deux organes étant emballés par un tissu conjonctif commun (figure 41). Cette partie antérieure possède un cortex épais et elle est également constituée de lobules qui renferment des CGPs. A ce stade du développement (fin de la vie larvaire), les CGs possèdent un grand noyau polylobé typique des cellules souches de la lignée germinale. Après la métamorphose et au cours de la vie adulte, la spermatogenèse se déroulera de façon synchrone au sein d'un même cyste. Chez le mâle, nous avons observé l'entrée en méiose des CGs deux mois après la métamorphose en détectant l'expression d'un orthologue de *Dmc1*, marqueur de la méiose (*PwDmc1*). De plus, l'étude histologique montre que ces CGs ont des noyaux ronds avec une chromatine condensée. En revanche, les CGPs localisées dans la partie antérieure du testicule attachée au poumon, n'entrent pas en méiose puisque l'expression de *PwDmc1* n'est pas détectée dans les CGs de cette partie chez les juvéniles et les jeunes adultes et qu'elles conservent leur morphologie typique de CGPs

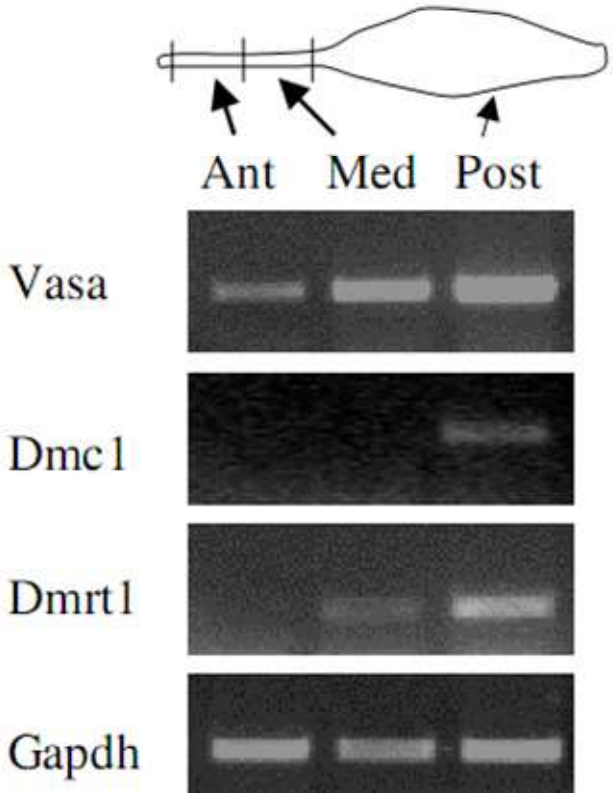


Figure 48 : Analyse par RT-PCR de plusieurs marqueurs dans les différentes régions du testicule d'un pleurodèle âgé de 9,5 mois. Le testicule a été séparé en trois parties : la partie antérieure attachée au poumon (Ant), la partie moyennne (Med) et la partie postérieure (Post) qui correspond au premier lobe testiculaire. Les gènes analysés sont : Vasa marqueur des cellules germinales, Dmc1 marqueur de l'entrée en méiose, Dmrt1 marqueur de la différenciation testiculaire; Gapdh gène de référence. (D'après Flament et al., 2009).

(grand noyau polylobé) (Flament et al., 2009). La production d'AcR ou sa dégradation pourraient donc être régionalisées. Une autre hypothèse pourrait être l'insensibilité des CGs antérieures à l'AcR. De plus, l'expression d'un marqueur de la différenciation testiculaire, *Dmrt1*, n'est pas détectée dans la partie antérieure du testicule. Ceci indique que cette région reste indifférenciée à l'âge adulte (figure 48).

Le pleurodèle est un amphibien à reproduction saisonnière (septembre à mai). Nous avons voulu savoir si l'entrée en méiose des CGs suivait aussi un cycle saisonnier. L'analyse au cours de l'année de l'expression de *Dmc1* chez des individus mâles adultes (18 mois) a montré que des CGs méiotiques sont présentes pendant toute la saison de reproduction. Par ailleurs, l'aspect d'un lobe testiculaire évolue au cours de l'année : la maturation des CGs dans le testicule des urodèles évolue de façon céphalo-caudale (Pierantoni et al., 2002). En été et jusqu'à fin septembre, le testicule est constitué des deux régions : une région grise dite immature située dans la partie antérieure du lobe contenant des spermatogonies et des spermatocytes ; une région blanche dite mûre qui occupe la partie postérieure du lobe et renferme des cystes pleins de spermatozoïdes. Au début de la saison de reproduction, l'évacuation des spermatozoïdes vide la partie postérieure de la région mûre qui se transforme grâce à la différenciation des cellules de Leydig en tissu glandulaire.

À l'âge de trois ans, le testicule continue sa différenciation et développe un deuxième lobe à partir des CGs résiduelles localisées dans le tissu glandulaire à l'extrémité caudale du premier lobe. Le nombre des lobes augmente avec l'âge et le testicule adulte pouvant être constitué de plusieurs lobes est qualifié de testicule multiple (Flament et al., 2009). Ces particularités de différenciation testiculaire qui continue durant la vie adulte ainsi que la reproduction saisonnière et la structure du testicule des amphibiens urodèles ne sont pas retrouvées chez les mammifères.

Chez les mammifères, suite à la différenciation des cellules de Sertoli, deux compartiments testiculaires se forment : les cordons séminifères, qui contiennent les CGs et les cellules de Sertoli entourées par les cellules myoïdes péritubulaires ; la région interstitielle qui comprend les précurseurs des cellules de Leydig, et le tissu vasculaire. Les CGs entrent en arrêt mitotique pendant la vie fœtale et l'entrée en méiose ne commence qu'à la puberté. Ce processus continue jusqu'à la fin de la vie car il persiste des spermatogonies souches. Comme chez le Pleurodèle, toutes les cellules germinales n'entrent donc pas en méiose

simultanément. Cependant, les cellules qui n'entrent pas en méiose ne sont pas localisées à un pôle de la gonade.

Lors de la différenciation ovarienne des urodèles, les CGs occupent le cortex où elles prolifèreront et s'associeront avec des cellules somatiques pour former des follicules (Hayes, 1998). Par contre, le centre de la gonade, la médulla, régresse et se creuse d'une cavité conférant à l'ovaire le qualificatif d'ovisac (figure 40). L'ovogenèse comprend plusieurs étapes : 1) multiplication des ovogonies, 2) entrée en méiose et arrêt au stade diplotène de prophase I, 3) croissance des ovocytes I avant la vitellogenèse, 4) croissance pendant la vitellogenèse et 5) maturation. L'ovogenèse des amphibiens est caractérisée par un stade diplotène très long. Les ovocytes accumuleront des réserves dérivées de la vitellogénine produite par les cellules hépatiques. Ces réserves serviront au développement des embryons. La maturation ovocytaire chez les amphibiens est généralement suivie de la ponte des ovocytes mûrs (arrêtés en métaphase II), et la fécondation détermine l'achèvement du processus méiotique.

Chez *Pleurodeles waltl*, nos résultats montrent que les CGs femelles entrent en méiose au cours de vie larvaire, au stade 54+45 jours. L'entrée en méiose a aussi été étudiée au cours de l'année chez des femelles adultes (18 mois). Nous avons constaté, en mesurant l'expression de *Dmc1*, une reprise de cette expression en dehors de la saison de reproduction (mai à septembre). Ceci suggère que la femelle renouvelle son stock d'ovocytes pendant l'été pour la prochaine saison de reproduction. L'ovogenèse est un processus continu chez les amphibiens, et le stock germinal se renouvelle chez l'animal adulte par multiplication des ovogonies. En effet, des cellules germinales souches échappant à la méiose sont présentes dans l'ovaire adulte. Nous ne connaissons pas le mécanisme qui permet à certaines CGs d'échapper à la méiose mais nous pouvons poser trois hypothèses : ces cellules sont peut être localisées à un endroit de l'ovaire qui ne reçoit pas d'AcR ; des facteurs paracrines produits par les cellules voisines peuvent empêcher leur entrée en méiose ; ou alors, ceci peut être dû à l'absence de récepteurs à l'AcR (RARs) dans ces cellules.

Cette particularité des amphibiens reste une question en débat chez les mammifères, notamment en raison de l'étude de Johnson et ses collègues qui ont détecté des cellules germinales pré-méiotiques dans les ovaires des souris âgées de 8 mois (Johnson et al., 2004). Les auteurs suggèrent l'existence de cellules germinales souches qui maintiennent l'ovogenèse dans les ovaires adultes. Pour vérifier cette hypothèse des femelles adultes sont

injectées avec la doxorubicine afin d'éliminer les ovocytes. Deux mois après le traitement, autant de follicules primordiaux ont été observés chez les souris témoins que chez les traitées. Les auteurs suggèrent la possibilité d'une source de CGs extra-gonadique qui pourrait être la moelle osseuse notamment en raison de l'expression des marqueurs germinaux tels que *Vasa*, *Stella*, *Fragilis* et *Oct3/4*. Les expériences de transplantation de moelle osseuse ou de cellules sanguines circulatoires (périphériques) dans des femelles adultes stérilisées préalablement par cyclophosphamide et busulfan ont confirmé la capacité de ces cellules à générer des ovocytes chez les femelles adultes (Johnson et al., 2005). Néanmoins, un an plus tard ces expériences de transplantations ont été vérifiées par Eggan et son équipe. Les résultats sont contradictoires de ceux de Johnson et al. (2005). De plus, Eggan et al. ont généré des souris parabiotiques à circulation sanguine commune. Chaque paire de souris parabiontes était composée d'une souris sauvage et d'une autre transgénique marquée à la GFP. Après huit mois d'association parabiotique aucun ovocyte marqué à la GFP n'est observé dans l'ovaire de la souris sauvage et vice versa. Ces observations indiquent que les cellules sanguines sont capables d'entrer dans l'ovaire mais pas de générer des ovocytes (Eggan et al., 2006). Récemment l'équipe de Zou a réussi à isoler et purifier des cellules germinales souches à partir d'une souris femelle néonatale et adulte. Ces cellules sont maintenues en culture pour plusieurs mois. Lorsqu'elles sont transplantées dans une souris stérilisée préalablement avec cyclophosphamide et busulfan, ces cellules subissent une ovogenèse normale et permettent la production d'ovocytes (Zou et al., 2009). L'isolement et la purification de cellules germinales souches à partir de l'ovaire néonatal et adulte de souris représente une autre preuve de l'existence de ces cellules dans l'ovaire adulte des mammifères (Tilly et Telfer, 2009).

5.2. L'AcR est-il impliqué dans l'entrée en méiose chez le pleurodèle ?

Chez le pleurodèle, nos travaux ont montré que l'AcR est capable de déclencher l'entrée en méiose des CGs précocement *in vitro* chez les mâles et les femelles. Ces observations sont cohérentes avec les travaux de Bowles et al. (2006) et Koubova et al. (2006) réalisés chez la souris.

L'entrée en méiose chez le pleurodèle a été détectée par l'expression d'un marqueur de la méiose *PwDmc1* représentant le seul marqueur de la méiose cloné chez cette espèce.

Pour étudier le métabolisme de l'AcR et plus précisément l'expression et la localisation des enzymes PwRALDH2 et PwCYP26B1 qui synthétisent et dégradent l'AcR

respectivement, nous avons cherché à développer des anticorps dirigés contre ces enzymes. Pour cela, des peptides recombinants ont été produits et ont servi à immuniser des lapins. L'analyse par western blot montre que PwRALDH2 est exprimée dans les complexes gonades-mésonéphros (GM) des deux sexes au même niveau aux stades 54 et 54+60 jours (qui représentent respectivement les stades antérieurs et postérieurs à l'entrée en méiose chez la femelle). Durant ces stades, nous avons étudié des complexes GM car les gonades sont très petites et leur séparation du mésonéphros ne donne pas assez de matériel pour étudier l'expression protéique.

Après la métamorphose (stade 56), les gonades sont séparées du mésonéphros et l'analyse pas immunofluorescence montre que PwRALDH2 est exprimée dans le mésonéphros et également dans les gonades (cellules somatiques et cellules germinales) des deux sexes. Chez la souris, les travaux de Bowles et al. montrent que *Raldh2* est détecté dans le mésonéphros chez les deux sexes à partir de 10,5 jpc mais aucune expression n'a été détectée dans les gonades (Bowles et al., 2006). Par contre, chez le poulet, l'expression de l'ARN messager de *Raldh2* a été détectée par hybridation *in situ* dans les gonades (cellules somatiques) des deux sexes tandis que son expression dans le mésonéphros n'était pas significative (Smith et al., 2008). Les types cellulaires participant à la synthèse d'AcR dans les gonades et le mésonephros semblent donc varier selon l'espèce considérée.

Chez le pleurodèle, l'analyse par western blot de l'expression de PwCYP26B1 montre une expression dans les complexes GM au stade 54 de façon similaire chez les deux sexes. Son expression diminue chez la femelle au stade 54+60 jours pendant lequel les CGs sont en méiose. Ceci suggère une accumulation d'AcR qui va induire l'entrée en méiose chez la femelle. Au stade 56 (deux mois avant l'entrée en méiose chez le mâle), l'expression de PwCYP26B1 n'est pas détectée dans l'ovaire alors qu'une expression est détectée dans les CGs chez le mâle. Nos résultats sont cohérents avec les observations décrites chez la souris et le poulet. En effet, chez ces deux espèces, *Cyp26b1* est exprimé dans les gonades mâles et femelles jusqu'à la veille de l'entrée en méiose chez la femelle. Après l'entrée en méiose (13,5 jpc chez la souris et 15,5 jpc chez le poulet), l'expression de *Cyp26b1* devient spécifiquement mâle (Bowles et al., 2006 ; Smith et al., 2008).

Dans notre système de culture organotypique, nous avons cultivé des complexes GM ou des gonades de pleurodèle en présence d'AcR à 2 µM. Cette concentration d'AcR induit l'entrée en méiose précocement dans les deux sexes. Cette dose est proche de celles 0,7 µM et

1 µM utilisées respectivement par Koubova et al. (2006) et Bowles et al. (2006), et qui étaient capables d'induire la méiose précocement dans les gonades XY embryonnaires de souris. Cependant, une publication récente a montré que les concentrations d'AcR utilisées dans les anciens travaux pour induire la méiose chez la souris sont 25 à 50 fois plus élevées que les doses physiologiques (Kumar et al., 2011). Les auteurs utilisent des souris transgéniques RARE-lacZ dont l'expression de lacZ est placée sous le contrôle de la séquence RARE (Retinoic Acid Response Element). L'expression de lacZ a donc été utilisée comme indicateur de la présence d'AcR dans les tissus embryonnaires de souris. Ces travaux montrent que les complexes ovaires-mésonéphros cultivés en présence de doses physiologiques d'AcR (25-100 nM) étaient capables d'induire l'expression de lacZ contrairement à ceux cultivés sans AcR. L'absence d'expression de lacZ *in vivo* dans les gonades des souris transgéniques suggère que l'AcR synthétisé au niveau du mésonéphros n'est pas capable d'atteindre l'ovaire en quantité suffisante pour induire la signalisation de l'AcR dans ce tissu (Kumar et al., 2011).

Les travaux de Koubova et al. (2006) ont montré chez la souris que la signalisation de l'AcR est impliquée dans l'induction de l'expression du marqueur pré-méiotique *Stra8*. Ce dernier contient au niveau de sa région promotrice deux séquences RARE qui permettent la fixation des récepteurs à l'AcR (RARs) et son activation. Cependant les concentrations d'AcR utilisées pour induire l'expression de *Stra8* sont plus importantes que les doses physiologiques montrées par Kumar et al. (2011). Aux doses physiologiques, l'AcR n'est pas capable d'activer la transcription du gène *Stra8*. Dans ces conditions les auteurs concluent à une absence de régulation de *Stra8* par l'AcR. De plus, chez les souris invalidées pour le gène codant l'enzyme qui synthétise l'AcR (*Raldh2*$^{-/-}$), l'expression de *Stra8* a été détectée par hybridation *in situ* dans l'ovaire à 13,5 jpc. Ces observations représentent un autre élément confirmant que *Stra8* n'est pas un gène cible de l'AcR et que ce dernier n'est pas nécessaire pour induire la méiose *in vivo* (Kumar et al., 2011).

Finalement, Childs et al. (2011) ont étudié les relations entre la signalisation de l'AcR et l'entrée en méiose dans la gonade fœtale humaine. Pour ce faire, ils ont suivi l'expression des Raldh1, 2 et 3 des RXR et RAR ainsi que des marqueurs de différenciation des CGs dans des ovaires et des testicules fœtaux. Leurs résultats indiquent que la production d'AcR dans l'ovaire fœtal est importante pour l'entrée en méiose mais que des mécanismes indépendants de CYP26B1 sont mis en jeu pour bloquer ce processus dans le testicule fœtal (Childs et al., 2011).

L'ensemble de ces publications dont les données sont parfois contradictoires montre la complexité des mécanismes qui régulent l'entrée en méiose chez les vertebrés et souligne à la fois leur conservation et la variabilité entre espèces.

Chez les femelles métamorphosées de pleurodèle, nous avons montré que *Dmc1* n'est pas exprimé dans les CGs des complexes GM cultivés pendant deux jours en présence de Citral (inhibiteur de l'enzyme synthétisant l'AcR, RALDH). Ces observations suggèrent que l'AcR est impliqué dans l'induction de l'entrée en méiose des CGs. Néanmoins, Kumar et al. suggèrent que l'utilisation du Citral pourrait inhiber le métabolisme d'autres composés aldéhydiques de la famille des retinaldéhyde déshydrogénases et ainsi des fonctions autres que la synthèse de l'AcR (Kumar et al., 2011).

Wang et Tilly ont identifié une région régulatrice dans le promoteur de *Stra8* juste en amont des RAREs. Cette région lie un co-activateur nécessaire pour l'AcR afin d'activer la transcription de *Stra8*. Les auteurs ont également montré dans les CGs mâles embryonnaires que l'activation de la transcription de *Stra8* par l'AcR est réprimée par un mécanisme épigénétique impliquant une déacétylation des histones. L'inhibition de l'activité des histones déacétylases (HDAC) dans ces cellules par la trichostatin-A montre une activation précoce de l'expression de *Stra8*. De plus cette inhibition de HDAC n'affecte pas l'expression de *Cyp26b1* (Wang et Tilly, 2010).

Il serait intéressant de cloner le gène *Stra8* chez le pleurodèle afin d'étudier son expression au cours du développement ainsi que la régulation de cette expression par l'AcR. La production des tératomes expérimentaux chez le pleurodèle par implantation d'embryons de la même espèce dans la cavité générale de pleurodèles métamorphosés à été décrite par Houillon en (1988). Nous avons produit des tératomes en suivant le protocole de Houillon. Ces tératomes récupérés à partir des deux individus mâles ont été mis en culture afin de dériver *in vitro* des CGs immortalisées. Cependant, après quelques passages les cellules sont mortes.

Par ailleurs, l'orthologue de *Nanog* de souris a été cloné chez l'urodèle Axolotl (*AxNanog*). Ce gène permet la prolifération des cellules souches embryonnaires *in vitro* (Dixon et al., 2010). Nous proposons donc de générer des embryons transgéniques de pleurodèle qui surexpriment le gène *AxNanog* de façon stable en utilisant le protocole de Kroll et Amaya réalisé chez *Xenopus laevis* (Kroll et Amaya, 1996). Cette technique est basée sur l'introduction d'un plasmide contenant le gène *AxNanog* dans les noyaux de

spermatozoïdes de pleurodèle. Ces noyaux de spermatozoïdes sont ensuite injectés dans l'œuf non-fécondé de pleurodèle (fécondation *in vitro*). Nous pourrions alors peut-être prélever et mettre en culture des CGs souches de pleurodèle à partir des embryons transgéniques. Ceci permettrait d'étudier *in vitro* les voies de signalisation et les gènes cibles de l'AcR comme *Stra8*.

Si un modèle de culture de CGs immortalisées *in vitro* chez le pleurodèle n'était pas disponible afin d'étudier le rôle d'un certain nombre de gènes ; l'approche par ARN interférence *in vivo* pourrait être applicable. Cette technique basée sur l'utilisation d'ARN replié en épingle à cheveux (shRNA), a été effectuée pour le gène de l'aromatase au laboratoire. En effet, un ARN double brin ciblant ce gène a été introduit par électroporation dans des embryons de pleurodèle au stade gastrula, neurula et bourgeon caudal. Cette technique pourrait être aussi envisagée pour les gènes *Cyp26b1* et *Raldh2* afin d'étudier le rôle de ces gènes dans la modulation de l'expression de *Stra8*.

5.3. Existe-t-il des facteurs inhibant la méiose dans le testicule fœtal de pleurodèle ?

Chez le pleurodèle, le traitement par R115866 (inhibiteur de CYP26B1) des complexes GM prélevés au stade 54 chez le mâle induit une entrée en méiose précoce des CGs. Cela suggère que la dégradation de l'AcR par PwCYP26B1 pourrait être responsable du retard d'entrée en méiose chez le mâle. Ces résultats sont en accord avec les observations de Koubova et al. (2006). CYP26B1 est considéré comme un facteur inhibiteur de la méiose spécifique du mâle (Bowles et Koopman, 2007). Les travaux de Guerquin et al. ont montré que dans les gonades XX (11,5 jpc) co-cultivées avec des testicules fœtaux, les CGs femelles n'entrent pas en méiose. Ceci indique que le testicule fœtal bloque l'entrée en méiose des CGs de l'ovaire et que CYP26B1 pourrait être à l'origine de cette inhibition. Cependant l'expression de CYP26B1 dans le testicule n'est pas corrélée avec le pourcentage de CGs méiotiques de l'ovaire. De plus, en présence de l'AcR ou de kétoconazole (inhibiteur de cytochrome P450) certaines CGs échappent à la méiose. Les auteurs suggèrent que le testicule fœtal sécrète en plus de CYP26B1 d'autres facteurs dits MIF pour « meiotic inhibiting factors » qui inhibent la méiose des CGs dans le testicule fœtal. Ces facteurs sont sécrétés par des cellules somatiques du testicule (cellules de Sertoli et cellules interstitielles) (Guerquin et al., 2010). Les auteurs suggèrent également que le testicule fœtal sécrète des facteurs dits

MAF pour « mitotic arrest factors ». Ces facteurs comme leur nom l'indique sont impliqués dans l'induction de l'arrêt mitotique des CGs mâles.

L'hormone anti müllérienne (AMH) qui induit la régression des canaux de Müller chez le mâle joue un rôle dans le développement gonadique des deux sexes et notamment dans la différenciation des CGs. Chez le poisson medaka (*Oryzia latipes*), une mutation dans le gène codant le récepteur de l'hormone anti müllérienne de type II (*AmhrII*), inhibant la fixation de l'AMH sur son récepteur, conduit à des gonades hypertrophées dans les deux sexes. Cette hypertrophie résulte de la prolifération excessive des CGs. Celles-ci entrent précocement en méiose chez les mâles (Morinaga et al., 2007). Chez la souris transgénique dont le gène codant l'AMH est surexprimé, la progression des CGs dans la prophase méiotique est bloquée dans l'ovaire fœtal. Ceci conduit à la dégénérescence des CGs et à la régression de l'ovaire (Josso et al., 1998). Parallèlement, chez le pleurodèle, les résultats d'expériences de parabioses (association des larves ZZ/ZW) montrent bien l'action d'hormones circulantes sur le développement gonadique. En effet, chez ces parabioses ZZ/ZW, la différenciation testiculaire n'est pas affectée chez les ZZ alors que le développement ovarien des ZW est altéré. L'expression de *PwDmc1* est absente dans les CGs des gonades ZW au stade 54+60 jours et ces cellules vont dégénérer par la suite. Les auteurs suggèrent que l'AMH produite par les gonades ZZ pourrait être à l'origine du blocage de l'entrée en méiose des CGs et de l'altération du développement ovarien des ZW (Dumond et al., 2008b). Ces observations nous ont permis de faire l'hypothèse que l'AMH pourrait être un facteur inhibiteur de la méiose chez le pleurodèle ZZ. Il est à noter que malgré la présence de l'AMH chez le pleurodèle (le gène codant l'AMH a été cloné dans notre laboratoire), le canal de Müller persiste chez les mâles. L'étude de l'expression de l'AMH au cours du développement du pleurodèle ainsi que sa localisation gonadique permettrait de déterminer son rôle dans la différenciation testiculaire. Cependant, le problème majeur chez notre modèle est le manque d'anticorps disponibles dans le commerce ce qui ne nous a pas permis de localiser les deux récepteurs de l'AMH. Il serait intéressant également de cloner et d'étudier l'expression de ces récepteurs. Nous pourrions alors étudier l'effet de l'AMH sur la prolifération des CGs chez le pleurodèle dans une culture organotypique.

ANNEXE

PARTIE I

ARTICLE DE REVUE

Les travaux réalisés au laboratoire sur la différenciation sexuelle du modèle *Pleurodeles waltl* ont fait l'objet d'un article de revue dont une partie des données est détaillée dans le chapitre précedent.

Sexual development of the urodele amphibian Pleurodeles waltl.
Dumond, H., Kuntz, S., Chesnel, A., Ko, C.-I., Wallacides, A., Chardard, D., et Flament, S. *Sexual Development*. (2008). 2, 104 -114.

Résumé

Pleurodeles waltl est un amphibien urodèle présentant un déterminisme sexuel de type ZZ/ZW où les femelles sont hétérogamétiques. La différenciation du sexe chez le pleurodèle peut être modifiée par des facteurs environnementaux comme la température d'élevage conduisant à une inversion sexuelle des individus femelles en mâles. Le traitement par des hormones stéroïdes peut également inverser le sexe indiquant un rôle majeur de ces hormones dans le processus de différenciation chez le pleurodèle. Une augmentation de l'expression et de l'activité d'aromatase a lieu juste avant la différenciation ovarienne. Les inhibiteurs d'aromatase sont capables de masculiniser des larves génétiquement femelles (ZW). Les œstrogènes induisent une inversion des individus mâles en femelles tandis que l'inverse est induit par un androgène non aromatisable. Une augmentation de l'expression du récepteur alpha des œstrogènes (ERα) et du récepteur nucléaire SF1 est observée après l'augmentation de l'activité aromatase chez la femelle. Enfin, l'effet des stéroïdes endogènes sur le développement gonadique du pleurodèle a été étudié en réalisant des parabioses embryonnaires chez ce modèle.

Review Article

Sexual Development

Sex Dev 2008;2:104–114
DOI: 10.1159/000129695

Received: February 25, 2008
Accepted: March 27, 2008

Sexual Development of the Urodele Amphibian *Pleurodeles waltl*

H. Dumond S. Kuntz A. Chesnel C.-I. Ko A. Wallacides D. Chardard S. Flament

EA 3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Nancy-Université, Nancy, France

Key Words
Amphibian · Germ cells · Parabiosis · Sex differentiation · Steroid hormones · Urodele

Abstract
Pleurodeles waltl is a urodele amphibian that displays a ZZ/ZW genetic mode of sex determination involving a putative W-borne dominant determinant. This determining pathway can be environmentally inhibited since heat treated ZW larvae undergo a functional female to male sex reversal. Moreover, both genetic sexes can be reversed by treatment of larvae with steroid hormones suggesting they are the major players in the differentiation process. Indeed we demonstrated that i) aromatase expression and activity increase just before ovarian differentiation, ii) aromatase inhibitors induce a female to male sex reversal, iii) estrogens induce male to female sex reversal whereas the opposite is obtained with non-aromatizable androgens, iv) steroidogenic factor 1 and estrogen receptor alpha both display a female-enriched expression following the increase in aromatase activity. The role of endogenous hormones was investigated in a parabiosis model. Surprisingly, in ZW/ZZ associations, the ZW gonad could not differentiate suggesting that the ZZ parabiont produces an inhibiting factor, prior to ovarian differentiation. The role of AMH in this process is discussed, keeping in mind that Müllerian ducts are maintained in males. The development of antibodies and new molecular tools in the near future should help us to better understand the sexual development of this vertebrate.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Pleurodeles waltl, the Iberian ribbed newt, is a member of the Salamandridae family. This urodele amphibian is found in Portugal, Spain and Northwest Africa. The species was introduced as an experimental model in different European laboratories at the beginning of the 20th century, to study limb regeneration, embryo development and sex differentiation. Embryos develop from eggs laid in water, protected by the vitelline envelope and distinct jelly layers. After hatching, they become larvae that possess gills and live underwater until they metamorphose into air breathing forms possessing lungs (fig. 1). Sexual maturity is reached at 1.5 years. The first studies about sex differentiation were performed by Louis Gallien in Paris in 1950. In the present article, we review the findings about sex determination/differentiation of *Pleurodeles waltl*, most of them obtained in our laboratory in Nancy, France. First we describe sex determination and germ cell specification. Then we focus on the key role of steroids in sex differentiation and discuss the potential involvement of other hormones based on parabiosis experiments.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel
1661–5425/08/0022–0104$24.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/sxd

Stéphane Flament, Nancy-Université, Faculté des Sciences
EA3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement
Boulevard des Aiguillettes, BP 239, F–54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex (France)
Tel. +33 (0)3 83 68 42 52, Fax +33 (0)3 83 68 41 96
E-Mail stephane.flament@scbiol.uhp-nancy.fr

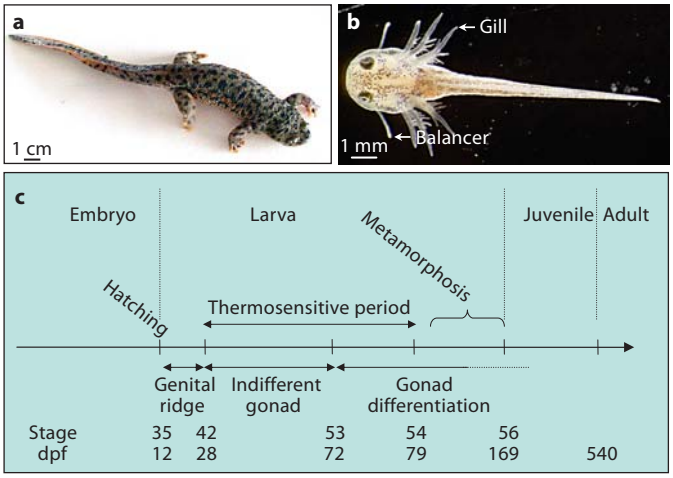


Fig. 1. Development of *Pleurodeles waltl*. **a** A three-year-old adult female. Gills have disappeared and breathing organs consist of lungs. **b** Larva at stage 37. The breathing organs consist of three pairs of external gills. Limb development is not yet completed and the balancer is present. **c** Schematic representation showing the main developmental steps. The relationship between developmental stage and age (number of days post fertilization = dpf) is indicated. Three periods of gonad formation are indicated: genital ridge, indifferent gonad and gonad differentiation. The thermosensitive period is the developmental window during which genetically female larvae (ZW) have to be reared at 32°C to obtain sex reversal.

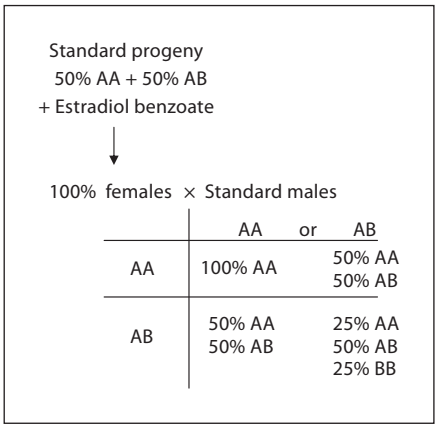


Fig. 2. Demonstration of the homogametic genotype of *Pleurodeles* males. AA homogametic sex, AB heterogametic sex. All-male progenies can be obtained only in case of male homogametic sex.

Sex Determination

Pleurodeles waltl is a gonochoristic species with genetic sex determination: males are determined by the monogametic ZZ genotype while females display a heterogametic ZW genotype. The control of sex determination by a ZZ/ZW system was deduced from estrogen-induced sex reversal experiments [Gallien, 1951, 1954]. Indeed, when standard larvae were treated with estradiol benzoate, they differentiated as females which when mated with standard males, led in 50% of the cases to all-male progenies (fig. 2). The W-borne dominant character of female sex was evidenced by the analysis of the tetraploid progeny obtained from crosses between diploid males and triploid females (obtained by fertilization after a heat shock performed during meiosis 2 inhibiting second polar body extrusion) [Beetschen, 1967]. The lack of males was interpreted by Beetschen as a consequence of the ZWW or ZZW triploid genotype of the oocytes while spermatozoa are always of the Z type. Tetraploid larvae could also be obtained from fertilized diploid eggs after heat-treatment performed during the first-segmentation stage. As expected, a 1/1 sex ratio was observed with 50% ZZZZ/50% ZZWW genotype [reviewed by Jaylet, 1972]. Although in *Pleurodeles*, sex chromosomes could not be identified in conventional karyotypes performed on mitotic chromosomes, microscopic observation of lampbrush chromosomes from prophase I-arrested oocytes pointed out a heteromorphism on chromosome 4 (i.e. sex chromosome pair) [Lacroix 1968a, b]. Together, these results demonstrated that (female) sex is determined by a dominant W chromosome in the *Pleurodeles waltl* species.

Further, biochemical investigations [Ferrier et al., 1980] allowed sexing of *Pleurodeles waltl* larvae before gonadal sex determination. Indeed, two electrophoretically separable valyl-leucine specific endopeptidases were found to be encoded by two distinct genes localized on chromosome Z (peptidase-1 A) and chromosome W (peptidase-1 B/β). This feature was of great interest in order to analyse the effect of heat treatment on gonadal sex differentiation and sex reversal [Dournon and Houillon, 1984].

Indeed, genetic sex determination in *Pleurodeles waltl* can be counteracted by temperature [Houillon and Dournon, 1978]. For maximal efficiency, temperature should be maintained at 32°C and heat treatment should be performed from stage 42 to stage 54, a developmental window defined as the thermosensitive period (TSP) (fig. 1) [Dournon and Houillon, 1984]. In this case, standard 50% ZZ/50% ZW progenies develop as 100% phenotypically male larvae [Dournon and Houillon, 1984]. This heat treatment was hypothesized to specifically repress W-dependent determination since only ZW larvae

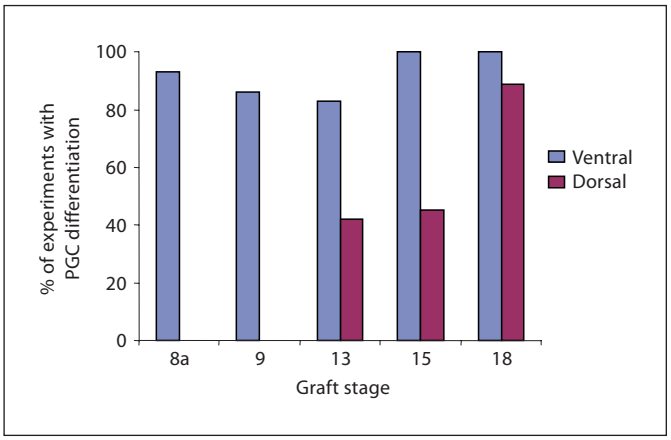


Fig. 3. Inhibition of germ cell specification in graft experiments. Mesodermal explant extirpated at successive stages of development, from young gastrula to mid-neurula (stages 8a, 9, 13, 15 and 18) were grafted in the tail-bud ventral or dorsal region. In the larva, the analysis of the prestations formed by the graft according to its age and its location on the host was made in serial sections. Primordial germ cells differentiated essentially in ventral location. The inhibiting effect of dorsal location concerning germ cell differentiation was maximum at the beginning of gastrulation, then decreased and finally disappeared at the onset of neurulation [modified from Capuron and Maufroid, 1981].

are sex-reversed into phenotypic males [Dorazi et al., 1995]. ZW sex-reversed larvae obtained by heat treatment appeared to differentiate fertile gonads: they could be mated with standard females in order to obtain a particular progeny containing 25% WW females. This feature shows that the sex of the gonadal soma is a major factor involved in the germ cell sexual differentiation that could be considered as non-autonomous. Practically, a WW female is of great interest since, when mated with a standard ZZ male, it allows to obtain a 100% ZW female offspring.

Germ Cell Specification

In *Pleurodeles waltl* as in other urodele amphibians, the segregation of germ cell lineage among somatic cells occurs through cell-cell interactions like in mammals [Maufroid and Capuron, 1985; Hayashi et al., 2007]. In contrast to this epigenetic process, in anuran amphibians such as *Xenopus*, germ cells are specified through preformation. In this case, germ cells can easily be identified very early in embryogenesis, and their specification results from the localization in the egg of maternally inherited determinants [Hayes, 1998].

The segregation of germ cell lineage occurs relatively late in embryonic development of *Pleurodeles waltl* [Capuron and Maufroid, 1981]. The time, the site of origin and the nature of the signals involved have been a controversial issue for several decades. In the seventies, Maufroid and Capuron [1973] cultured the ventral or ventro-lateral parts of the marginal zone from a blastula into the blastocoele of a young gastrula and demonstrated that primordial germ cell (PGC) precursors are located in the presumptive mesoderm. Since the mesodermal origin of PGC precursors has also been described in two *Triturus* species [Nieuwkoop, 1947] and in *Ambystoma* [Smith, 1964], it seems to be a common feature of urodele amphibians.

When the ectoderm and the endoderm of young gastrulae were associated and cultured in vitro, dorsal endoderm mainly induces notochord, somites and pronephric tubules while ventral endoderm promotes pronephric tubules, mesenchyme and PGC differentiation [Maufroid and Capuron 1977a, b]. Therefore, PGCs arise from totipotent ectodermal cells induced by an unknown signal from ventral endoderm. The results also suggested an inhibitory role of the chordomesoderm on PGC specification [Capuron and Maufroid, 1981]. In mammals, PGCs arise from the proximal epiblast through Bone Morphogenetic Protein (BMP) inductive signals from the extraembryonic ectoderm and visceral endoderm [Matsui and Okamura, 2005]. Since we now know that differentiating notochord secretes several BMP antagonists (chordin, noggin, follistatin), one can hypothesize that BMP-dependent PGC specification could be conserved between urodeles and mammals.

In order to determine the stage of germline segregation, ventral endoderm from different stages was associated with ectoderm [Maufroid and Capuron, 1977b]. The inductive capability on PGC formation was maximal at the beginning of gastrulation (stage 8a, 95%), then decreased progressively (stage 9, 44%; stage 10, 9.33%) and finally stopped at neurulation (stage 13). Moreover, grafts of mesodermal explants extirpated from young gastrula to mid neurula (stages 8a, 9, 13, 15 and 18) on dorsal or ventral region from tailbud embryos (stage 22) showed that inhibition of PGC formation by dorsal structures of host embryos disappears from stage 13 [Capuron and Maufroid, 1981] (fig. 3).

This suggests that PGCs arise from a pool of somatic cells from stage 8a (probably through BMP signaling) but also indicates that germline fate is definitely specified at stage 13.

Recently, isolation of the germline specific molecular marker VASA in *Ambystoma mexicanum* [Bachvarova et al., 2004] did not allow the identification of PGC precursors at the time of their specification since maternal VASA transcript accumulates in the oocyte and persists until hatching. Similar results were obtained in *Pleurodeles waltl*, in which zygotic expression of VASA ortholog was detected from stage 33 (our unpublished results). Therefore, the expression of other molecular markers, namely those of pluripotency, remains to be analyzed in the course of *P. waltl* development to specify the stage and the location of germ cell specification.

Sex Differentiation

The gonads originate from an out-pocket of cells localized on the ventral area of the anterior moiety of the mesonephros. As described above, PGCs originate from an extragonadal region, migrate to colonize the somatopleure and constitute a genital ridge. At stage 35, they are located in the posterior region of the larvae near the Wolffian ducts and close to the future cloaca [Dournon et al., 1989]. The migration takes place between stage 35 and 41 and the undifferentiated gonad is observed from stage 42 to stage 53. At this stage, gonia hang down into the coelomic cavity together with some somatic cells from the genital ridge. At stage 45, more somatic cells constitute a pedicle from which gonia are suspended. At stage 50, the gonadal anlage separates into two parts: the fat body devoid of gonia and the gonad itself. At the periphery of the undifferentiated gonad, the cortex is derived from the coelomic epithelium and contains gonia while in the central part, the medulla is derived from the mesonephros blastema and does not contain gonia.

Just before stage 53, the early histological differentiation of the gonadal sex occurs. In ZW larvae, oogonia stay in the cortex where they proliferate. At stage 54, these cells associate to somatic cells and constitute follicles. Most of the oogonia enter meiosis and this process is arrested at prophase I. The ovary differentiates as an ovisac since medulla regression leaves a cavity (fig. 4a). In ZZ larvae, at stage 53, germ cells migrate from the cortex towards the medulla where they mix with differentiating Sertoli cells in units named cysts that are themselves included in lobules (fig. 4b). The cortex devoid of germ cells becomes albuginea, the testis envelope. So, in *Pleurodeles*, stage 53 is the first stage at which the sex of the gonad may be ascertained by histological examination.

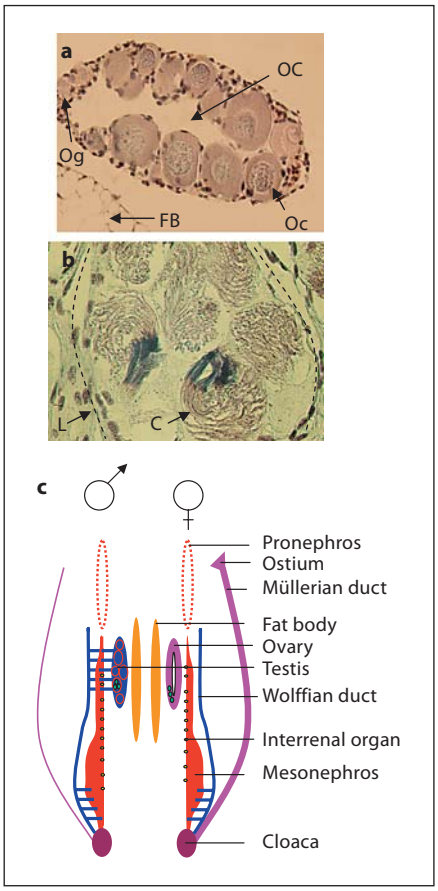


Fig. 4. The genital apparatus of *Pleurodeles waltl*. **a** Histological section of an ovary after metamorphosis. Young vitellogenic oocytes (Oc) arrested in the prophase of the first division of meiosis are located in the cortex and surrounded by follicle cells and theca but oogonia (Og) that have not entered meiosis are still present. In the centre of the ovary, the ovarian cavity (OC) developed after medulla regression is easily observed. A small part of the fat body (FB) is also present. **b** Histological section of the testis of a 1.5-year-old male: spermatogenesis occurs synchronously for all the germ cells in a cyst (C). The section indicates six cysts included in a lobule (L; dotted line). **c** Schematic representation of gonads and tractus organization in both male and female at adulthood. The medulla of the testis contains lobules (red circles) including cysts (green circle) with germ cells. The ovary is an ovisac that contains follicles (green circles) located in the cortex.

The proliferation of germ cells has been studied in larvae [Dournon et al., 1989, 1990]. By mitotic index determination and germ cell counts, three periods have been distinguished: P0 during which there is no proliferation, P1 characterized by a moderate proliferation and P2 with a higher proliferation rate. In ZZ larvae, P0 ends after stage 41 whereas in ZW larvae, this period extends up to stage 45. Then P1 starts and in both ZZ and ZW larvae,

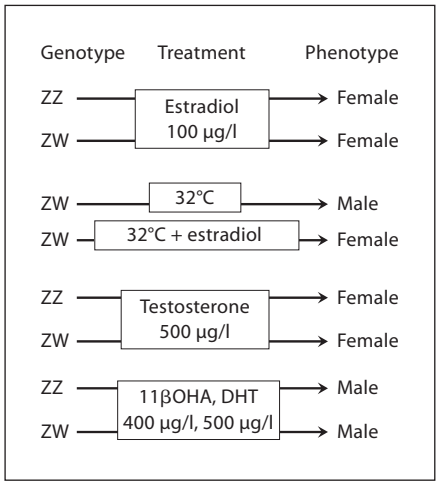


Fig. 5. Summary of the effects of treatments of *Pleurodeles waltl* larvae with steroids. The genotype was determined by peptidase 1 analysis. The phenotype was determined after metamorphosis by morphological examination and histology.

it is observed until stage 49–50. Since the P0 period is longer in ZW larvae, this leads to a lower number of germ cells at the end of the P1 period when compared to ZZ ones. After stage 50, the proliferation rate increases more quickly in ZW larvae than in ZZ. ZW larvae possess a higher number of germ cells than ZZ larvae up to stage 54 + 60 days at which meiosis entry occurs in ZW larvae [Dumond et al., 2008]. The effect of temperature on germ cell proliferation was also studied [Dournon et al., 1990]. There was no difference in the number of germ cells observed at stage 53 between ZZ larvae and heat-treated ZW larvae but the latter possessed a lower number of germ cells than control ZW individuals.

When compared to other vertebrates, differentiation is a slow process in this species: it occurs during larval life around metamorphosis [Kuntz et al., 2003a]. Some events also occur after metamorphosis especially in males: meiosis entry occurs in juvenile animals while old adults display multiple testes. This means that in each male gonad, several lobes develop successively during adult life. The formation of these lobes has been studied in detail in other amphibians like *Salamandra salamandra* [Joly, 1971] but not yet in *Pleurodeles waltl*.

Once differentiated, gonads will produce hormones that will influence tractus differentiation. In ZW larvae, Wolffian ducts will be maintained since they will be required for urine elimination (there is no metanephros and hence no secondary ureter) and Müllerian ducts will differentiate into oviducts (fig. 4c). In ZZ larvae, Wolffian ducts will differentiate as a uro-spermiduct whereas Müllerian ducts will be maintained without differentiation (fig. 4c). The persistence of Müllerian ducts in males can be demonstrated easily by estradiol treatment: it triggers oviduct differentiation, even when performed at adulthood [Tiffoche et al., 1993].

Estrogens

Steroids were the first identified molecular players in gonad differentiation in amphibians. A gynogenic effect of estradiol has been described in several species including *Pleurodeles waltl*: 100% of the larvae from standard offspring differentiated as females when reared in water supplemented with estradiol benzoate at a concentration of 600 µg/l [Gallien, 1950]. Nevertheless, these animals were sterile due to an inhibitory effect of high estrogen dosage on Müllerian duct development. Treatments with a lower dose (100 µg/l) produced fertile animals (fig. 5) and, as mentioned above, analysis of the offspring of these sex reversed individuals revealed that in *Pleurodeles waltl,* males were homogametic [Gallien, 1951]. Although a hormone-sensitive period has been defined from stage 51 to 56, we could obtain a complete sex reversal of ZZ larvae when estradiol treatment was performed between stages 42 and 54 (thermosensitive period) [Chardard et al., 2003]. This points the stages 52 to 54 as the critical developmental window of estradiol sensitivity. However, it is very conceivable that gonads retain potential to respond to estrogens after this stage (as described in other species). Besides, the masculinizing effect of temperature was inhibited when estradiol was added to the rearing water [Zaborski, 1986] (fig. 5). This suggests that estradiol synthesis is impaired in case of heat treatment.

Aromatase

In *Pleurodeles waltl*, as in other vertebrate models, gonads of young larvae are not big enough to allow steroid dosages but aromatase activity measurements are particularly suited. A low aromatase activity was detected in gonad-mesonephros-interrenal organ (GMI) complexes from stage 47. The activity started to increase in females from stage 52 and reached 500-fold the activity observed in males at metamorphosis [Chardard et al., 1995]. mRNA analyses were performed to determine if the changes in enzyme activity could be due to modifications of expression level. In situ hybridization (ISH) studies showed that

aromatase mRNAs were not present in the mesonephros [Kuntz et al., 2003b]. In the gonads at stage 54, ISH indicated a female-enriched expression that was not observed in heat-treated ZW larvae [Kuntz et al., 2003b]. Recently, a whole-mount ISH study performed at this stage confirmed the high difference between male and female aromatase expression [Ko et al., 2008]. In the same study, real-time PCR analyses showed a 4-fold difference in mRNA level at stage 54 and 50-fold at stage 54 + 30 days [Ko et al., 2008].

During female to male sex reversal upon heat treatment, aromatase activity and expression in ZW larvae are at levels similar to that observed in ZZ larvae [Chardard et al., 1995; Kuntz et al., 2003b]. In the same way, during male to female sex reversal upon estrogenic treatment, a raise of gonadal aromatase activity is observed, although delayed when compared to standard females [Kuntz et al., 2003a].

Some studies have focused on the potential role of the brain in initiating gonadal development in reptile embryos or environment-induced sex reversal in hermaphrodite fishes [For instance see Jeyasuria and Place, 1998; Piferrer and Blazquez, 2005]. In *Pleurodeles waltl,* cerebral aromatase expression or activity is neither sex specific nor temperature sensitive suggesting that estrogen production in the brain does not interfere with gonadal differentiation [Kuntz et al., 2004a].

The most important evidence of the involvement of estrogens in ovarian development was obtained by treatments with aromatase inhibitors. Indeed, ZW larvae treated with fadrozole differentiated into males at metamorphosis [Chardard and Dournon, 1999]. Aromatase activity dosage and histological analysis performed during the period of treatment showed that sex reversal was correlated with aromatase activity: some individuals escaped fadrozole effect showing an increase in aromatase activity and differentiated in females [Chardard and Dournon, 1999].

We can conclude that a high level of aromatase expression and activity is always correlated with ovarian differentiation so that analysis of aromatase regulation is essential in order to understand *Pleurodeles waltl* sex differentiation.

Steroidogenic Factor 1

The nuclear orphan receptor SF-1 is expressed in several tissues involved in reproduction and/or steroidogenesis, mainly in brain, testis, ovary and adrenal (interrenal organ in amphibians). Besides, as observed in several species, an SF-1 consensus binding site is conserved in the 5′-flanking region (GenBank accession number EU492904) of *Pleurodeles* aromatase encoding gene (unpublished). Hence we hypothesize that SF-1 could be involved in the transcriptional regulation of aromatase in *Pleurodeles waltl*.

A *Pleurodeles* SF-1 cDNA was cloned from adult testis [Kuntz et al., 2006]. The analysis of the deduced protein sequence suggested that SF-1 biological function could be conserved in this species. *Pleurodeles* SF-1 transcripts were detected in all adult steroidogenic tissues [Kuntz et al., 2006] as well as in spleen, as observed in *Rana rugosa* [Kawano et al., 1998], and in lung where aromatase activity is also present [Kuntz et al., 2004b].

In GMI, SF-1 mRNAs were detected as soon as stage 42 in ZZ and ZW larvae, as well as in ZW larvae reared at 32°C. This early presence of SF-1 mRNA in GMI could be correlated to its role in the first differentiation steps of the two primary steroidogenic organs: the gonads and interrenal organ as demonstrated in other species [Luo et al., 1994]. SF-1 expression was observed at all stages of TSP (stages 42–54) and appeared sex- and temperature-independent during this period. However, during TSP, whether SF-1 is expressed in gonads or mesonephros-interrenal organ or both in *P. waltl* is not known at that time. Besides, further investigations are required to determine if aromatase producing cells also express SF-1.

Surprisingly, after the beginning of ovary differentiation, semi-quantitative RT-PCR analyses showed a transient increase of the SF-1 transcript level in female GMI. The analyses performed between stages 54 and 56 revealed the expression of SF-1 in both gonads and MI compartments. Besides, in MI alone, a similar transient increase in SF-1 expression in ZW larvae was observed later than in the gonads.

From these observations, it was hypothesized that SF-1 gene transcription could be positively regulated by estrogens in *Pleurodeles waltl*. This hypothesis was supported by the fact that an up-regulation of SF-1 mRNA expression could be triggered by using an exogenous stimulation with estradiol benzoate [Kuntz et al., 2006]. However, whether estrogens had a direct or indirect effect on SF-1 expression is not known.

Whether SF-1 gene could be a target of temperature in *Pleurodeles waltl* in case of sex-reversal is another question we addressed. In gonads of ZW larvae reared at 32°C during TSP, SF-1 expression was lower than in control ZW larvae. According to the results of estrogen treatments, this could be due to the inhibition of both aroma-

tase expression and activity usually observed in case of long term heat treatment leading to sex-reversal [Chardard et al., 1995; Kuntz et al., 2003b; Ko et al., 2008]. However, when larvae are submitted to a 48-hour heat shock, the SF-1 mRNA level in gonads does not decrease. These results support the hypothesis of a regulation of SF-1 gene expression by the estrogen level rather than by a more direct effect of temperature.

ERα

Recently, we have isolated a full-length Estrogen Receptor (ER) cDNA wherein a deduced ORF encodes a 582 amino acid polypeptide [Ko et al., 2008]. Multiple alignments of protein sequences strongly suggest that we have cloned an ERα ortholog since we can observe a high degree of homology with ERα from other vertebrates (for instance 90.2% identity to Japanese giant salamander (urodele), 81.3% to *Xenopus laevis* (anuran), and 67% to mouse or human) [Ko et al., 2008 and references therein]. The highest percentage of identity is observed for the 'DNA binding domain' and the 'ligand binding domain'. A phylogeny study confirmed the similarity with the Japanese giant salamander ERα, and demonstrated that *pw*ERα was very different from ERβ of other vertebrates.

RT-PCR analyses revealed that ERα mRNAs were present in adult ovary and testis, fat body associated to gonads, liver, oviduct and to a lesser extent in spermiduct and intestine. These results are in agreement with i) the action of estrogens in female differentiation [Tiffoche et al., 1993; Kuntz et al., 2003b], ii) the estrogenic control of vitellogenesis [Wu et al., 2003; Lutz et al., 2005] and iii) the potential role of estrogens in spermatogenesis as demonstrated in the newt *Triturus marmoratus* [Arenas et al., 2001] and in mammals [Lambard and Carreau, 2005]. ERα transcripts were not detected in forebrain and lung [Kuntz et al., 2004a, b]. This could suggest the existence of an unknown ER isoform in *Pleurodeles waltl*.

ERα was also studied in the developing larvae. RT-PCR results indicate that ERα mRNA is present in both sexes early before gonad differentiation, from at least stage 48. At stage 54 + 30 days, whole mount ISH reveals a high level of ERα in gonad and fat body, and a lower level in MI while ERα mRNAs are not found in adult kidney. In contrast to this pattern, aromatase expression is strictly restricted to gonads [Kuntz et al., 2003b].

In gonads, at stages 54 and 54 + 15 days, there was no difference in ERα mRNA level between male and female larvae whereas differences in both aromatase expression and activity were already present [Kuntz et al., 2003b; Ko et al., 2008]. At stage 54 + 30 days, a sharp increase in ERα mRNAs was observed in female larvae (14.5-fold difference between males and females). Although ERα expression in mesonephros could mask subtle differences in gonads before stage 54 + 30 days, we assume that a high ERα expression is rather specific of a complete ovarian differentiation.

These results are in agreement with the fact that both genetic sexes can respond to estrogens and differentiate as females. They suggest that estrogens can regulate ERα expression. This hypothesis was supported by the finding of two consensus half-ERE adjacent with an AP1 putative binding site onto the 1449 bp 5′ flanking region of *P. waltl* ERα gene [Ko et al., 2008]. Such a situation is sufficient for estradiol-dependent promoter regulation [Klein-Hitpass et al., 1988; Corthesy et al., 1989; Ponglikitmongkol et al., 1990].

Finally, in the context of temperature induced sex reversal, real-time PCR analyses revealed that ERα expression in gonads of ZW larvae raised at 32°C was lower than in control ZW larvae, demonstrating an inhibitory effect of temperature on ERα expression. Although the female-enriched expression of gonadal ERα occurs after the onset of ovary differentiation, the temperature-sensitive feature of ERα expression could be important to obtain a complete sex reversal. Studies under steroid treatments together with analyses at the cellular and protein levels are now necessary to complete these results.

Androgens

Treatments of amphibians (or other species) with androgens have produced a great variety of results [reviewed by Hayes, 1998]. In amphibians, the effects of androgen treatments depend not only on the chemical structure of the androgen, but also on the dosage of the treatment. In *Pleurodeles waltl*, testosterone has an inhibitory effect on gonad development in male and female larvae: when treated by testosterone ZZ larvae show an inhibition of gonad development and then (sometimes much later) a female differentiation (fig. 5). This paradoxical effect was interpreted as a result of the aromatization of exogenous testosterone to estradiol. While treatments with non-aromatizable androgens tend to prove this, the kinetics of both sex reversal are very different. DHT and its derivatives have no effect on ZZ larvae differentiation but they exert a masculinizing effect on female larvae: after the treatment, at metamorphosis, gonads are disorganized

Table 1. Changes in germ cell number, aromatase activity and DMC1 expression in the gonads of different parabiont pairs during larval life [from Dumond et al., 2008]

Stage	GC number[a]			Aromatase activity[b]			DMC1		
	ZW/ZW	ZW/ZZ[c]	ZZ/ZZ	ZW/ZW	ZW/ZZ[c]	ZZ/ZZ	ZW/ZW	ZW/ZZ[c]	ZZ/ZZ
53	162 ± 25 (n = 4)	107 ± 16 (n = 3)	129 ± 13 (n = 4)	ND	ND	ND	–	–	–
54	379 ± 54 (n = 4)	238 ± 24 (n = 4)	118 ± 17 (n = 4)	18.4 ± 2.9 (n = 6)	12.8 ± 2.7 (n = 6)	3.6 ± 1.2 (n = 6)	–	–	–
54 + 60d	547 ± 109 (n = 4)	231 ± 41 (n = 3)	205 ± 48 (n = 4)	ND	ND	ND	+	–	–
54 + 90d	ND	ND	ND	831 ± 176 (n = 3)	9.2 ± 6 (n = 5)	8.5 ± 2.5 (n = 4)	+	–	–

[a] Number of germ cells per gonad, expressed as mean ± s.e.m. of several counts.
[b] Data indicate 10^{-15} mol/GMI complex/h as mean ± s.e.m. of several measurements.
[c] Among the ZW/ZZ pairs, only the data of the ZW gonad are shown.

and contain few germ cells but they are identified as testes [Chardard et al., 2003]. Another non-aromatizable androgen, 11βOHA proved to have a very efficient masculinizing effect (more than DHT), inducing sex reversal in 100% of ZW larvae. At metamorphosis, testes were smaller but undistinguishable from those of standard males [Chardard et al., 2003]. In both treatments with 5-reduced or 11-oxygenated androgens, sex reversed ZW larvae developed in adult fertile neomales (fig. 5). However, in amphibians, we have a poor knowledge of i) the types of androgen that are produced by the differentiating gonad and ii) the metabolic pathways. We have now to determine if androgen-induced sex reversal is obtained via binding to androgen receptor or via interfering with estrogenic pathway (leading to the inhibition of ovarian differentiation). Until now, no study has been published about androgen receptors in *Pleurodeles waltl*.

Endogenous Hormones

Although many experimental data clearly demonstrate the effect of exogenous steroids on gonad differentiation, we have a poor knowledge of the natural steroids produced by *Pleurodeles* larvae during sex differentiation, of their concentrations as well as of the kinetics of their synthesis. In order to experimentally study the effects that hormones from one sex can exert on the other one, male/female combinations can be performed.

Recently, we have studied parabioses, a model in which two embryos are surgically associated and then develop together with a connection between their circulating system [Dumond et al., 2008]. This association is performed at the tailbud stage (stage 22), from embryos that are manually dejellied and whose vitelline membrane is removed. In an operating dish filled up with Holtfreter's medium, an area of ectoderm and subjacent mesoderm just posterior to the gill bulge is removed from two embryos. These embryos are gently pressed together with modeling clay during several hours to allow the healing of tissues. Animals are then reared at ambient temperature (20 ± 2°C). The genotypic sex of each parabiont (ZZ male or ZW female) is determined before gonad differentiation (stage 50) from the analysis of the sex chromosome borne marker peptidase-1 [Ferrier et al., 1980]. Then studies are performed at different stages of gonad differentiation.

Our study confirmed the inhibition of the ZW gonad development previously reported in other cases of ZZ/ZW associations: graft of the abdominal half of a donor embryo onto the flank of a receptor embryo of the other sex as well as in chimera with abdomen in duplicate [Collenot et al., 1987]. In parabioses, the inhibition of ZW gonad development in ZZ/ZW associations is neither the result of a defect in germ cell migration towards the genital ridge nor of an abnormal proliferation of germ cells in the early gonad since at stage 53, counting of germ cells as well as the expression profile of VASA mRNA showed

the presence of similar numbers of germ cells at this stage in the ZZ and ZW gonads of either homosex or ZZ/ZW associations (table 1) [Dumond et al., 2008].

Germ cell alterations occur later. From stage 54 to stage 54 + 60 days, ZW gonads from heterosex associations do not show germ cell proliferation in contrast to those from ZW/ZW associations (table 1). Besides, these cells do not enter meiosis as demonstrated by the absence of DMC1 expression and the histological data (absence of chromatin condensation and low circularity index) (table 1). At adulthood, germ cells seem to have disappeared in the inhibited ZW gonad of ZZ/ZW associations as demonstrated by the absence of VASA transcript and the histological examination. So, germ cells seem to be lost mainly during the period of metamorphosis. Whether a failure in meiosis entry causes germ cells to die or to dedifferentiate during metamorphosis remains to be determined.

We also observed somatic cell alterations. In ZZ/ZW parabioses, the somatic compartment of the ZW gonad clearly remains undifferentiated. Indeed, during metamorphosis, the level of gonadal aromatase activity was very low (table 1). Moreover, in the inhibited ZW gonad in adult ZZ/ZW parabionts, DMRT1 mRNA expression was not detected whereas it was expressed in ZZ gonads. DMRT1 can be expressed in both germ cells and somatic cells, as described in mammals for instance [Pask et al., 2003]. So, it might be interesting to determine in our model if the lack of DMRT1 expression in the inhibited ZW gonads really reflects a lack of masculinization or if it is due to the loss of germ cells which could be required for DMRT1 expression in the somatic compartment.

Conclusion

At the moment, steroids remain the major players of the pattern leading to sex differentiation. However, we have to increase our knowledge about endogenous hormones. This is clearly illustrated from our experiments using parabiosis: the reason for the inhibition of gonad development in ZW parabionts associated to ZZ partners is unknown. A substance produced by the ZZ individual probably acts on the ZW parabiont via the interconnected circulatory systems. The ZZ gonad is very likely the source for this compound since orthotopic grafts of embryonic ZZ gonads into the abdominal cavity of ZW embryos gave similar results [Gallien, 1973]. Androgens cannot explain by themselves this result since treatments of ZW *Pleurodeles* larvae with non-aromatizable androgens lead sometimes to the inhibition of ZW gonad development associated to a reduction in the number of germ cells but most often, these treatments lead to functional sex reversal [Chardard et al., 2003].

Is there anti-Müllerian hormone (AMH) synthesis in the testis of the ZZ partner? AMH is involved in the freemartin effect in mammals [Capel and Coveney, 2004]. Indeed, AMH not only triggers Müllerian ducts regression but also plays a part in gonad differentiation [Ross et al., 2003]. In rodents, AMH blocks meiosis in fetal ovaries, leading to loss of germ cells and fibrous degeneration, and inhibits the transcription of aromatase, as observed for the ZW parabionts from ZZ/ZW associations [Vigier et al., 1989; Josso et al., 1998; Dumond et al., 2008]. Besides, Müllerian ducts do not disappear during sex differentiation in ZZ individuals, and the role of AMH in *Pleurodeles waltl* has still to be determined.

Retinoic acid (RA) metabolism could also be involved in the inhibition of ZW gonad development in our parabiosis model. Indeed, RA has recently been shown to be involved in meiosis entry control in mammals [Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006]. When applied before gonadal differentiation, RA can induce meiosis entry in organotypic cultures of *P. waltl* GMI complexes (our unpublished results). One might suggest that an early synthesis of the RA-degrading enzyme Cyp26b1 in the ZW parabiont from heterosex associations, as a result of the action of a male circulating product, could delay ZW germ cell differentiation, leading to an abnormal crosstalk between germline and the somatic compartment and inducing gonad alterations.

To conclude, advances have been performed recently in regard to molecular markers of *Pleurodeles waltl* sex differentiation that allowed us to better characterize gonad differentiation. The use of antibodies against several of these markers should lead to an increase of our understanding of the differentiation process.

Acknowledgement

Most of the results reported in this article were supported by grants of the Ligue Contre le Cancer (Comités de la Meurthe et Moselle, de la Meuse et de la Haute Marne), of the Association pour la Recherche sur le Cancer, of the Conseil Régional de Lorraine and of the Université Henri Poincaré. Chia-I Ko was recipient of grants from the French 'Ministère des Affaires Etrangères' and from Luxembourg 'Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' (BFR05/010). A. Wallacides was recipient of a grant from the Syrian government (decision 381).

References

Arenas MI, Royuela M, Lobo MV, Alfaro JM, Fraile B, Paniagua R: Androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and estrogen receptor-beta (ER-beta) expression in the testis of the newt, *Triturus marmoratus marmoratus* during the annual cycle. J Anat 199:465–472 (2001).

Bachvarova RF, Masi T, Drum M, Parker N, Mason K, Patient R, Johnson AD: Gene expression in the axolotl germ line: *Axdazl*, *Axvh*, *Axoct-4*, and *Axkit*. Dev Dyn 231:871–880 (2004).

Beetschen JC: Cinq générations d'individus polyploïdes chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. C R Soc Biol 161:930–936 (1967).

Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, et al: Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science 312:596–600 (2006).

Capel B, Coveney D: Frank Lillie's freemartin: illuminating the pathway to 21st century reproductive endocrinology. J Exp Zool A Comp Exp Biol 301:853–856 (2004).

Capuron A, Maufroid JP: Role of the endoderm in the ventro-lateral mesoderm and primordial germ cells determination in *Pleurodeles waltlii*. Arch Anat Microsc Morphol Exp 70: 219–226 (1981).

Chardard D, Dournon C: Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. J Exp Zool 283:43–50 (1999).

Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dournon C: Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. Gen Comp Endocrinol 99:100–107 (1995).

Chardard D, Kuntz S, Chesnel A, Flament S: Effects of androgen on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*. J Exp Zool 296: 46–55 (2003).

Collenot A, Gounon P, Collenot G: Aspects récents de l'étude de la différenciation sexuelle des amphibiens: étude de l'effet free-martin chez le triton Pleurodèle. Mém Soc Zool France Symp L Gallien 31–42 (1987).

Corthesy B, Cardinaux JR, Claret FX, Wahli W: A nuclear factor I-like activity and a liver-specific repressor govern estrogen-regulated in vitro transcription from the *Xenopus laevis* vitellogenin B1 promoter. Mol Cell Biol 9: 5548–5562 (1989).

Dorazi R, Chesnel A, Dournon C: Opposite sex determination of gonads in two pleurodeles species may be due to a temperature-dependent inactivation of sex chromosomes. J Hered 86:23–31 (1995).

Dournon C, Houillon C: Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. Reprod Nutr Dev 24:361–378 (1984).

Dournon C, Demassieux C, Durand D, Lesimple M: Primordial germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltl*: genetic control before gonadal differentiation. Int J Dev Biol 33:477–485 (1989).

Dournon C, Houillon C, Pieau C: Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. Int J Dev Biol 34:81–92 (1990).

Dumond H, Maufroid JP, Ko CI, Chardard D, Chesnel A, Flament S: Freemartin in the amphibian *Pleurodeles waltl*: Parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. Mol Reprod Dev 75:439–449 (2008).

Ferrier V, Jaylet A, Cayrol C, Gasser F, Buisan JJ: Etude électrophorétique des peptidases érythrocytaires chez *Pleurodeles waltlii* (Amphibien, Urodèle): mise en évidence d'une liaison avec le sexe. C R Acad Sci Série D 290:571–574 (1980).

Gallien L: Inversion du sexe (féminisation) chez l'urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah traité par le benzoate d'oestradiol. C R Acad Sci 231:919–920 (1950).

Gallien L: Sur la descendance unisexuée d'une femelle de *Pleurodeles waltlii* Michah ayant subi pendant sa phase larvaire l'action gynogène du benzoate d'oestradiol. C R Acad Sci 233:828–830 (1951).

Gallien L: Inversion expérimentale du sexe sous l'action des hormones sexuelles chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. Analyse des conséquences génétiques. Bull Biol France Belg 1:1–51 (1954).

Gallien L: Différenciation et organogenèse sexuelle des métazoaires (Masson and Co., Paris 1973).

Hayashi K, de Sousa Lopes SM, Surani MA: Germ cell specification in mice. Science 316: 394–396 (2007).

Hayes TB: Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. J Exp Zool 281: 373–399 (1998).

Houillon C, Dournon C: Inversion of the female sexual phenotype at high temperature in the urodelian amphibian, *Pleurodeles waltii* Michah. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 286:1475–1478 (1978).

Jaylet A: Tétraploïdie expérimentale chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. Chromosoma 38:173–184 (1972).

Jeyasuria P, Place A: Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). J Exp Zool 281:428–449 (1998).

Joly J: Les cycles sexuels de Salamandra (L.). I – Cycle sexuel des males. Ann Sci Nat 13:451–504 (1971).

Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F: The role of anti-Mullerian hormone in gonadal development. Mol Cell Endocrinol 145:3–7 (1998).

Kawano K, Miura I, Morohashi K, Takase M, Nakamura M: Molecular cloning and expression of the SF-1/Ad4BP gene in the frog, *Rana rugosa*. Gene 222:169–176 (1998).

Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC: A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. Nucleic Acids Res 16:647–663 (1988).

Ko C-I, Chesnel A, Mazerbourg S, Kuntz S, Flament S, Chardard D: Female-enriched expression of ERα during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Gen Comp Endocrinol 156:234–245 (2008).

Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC: Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc Natl Acad Sci USA 103:2474–2479 (2006).

Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Flament S: Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. Cytogenet Genome Res 101:283–288 (2003a).

Kuntz S, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Callier M, Duterque-Coquillaud M, Flament S, Chardard D: Expression of P450 aromatase during sex differentiation and sex reversal in the amphibian *Pleurodeles waltl*. J Steroid Biochem Mol Biol 84:89–100 (2003b).

Kuntz S, Chesnel A, Flament S, Chardard D: Cerebral and gonadal aromatase expressions are differently affected during sex differentiation of *Pleurodeles waltl*. J Mol Endocrinol 33:717–727 (2004a).

Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Ducatez M, Callier M, Flament S: Expression of aromatase and steroidogenic factor 1 in the lung of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Endocrinology 145:3111–3114 (2004b).

Kuntz S, Chardard D, Ko C-I, Dumond H, Ducatez M, et al: Female-enriched and thermosensitive expression of steroidogenic factor-1 during gonadal differentiation in *Pleurodeles waltl*. J Mol Endocrinol 36:175–186 (2006).

Lacroix JC: Etude descriptive des chromosomes en écouvillon dans le genre *Pleurodeles* (Amphibien, Urodèle). Ann Embryol Morph 1: 179–202 (1968a).

Lacroix JC: Variations expérimentales ou spontanées de la morphologie et de l'organisation des chromosomes en écouvillon dans le genre *Pleurodeles* (Amphibien, Urodèle). Ann Embryol Morph 1:205–248 (1968b).

Lambard S, Carreau S: Aromatase and oestrogens in human male germ cells. Int J Androl 28:254–259 (2005).

Luo X, Ikeda Y, Parker KL: A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. Cell 77:481–490 (1994).

Lutz I, Blodt S, Kloas W: Regulation of estrogen receptors in primary cultured hepatocytes of the amphibian *Xenopus laevis* as estrogenic biomarker and its application in environmental monitoring. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 141:384–392 (2005).

Matsui Y, Okamura D: Mechanisms of germ-cell specification in mouse embryos. Bioessays 27:136–143 (2005).

Maufroid JP, Capuron A: Experimental demonstration of germinal cells in the presumptive lateral mesoderm of the young gastrula of *Pleurodeles waltii* (urodele amphibian). C R Acad Sci D 676:821–824 (1973).

Maufroid JP, Capuron A: Induction of the mesoderm and primordial germ cells by the endoderm of *Pleurodeles waltlii* (Amphibia, Urodele): development during gastrulation. C R Acad Sci Série D 284:1713–1716 (1977a).

Maufroid JP, Capuron A: Recent researches on primordial germ cells of *Pleurodeles waltlii* (Amphibia, Urodele). Mem Soc Zool Fr 41: 43–60 (1977b).

Maufroid JP, Capuron AP: A demonstration of cellular interactions during the formation of mesoderm and primordial germ cells in *Pleurodeles waltlii*. Differentiation 29:20–24 (1985).

Nieuwkoop PO: Experimental investigations on the origin and determination of the germ cells, and on the development of the lateral plates and germ ridges in Urodeles. Arch Neerl Zool 8:1–205 (1947).

Pask AJ, Behringer RR, Renfree M: Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis – from marsupials to mice. Cytogenet Genome Res 101:229–236 (2003).

Piferrer F, Blazquez M: Aromatase distribution and regulation in fish. Fish Physiol Biochem 31:215–226 (2005).

Ponglikitmongkol M, White JH, Chambon P: Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. EMBO J 9:2221–2231 (1990).

Ross AJ, Tilman C, Yao H, MacLaughlin D, Capel B: AMH induces mesonephric cell migration in XX gonads. Mol Cell Endocrinol 211:1–7 (2003).

Smith LD: A test of the capacity of presumptive somatic cells to transform into primordial germ cells in the Mexican axolotl. J Exp Zool 156:229–242 (1964).

Tiffoche C, Chesnel A, Jego P, Le Pennec JP: Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a *Pleurodeles* lectin. Eur J Biochem 213:901–907 (1993).

Vigier B, Forest MG, Eychenne B, Bezard J, Garrigou O, Robel P, Josso N: Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. Proc Natl Acad Sci USA 86: 3684–3688 (1989).

Wu KH, Tobias ML, Thornton JW, Kelley DB: Estrogen receptors in *Xenopus*: duplicate genes, splice variants, and tissue-specific expression. Gen Comp Endocrinol 133:38–49 (2003).

Zaborski P: Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and H-Y antigen expression in gonads of a newt. Prog Clin Biol Res 217A:163–169 (1986).

RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE II

DIFFERENCIATION PATHOLOGIQUE DES CELLULES GERMINALES : CANCER TESTICULAIRE

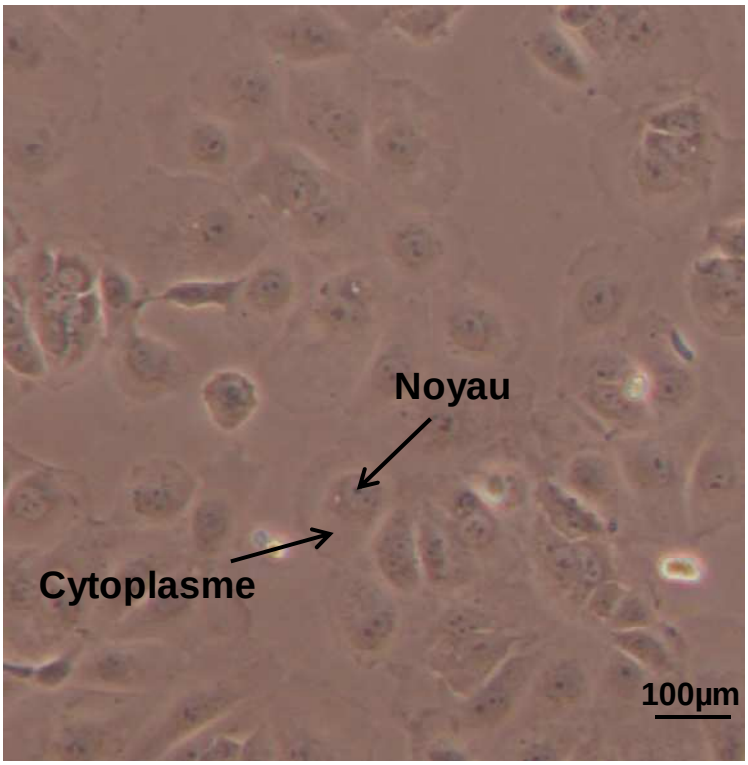


Figure 49 : Morphologie des cellules TCam2 en culture adhérente.

DIFFERENCIATION PATHOLOGIQUE DES CELLULES GERMINALES : CANCER TESTICULAIRE

1. Contexte et objectifs

Les tumeurs testiculaires germinales (TGCTs) représentent les tumeurs les plus fréquentes chez les jeunes hommes. La majorité de ces tumeurs proviendraient des cellules germinales qui auraient subi une transformation néoplasique altérant leur différenciation pendant la vie fœtale. Celle-ci pourrait être liée à l'exposition à des composés chimiques tels que des perturbateurs endocriniens. Ces cellules pré-invasives constituent un carcinome in situ (CIS) quiescent jusqu'à la puberté. A ce moment, les cellules se multiplient et se différencient pour donner différents types de tumeurs d'origine germinale (Kristensen et al., 2008). Dans une première étape préalable à l'étude de l'effet de molécules œstrogéno-mimétiques ou anti-androgéniques, nous avons voulu étudier l'influence des hormones stéroïdes sexuelles naturelles sur la prolifération de cellules issues de tumeurs testiculaires germinales.

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour réaliser cette étude : la lignée TCam2, seule lignée séminomateuse pure disponible et la lignée NT2/D1 issue de carcinome embryonnaire pluripotent. Nous avons étudié sur ces lignées :

- les effets des stéroïdes sexuels (17β œstradiol, testostérone et dihydrotestostérone) sur la prolifération cellulaire.

- les voies de signalisation impliquées dans la réponse aux stéroïdes.

- les gènes cibles régulés par ces hormones.

2. Les modèles d'étude

2.1. Le modèle TCam2

Les tumeurs séminomateuses représentent environ 50 % des TGCTs. La lignée TCam2 est la seule lignée humaine de séminome pure disponible à ce jour (figure 49). Elle a été établie en 1993 par Mizuno et son équipe 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

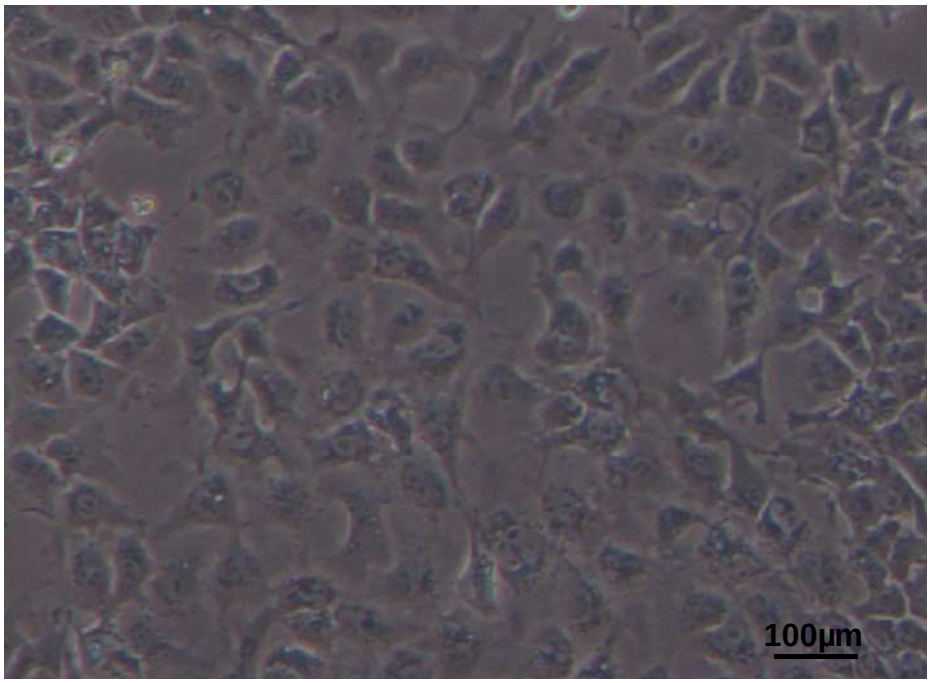


Figure 50 : Morphologie des cellules NT2/D1 en culture adhérente.

xénogreffe sur des souris SCID (Mizuno et al., 1993 ; revue dans (de Jong et al., 2008)). De Jong et ses collaborateurs ont caractérisé la lignée TCam2 en étudiant la constitution génomique, les mutations et les différents marqueurs exprimés par ces cellules pour vérifier son origine. Ils ont aussi 1) confirmé que les cellules séminomateuses conservaient leur caractéristique, 2) déterminé que leur croissance résultait de l'activation constitutive de la voie RAS.

La constitution génomique de la lignée TCam2 montre un gain complet de certains chromosomes (chromosome 20) ou bien un gain de bras complets (chromosomes 7p, 8q et 12p), en revanche les délétions chromosomiques identifiées sont (9q, 13, 17p, 22, et Y). Les chromosomes 1, 2, 4, 7, 11, 18, et X montrent un gain ou une perte d'une région restreinte. Le gain du bras court du chromosome 12 (12p), qui représente l'aberration chromosomique caractéristique de tous les TGCTs invasives, est observé dans la lignée TCam2 (de Jong et al., 2008).

Le profil d'expression de marqueurs immunohistochimiques dans cette lignée a également été réalisé. Les marqueurs de pluripotence tels que NANOG et OCT3/4, le récepteur c-KIT et son ligand KITLG, ainsi que PLAP sont exprimés. Par contre SOX2 (marqueur de cellules souches embryonnaire indifférenciées) et CD30 (membre de la famille tumor necrosis factor receptor (TNFR)) ne sont pas exprimés. Le gène *TSPY* n'est pas exprimé à cause de la perte du chromosome Y. Une mutation dans le proto-oncogène *BRAF* a été observée : il s'agit du remplacement d'une thymine par une adénine en position 1796 (T1796A) conduisant à la substitution de l'acide glutamique par la valine en position 600 (V600E). La mutation de *BRAF* induit une activation constitutive de la voie RAS. En raison de la sensibilité exceptionnelle des lignées séminomateuses qui subissent une apoptose lorsqu'une perturbation intervient dans leur microenvironnement, TCam2 représente la seule et la première lignée séminomateuse pure disponible. En effet, les auteurs supposent que la mutation activée de *BRAF* permet la survie et la multiplication de la lignée TCam2 *in vitro* (de Jong et al., 2008).

2.2. Le modèle NT2/D1

La lignée NT2/D1 (figure 50) représente une lignée tumorale non séminomateuse qui a été établie à partir d'une métastase pulmonaire de carcinome embryonnaire pluripotent et prélevé sur un patient de 22 ans. Les cellules de cette lignée sont hypotriploïdiques. Une seule copie des chromosomes 1, 10, 11 et 13 a été observée. Les autres chromosomes sont présents

en deux ou trois copies par cellule. Le chromosome Y est présent dans toutes les cellules de cette lignée (site ATCC : http://www.lgcstandards-atcc.org). Cette lignée est bien caractérisée, notamment pour sa réponse à l'acide rétinoïque. En effet, l'exposition à 10^{-5}M d'acide rétinoïque induit une différenciation neuronale de ces cellules *in vitro* (Andrews, 1984).

3. Publication

Estrogens promote seminoma cell proliferation through a GPER-dependent ERalpha36 induction.

Wallacides, A., Chesnel, A., Ajj, H., Chillet, M., Flament, S., et Dumond, H.

Article soumis à Molecular and Cellular Endocrinology

3.1. Introduction

Durant les dernières décennies, de nombreuses études ont montré la forte augmentation de l'incidence des cancers du testicule. Il s'agit du type de tumeur le plus fréquent chez les hommes âgés de 15 à 40 ans. Les TGCTs représentent 95 % de l'ensemble des tumeurs testiculaires malignes. Ces tumeurs sont classées en tumeurs séminomateuses ou non-séminomateuses (voir introduction, paragraphe III.3.1.3). Les deux types des TGCTs proviennent de cellules précurseurs qui constituent un carcinome in situ (CIS) (Rajpert-De Meyts, 2006). Les cellules de CIS sont des cellules germinales fœtales arrêtées au cours du processus de différenciation et qui auraient subi une transformation néoplasique (Sonne et al., 2009). Ces cellules restent en dormance pendant l'enfance. A la puberté, les cellules de CIS prolifèrent dans les tubules séminifères et donnent naissance aux TGCTs suggérant que le développement de ces tumeurs est hormono-sensible (McIntyre et al., 2008).

Les effets génomiques des œstrogènes sont médiés principalement par deux types de récepteurs nucléaires : les récepteurs des œstrogènes alpha (ERα) et bêta (ERβ). Les œstrogènes régulent ainsi la transcription de gènes cibles possédant des éléments de réponse aux oestrogènes dans leur promoteur. Ces ERs sont exprimés dans le testicule des mammifères indiquant l'importance de l'action des œstrogènes dans la régulation du développement testiculaire (O'Donnell et al., 2001). Les oestrogènes peuvent aussi agir par le biais de voies de signalisation non génomiques qui impliquent des récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique et qui activent des kinases cytoplasmiques. Par exemple, ces actions non génomiques des œstrogènes sont capables d'induire l'activation de la voie MAPK ou la voie PI3K/Akt dans certains types cellulaires (Simoncini et al., 2004). L'activation de la voie PKA et l'augmentation de calcium intracellulaire par les œstrogènes sont également décrites (Zhang et Trudeau, 2006).

Un récepteur membranaire des œstrogènes, appelé GPER (G Protein-coupled Estrogen Receptor), a été décrit comme médiant les actions non génomiques des œstrogènes dans les cellules cancéreuses mammaires (Filardo et al. 2000). Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et il est localisé au niveau de la membrane plasmique. Dans les cellules cancéreuses mammaires SKBR3 qui n'expriment pas les ERs, l'activation de la voie MAPK ERK1/2 par l'œstradiol (E_2) dépend de la présence du GPER et de la transactivation du récepteur à l'EGF (Filardo et al. 2000).

En 2005, Wang et ses collègues ont cloné une nouvelle isoforme d'ERα (66 kDa) qu'ils ont nommée « ERα36 » en raison de sa masse moléculaire de 36 kDa. Ce récepteur contient un domaine de fixation à l'ADN et également un domaine partiel de dimérisation et de fixation au ligand (figure 24). En revanche, les deux domaines d'activation transcriptionelle AF-1 et AF-2 du récepteur ERα66 sont absents dans l'isoforme ERα36 (Wang et al., 2005). ERα36 intervient dans l'activation de la voie MAPK/ERK1/2 via l'induction du récepteur à l'EGF dans des lignées tumorales mammaires qui n'expriment pas ERα66 comme les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MDA-MB-436 (Zhang et al., 2010). De plus, ERα36 intervient en aval de GPER dans l'induction des voies de signalisation non génomiques d'E_2. Il peut également médier l'activation des ces voies de signalisations indépendamment de GPER (Kang et al., 2010).

Le but de notre travail est d'étudier l'effet des œstrogènes (E_2) et des androgènes (testostérone) sur la prolifération de la lignée cellulaire TCam2 qui représente la seule lignée séminomateuse pure disponible. Nous avons également déterminé les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire. Enfin, nous avons étudié l'effet de ces stéroïdes sur l'expression d'ERα36 qui est nécessaire pour induire la prolifération de ces cellules tumorales.

3.2. Principaux résultats

Afin de tester l'effet des hormones stéroïdes sur la prolifération des cellules TCam2, nous avons mesuré le nombre de cellules vivantes par le test « Cell titer Glo » (voir matériels et méthodes) après traitement avec l'E_2 (1 nM) ou la testostérone (1 µM) pendant 24 heures ou 48 heures. Les doses utilisées correspondent aux doses physiologiques détectées dans le testicule humain (Roth et al., 2010). La prolifération cellulaire en réponse à l'E_2 et à la testostérone est significativement stimulée après 48 heures de traitement. Ce résultat a été confirmé par un test de croissance clonale (colony formation assay). Parallèlement, l'analyse

par western blot montre une induction du taux de cycline D1 (marqueur de la progression du cycle cellulaire en phase G1/S) après traitement des cellules TCam2 avec les mêmes concentrations d'E_2 ou de testostérone.

Nous n'avons pas détecté l'expression du récepteur ERα66 dans la lignée TCam2 ni dans les cellules NT2/D1. Par contre l'expression d'ERα66 est détectée par l'anticorps dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Une protéine de 36 kDa a aussi été détectée faiblement par l'anticorps dans les trois lignées cellulaires. Cette bande correspond à l'isoforme tronquée ERα36. L'expression d'ERα36 a été ensuite détectée par western blot dans les cellules TCam2 et NT2/D1 en utilisant un anticorps spécifique de cette isoforme (aimablement fourni par Dr Wang ZY, Creighton University medical school, Omaha, USA).

Suite à ces résultats, nous avons étudié l'effet des hormones stéroïdes sur l'expression d'ERα36. Après traitement des cellules TCam2 pendant 24 heures avec 1 nM d'E_2 ou 1 µM de testostérone, l'analyse par western blot révèle une augmentation du signal ERα36 dans les deux lignées cellulaires. Le même résultat est obtenu après traitement des cellules pendant 24 heures avec 1 nM d'E_2 couplé à la protéine BSA (Bovine Serum Albumine) (E_2-BSA). Par contre, le traitement des cellules avec 1 µM de testostérone couplée à la protéine BSA (T-BSA) induit l'expression d'ERα36 moins fortement que la testostérone non couplée. L'induction de l'expression d'ERα36 par E_2-BSA, qui ne peut pas traverser la membrane cellulaire, indique qu'un récepteur membranaire serait impliqué. Quant à la testostérone, elle semble agir en partie par l'activation d'un récepteur membranaire mais aussi par des mécanismes intracellulaires.

Afin de déterminer si ERα36 pouvait être impliqué dans le déclenchement des voies de signalisation des stéroïdes, nous avons étudié sa localisation dans les cellules TCam2. En effet, il a été décrit qu'ERα36 contient trois sites de myristoylation qui lui donnent la possibilité de s'ancrer à la face interne de la membrane plasmique (Wang et al., 2005). L'observation de cellules TCam2 en microscopie électronique à transmission montre qu'ERα36 est localisé sous la membrane plasmique, à la bordure endoplasme/ectoplasme et qu'il serait associé aux microfilaments d'actine. Ceci suggère qu'ERα36 ne représente pas le récepteur membranaire impliqué dans le déclenchement des voies de signalisation des stéroïdes dans les cellules TCam2.

Pour déterminer le mécanisme d'action de la testostérone (androgène aromatisable) dans les cellules TCam2, les cellules ont été traitées avec E_2, testostérone, E_2-BSA ou T-BSA

en présence ou en absence d'un inhibiteur de l'aromatase AI1 (10 nM). L'expression de *CYP19* codant l'aromatase a été vérifiée par RT-PCR semi-quantitative. L'expression de *TFAP2C* a été mesurée par PCR en temps réel. Ce gène code le facteur de transcription AP2γ impliqué dans le maintien de l'état indifférencié des cellules souches embryonnaires et des cellules de carcinome in situ (Weber et al., 2010; Hoei-Hansen et al., 2004). Son expression est stimulée par les œstrogènes dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Orso et al., 2004). L'expression de *TFAP2C* est induite dans les cellules TCam2 traitées à l'E_2. Le même résultat est observé dans les cellules traitées avec la testostérone mais cette induction est inhibée partiellement par AI1. Ces observations suggèrent que l'effet de la testostérone passe en partie par une voie oestrogénique après son aromatisation.

Pour étudier le rôle d'ERα36 dans le contrôle de la prolifération des cellules TCam2, nous avons inhibé son expression de façon stable dans ces cellules par shRNA (small hairpin RNA). Nous avons utilisé pour cela un vecteur exprimant un shRNA dirigé contre *ERα36* (fourni par le Dr Wang ZY, Creighton University medical school, Omaha, USA) et avons nommé la lignée « sh36-TCam2 ». Des cellules TCam2 transfectées avec un vecteur vide, dites « Neo-TCam2 », ont été utilisées comme témoin. L'inhibition de l'expression d'*ERα36* dans les cellules sh36-TCam2 a été vérifiée par western blot. Nous avons ensuite mesuré le nombre de cellules vivantes par le test « Cell titer Glo » après cinq jours de culture en présence de 2,5% ou 10% de sérum de veau fœtal (SVF). La vitesse de la prolifération est environ deux fois plus grande dans les cellules Neo-TCam2 que dans les cellules sh36-TCam2. Nous pouvons ainsi conclure que l'expression d'ERα36 est nécessaire pour une prolifération normale des cellules TCam2.

Nous avons ensuite cherché quel pourrait être le récepteur membranaire impliqué dans l'activation des voies de signalisation oestrogéniques dans la lignée TCam2. Le GPER qui est exprimé par les cellules TCam2 constituait un bon candidat. L'inhibition de l'expression de *GPER* par ARN interférence dans ces cellules conduit à une diminution de l'expression d'ERα36. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Kang et al., réalisés sur les cellules cancéreuses mammaires SKBR3 (Kang et al., 2010). Nous pouvons conclure que le déclenchement de la signalisation oestrogénique dépend de la présence de GPER.

Afin de déterminer la durée de l'effet de GPER sur l'induction de l'expression d'*ERα36*, nous avons utilisé le composé G15 (1 µM), un antagoniste spécifique de GPER (Dennis et al., 2009). L'analyse par PCR en temps réel montre que l'induction de l'expression d'*ERα36* habituellement observée en réponse à l'E_2, était inhibée lors d'une application

simultanée de G15. Par contre, cet effet inhibiteur n'est pas observé lorsque G15 est ajouté 3 heures après l'exposition à l'E_2. De plus, l'expression d'*ERα36* est une fois et demie plus importante dans les cellules exposées pendant 3 heures à l'E_2 que dans celles exposées pendant 24 heures. Ainsi, GPER semble nécessaire pour initier l'induction de l'expression d'*ERα36* mais pas pour le maintien de cette expression.

Nous avons ensuite déterminé la voie de signalisation activée par l'E_2 en aval de GPER dans les cellules TCam2. L'activation de la voie AMPc/PKA a été étudiée par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre CREB phosphorylée. E_2 induit la phosphorylation de CREB. Cette phosphorylation n'a pas lieu lorsque les cellules sont co-traitées avec H89 (10 µM) un inhibiteur de la PKA. L'analyse par immunofluorescence avec l'anticorps anti-CREB total montre un marquage nucléaire dans les cellules traitées avec DMSO ou E_2. La forme phosphorylée n'est observée que dans les cellules traitées par E_2 (environ 80% des noyaux marqués) en absence de H89 (10 µM). Dans les cellules sh36-TCam2 analysées par western blot, l'E_2 n'induit pas d'augmentation de la quantité de protéine CREB phosphorylée. En revanche, la phosphorylation de CREB est observée dans environ la moitié des noyaux des cellules sh36-TCam2 traitées avec E_2. Ceci suggère qu'ERα36 agirait en aval de la voie AMPc/PKA/CREB.

Enfin, un rétrocontrôle positif œstrogéno-dépendant impliquant ERα36 et le récepteur à l'EGF (EGFR) a récemment été décrit dans les cellules cancéreuses mammaires (Zhang et al., 2010). Nous avons commencé à tester l'existence d'un tel rétrocontrôle dans les cellules TCam2. L'analyse par western blot d'EGFR montre une induction par E_2. Conformément aux résultats obtenus par western blot, un marquage membranaire est observé dans la lignée Neo-TCam2 traitée à l'E_2, tandis que ce marquage est très faible dans les cellules sh36-TCam2 traitées avec DMSO ou E_2. Ceci suggère qu'ERα36 est nécessaire pour médier la surexpression d'EGFR par E_2. La fonctionnalité d'EGFR dans la réponse à l'E_2 reste à étudier.

3.3. Conclusion

Les hormones stéroïdes stimulent la prolifération des cellules séminomateuses TCam2. La testostérone agit directement via un récepteur membranaire et en partie après son aromatisation par activation des voies oestrogéniques. L'effet de l'œstradiol dans ces cellules tumorales est dépendant de la présence du récepteur membranaire GPER qui active par la suite le récepteur ERα36 localisé dans le cytoplasme via la voie AMPc/PKA.

Wallacides_manuscript_17-06-2011
Click here to view linked References

Estrogens promote seminoma cell proliferation through a GPER-dependent ERα36 induction

Abbreviated title : ERα36 promotes seminoma cell proliferation

ANGELINA WALLACIDES, AMAND CHESNEL, HUSSEIN AJJ, MARTINE CHILLET, STEPHANE FLAMENT AND HELENE DUMOND*

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

* **Correspondence to**: Doctor Hélène Dumond, Nancy-Université, Faculté des Sciences, EA4421, Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France.

Phone: +33 (0)3 83 68 42 59

Fax: +33 (0)3 83 68 41 96

E-mail: helene.dumond@scbiol.uhp-nancy.fr

Disclosure statement: The authors have nothing to disclose.

Abstract

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

Using the unique seminoma TCam2 cell line, we demonstrate that both estradiol and testosterone can stimulate TCam2 cell proliferation in the absence of the estradiol receptor ERα. We establish that estradiol can activate GPER-cAMP/PKA signaling pathway. TCam2 cells can express ERα36, a truncated isoform of the ERα receptor, the expression of which is rapidly induced after estrogen treatment in a GPER-dependent manner. ERα36 knock down indicates that ERα36 is (i) the downstream target of E_2-activated GPER/PKA/CREB pathway, (ii) required for estradiol-dependent EGFR expression, (iii) necessary for cell proliferation. Colocalization of ERα36 with cytoskeleton microfilaments suggests a role of estrogens in cell motility.

Our results highlight the importance of ERα36 as a possible prognostic marker.

Keywords : TCam2, seminoma, estrogens, ERα36, proliferation

Introduction

Among malignant tumours of the testis, 95% are testicular germ cell tumours (TGCT), which incidence has worryingly risen over the last 50 years to become the most common tumours among young men aged 15 to 40 years. In this age group, this pathology represents the leading cause of cancer-related morbidity and mortality. Based upon histologic traits, TGCTs are classified into two main categories: seminoma and nonseminoma, both derived from a common precursor cell type called carcinoma in situ (CIS) (Shakkebaek, 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 TGCT emerge. This prepubertal dormancy suggests a hormone–dependent mechanism for TGCTs development at puberty, or tumour progression (McIntyre et al., 2007; McIntyre et al., 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 (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 in the vicinity of germ cells by two main actors: 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 et al., 2010; Carreau and Hess, 2010). Indeed, 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 mouse (ArKO) caused by the targeted disruption of the *Cyp*19 gene 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 act through interaction with estrogen nuclear receptors (ERs, i.e. ERα and ERβ) which in turn exert their biological effects via both genomic and nongenomic signaling and transcriptional stimulation of estrogen responsive genes. The genomic estrogen signaling is mediated directly by binding to nuclear ERα and ERβ, while nongenomic estrogen signaling involves extranuclear events mediated by ERs. Through nongenomic ways, estrogen-like molecules can target regulatory cascades such as cAMP/PKA, MAPK, PI3K, and tyrosine kinases or membrane-associated molecules such as ion channels and G protein-coupled receptors (Simoncini et al., 2002; Simoncini et al., 2004). ERβ is expressed in either somatic (Leydig, peritubular, Sertoli) or germ cells (gonocytes to spermatozoans) of human testis whereas ERα 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 ERαKO or ERβKO or of double ERα/ERβ KO mice have demonstrated that ERβ mediated estrogen 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. GPR30, now renamed GPER, 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. 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 signaling pathways in an ER-negative GPER-transfected HEK293 cell line (Thomas et al., 2005; Thomas and Dong, 2006; Maggiolini and Picard, 2010).

In 2005, Wang and colleagues described a novel 36kDa ERα isoform called ERα36, an NH2-term truncated form of the canonical human estrogen receptor ERα66, 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 ERα36, concurrently to GPER, was further demonstrated in nongenomic estrogen signaling in various breast cancer cell lines (Wang et al., 2005; Wang et al., 2006; Lee et al., 2008; Lin et al., 2009; Lin et al., 2010). More recently, Zhang et al. (2010) demonstrated that Erα36 mediates E_2 dependent signaling in ER-negative breast cancer cells suggesting that a subset of ER-negative tumours thus retains responsiveness to mitogenic estrogen signaling.

Although the transcriptional responses mediated by the nuclear ERs have been extensively characterized, the changes in gene expression elicited by signaling through GPER have not been studied in the context of germ cell neoplasia and testicular gem cell cancer.

In a first step to understand the mechanisms underlying the deleterious effects of endocrine disrupting compounds (EDCs) on germ cells, we aimed to decipher the estrogen-dependent transduction pathways in TCam2 cells, a unique seminoma cell line isolated by Mizuno from a 35-year-old patient pure seminoma (Mizuno et al., 1993). First, we show that either estradiol or testosterone can increase the TCam2 proliferation rate by triggering the stimulation of ERα36 expression. Second, we indicate that those effects depend on GPER-PKA pathway

activation. Finally, we demonstrate that estrogen signaling pathway can trigger, ERα36-dependent EGFR expression.

Materials and methods

Reagents

Steroids and H89 (cAMP/PKA inhibitor) were purchased from Sigma-Aldrich (France). All compounds were solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) for stock solution ($1x10^{-2}$ M) and further diluted in RPMI medium without phenol red. Working concentrations were 1nM for 17β-estradiol (E_2) and BSA-conjugated 17β-estradiol (E_2BSA), 1μM for testosterone (T) and BSA-conjugated testosterone (TBSA). Control cells were treated with 0.01% DMSO.

Cell culture

TCam-2 cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mM L-glutamine in 5% CO2 at 37°C. Briefly, cells were plated in 10% FCS containing RPMI medium for 24h and then starved for 24h in 0.5% stripped FCS containing RPMI medium without phenol red. Treatments were performed on FCS deprived cells plated at a density of $8x10^4$ cells per well in 6-well plates. In case of inhibitor use, the corresponding compound was added to the medium 30 minutes before steroid treatment.

Cell proliferation assay

Cells were seeded in 6-well plates at a density of $4x10^4$ cells/well in 2 mL RPMI medium supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Cells were washed with PBS once they had attached and then incubated in phenol red-free RPMI containing 1% charcoal-stripped FCS for 24h. 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-GloTM Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières, France) on a VICTOR™ *X*3 Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer). Each treatment was performed in triplicate.

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 $3x10^2$ TCam2 cells dispersed into 1.2% methylcellulose (R&D systems, Lille, France), 20% FCS supplemented RPMI. Plates where then incubated at 37°C, in a 0.5% CO_2, humid atmosphere, for 14 days before colony counting. Additionally, cells were treated with 1nM E_2, 1µM T or DMSO as vehicle. Colonies composed of 100 cells at least were taken into account.

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 0.1µM of each primer, IQ SYBR Green Supermix (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) in a total volume of 15µL. RPLPO gene encoding ribosomal protein 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 ΔΔC(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.

Qualitative RT-PCR

Total RNA (1µg) was reverse transcribed using hexamer primers and 100U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 25µL. A 2µL 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 0.5U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1.5mM $MgCl_2$ and 10pmol of each primer in a total volume of 25µL. PCR products (12µL) were run in a 1% agarose gel containing 0.5µg/mL ethidium bromide.

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'-GCACCUUCAUGUCGCUCUU-3'and 5'-AAGAGCGACAUGAAGGUGC-3' for duplex n°1, 5'-UUGAACACCUCAAUGAGGG-3' and 5'-CCCUCAUUGAGGUGUUCAA-3' for duplex n°2, 5'-AAGACUGCUUGCAGGGAGC- 3' and 5'-GCUCCCUGCAAGCAGUCUU-3' for duplex n°3. The control duplex was provided by Eurogentec (SR-CL000-005, Angers, France). Cells ($8x10^4$) were plated into 6-well plates, in 2mL of medium supplemented with 10% FCS and 2mM L-glutamine the day before transfection**.** Cells were transiently transfected with either GPER (200nM 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 24h, cells were washed with PBS and the medium was replaced with phenol red-free RPMI supplemented with 1% charcoal-stripped FCS and 2mM L-glutamine. 24h later, cells were treated in phenol red-free and FCS free RPMI and harvested for further analyses.

Western immunoblotting

Total proteins were separated by 12% SDS-PAGE. Proteins were then transferred onto nitrocellulose membrane, where non specific binding sites were blocked in TNT buffer (5mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% non-fat powder milk, and incubated

overnight at 4°C with polyclonal anti-ERα36 kindly provided by Dr Wang ZY (Creighton University medical school, Omaha, USA) diluted at 1:500, anti-cyclinD1 (1:500; Cell signaling #2922, Saint Quentin, France), anti-ERα (sc73479, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA), anti-EGFR (1:1000; Cell signaling #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 1h with a peroxidase-linked secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, http://www.scbt.com).

Immunocytochemistry (ICC)

After 30 minute pre-treament with 10µM H89 (cAMP/PKA pathway inhibitor) and a 15 minute treatment with 1nM E_2, cells were fixed for 15 minutes in 4% parafolmaldehyde PBS. Then, samples were permeabilized in 0.25% Triton X-100 in PBS for 10 minutes and a 30-minute step of saturation was performed in a solution containing 4% bovine serum albumin (BSA), and 0.05% Triton X-100 in PBS. Primary antibody incubations were carried out for 1 hour with anti-EGFR (1:200; Cell signaling #2232, Saint Quentin, France), anti-phospho CREB (1:1000; Epitomics #1113-5, Montrouge, France) or anti-CREB (1:200; Upstate NL904, Euromedex, Mundolsheim, France) antibodies. Cells were washed three times in 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. Secondary antibody incubations were performed during 45 minutes with a fluorescent-conjugated secondary antibody Alexa488-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen). Then, samples were washed three times in 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes, and nuclei were stained with Hoechst H33342 (0.1µg/mL in PBS). Slides were mounted with AquaPoly/Mount (Polysciences Inc., Warrington, PA).

Transient transfection and establishment of stable cell line

TCam2 cells transfected with the empty expression vector or the ERα36-specific shRNA expression vector kindly provided by Dr Wang ZY (Creighton University medical school, Omaha, USA) using the ExGen500 in vitro transfection reagent (Euromedex, France). Transfected cells were kept for 6h, and then the ExGen500-DNA complex was removed. Two days after transfection, cells were incubated in medium containing 400μg/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-TCam2 and sh36-TCam2. The knocked down levels of ERα36 expression were confirmed by Western blot and RT-PCR analysis.

Transmission electron microscopy

Cells were pelleted and fixed for 4h in 2.5% glutaraldehyde (Euromedex, Mundolsheim, France) in 0.1M 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 to water 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-Erα36 antiserum (1:200 dilution in TBS) for 1 h at room temperature. The specimens were subsequently incubated with goat anti-rabbit IgG antibodies conjugated with colloidal gold (particle size of 10nm) (BioCell, Cardiff, UK) at a 1:10 dilution for 45 minutes. Finally, sections were stained for 20 minutes with 2% (w/v) uranyl acetate, viewed, and photographed with a Philips CM12 transmission electron microscope operated at 80 kV.

Statistical analysis

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

Results

Estradiol and testosterone treatment increase TCam2 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 TCam2 cell growth in response to steroids. After 24h serum deprivation (see Materials and methods section for details), cells were treated for either 24h or 48h with 1nM estradiol or 1μM 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 (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 48h treatment (figure 1A).

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

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. Once again, both estradiol and testosterone significantly increased the number and size of colonies, demonstrating a proliferative effect (figure 1C).

Estradiol induces the expression of a 36kDa ERα isoform

Since ERα36 expression was recently demonstrated to portray E_2 response in some breast tumours (Kang et al., 2010), we investigated the potential role of ERα36 in the response to steroid stimulation in two cell lines originating from TGCT: TCam2 seminoma cells and NT2/D1 embryonal carcinoma cells. First, we probed both cell lines for ERalpha isoforms.

Figure 2A indicates that both TCam2 and NT2/D1 cells express the truncated ERα46 and ERα36 isoforms but not the full length ERα66 estrogen receptor alpha. MCF-7 breast carcinoma cell lysate was used as control since those cells are known to express the 3 isoforms cited above (Wang et al., 2005).

Western-blot analyses performed using a specific anti-ERα36 antibody confirmed that TCam2 cells express a basal level of ERα36 (figure 2A). When TCam2 cells were treated for 1h or 24h by 1nM E_2, realtime-PCR analysis show a 6-fold and a 2-fold stimulation of ERα36 expression, respectively (figure 2B).

Since (i) ERα36 has been shown to localize into the plasma membrane in breast cancer cells (Wang et al., 2006) and (ii) TCam2 cells express the non specific steroid receptor GPER (Franco et al., 2011), we tested the ability of E_2-coupled BSA and testosterone-coupled BSA, the non permeable forms of E_2 and testosterone, to activate ERα36 expression. Figure 2C show that E_2BSA stimulates ERα36 protein expression, even more efficiently than free E_2. Conversely, TBSA induces ERα36 but less than free T in TCam2 cells. 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 (trough GPER or directly trough ERα36 activation) whereas testosterone could also act through intracellular dependent mechanisms (through androgen receptor activation or aromatization into estradiol).

ERα36 is not located into the plasma membrane in TCam2 cells

ERα36 polypeptide chain contains three myristoylation sites which could address the receptor to the plasma membrane in breast cancer cells (Wang et al., 2005; Wang et al., 2006). Therefore, we used transmission electron microscopy and anti-ERα36 antibody to localize

ERα36 in TCam2 cells (Figure 3A, 3B). The results did not differ between vehicle- or E_2 treated cells (data not shown) since in both cases, ERα36 gold-labelling was found underneath the membrane, at the endoplasm/ectoplasm border, where it was clearly associated with actin microfilaments (Figure 3C). This observation could rule out the possibility that BSA-coupled steroid can trigger an intracellular signal trough direct binding or activation of a membrane bound ERα36.

Testosterone can trigger estrogenic signal after aromatization in TCam2 cells

After demonstrating the stimulating effect of steroid treatment on TCam2 cell proliferation, we aimed to decipher the involved signaling 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 qualitative RT-PCR in TCam2 (figure 4A). *Tfap2c* gene encodes AP2γ 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 signaling pathways (Bouskine et al., 2010; Weber et al., 2010; Woodfield et al., 2007). Cells were treated for 24h with E_2, T, E_2BSA or TBSA in the presence or absence of an aromatase inhibitor (AI1-10nM). Expression of *Tfap2c* was measured by realtime-PCR. Indeed, E_2 triggered a 2.5-fold increase in *Tfap2c* expression in TCam2 cells (Figure 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 (Figure 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 signaling pathway after aromatization. In contrast, AI1 did block neither TBSA nor E_2BSA-

dependent stimulation of *Tfap2c* expression (Figure 4B), suggesting that testosterone could also display an estrogenic-like signaling through a plasma membrane receptor.

Establishment of a stable TCam2 cell line knocked down for ERα36

Thereafter, we focused on estradiol signaling in TCam2 cells and established a TCam2 cell line with stable ERα36 knock-down, as described by Kang et al. (2010). Protein extracts from TCam2 cells transfected by either the empty vector (Neo-TCam2 strain) or the ERα36 shRNA vector (sh36-TCam2 strain) were submitted to western blot analysis. As shown in figure 5A, no expression of ERα36 was found in the sh36-TCam2 cell line. To further understand the role of ERα36 in TCam2 cell physiology and proliferation, we performed a 5 day long proliferation assay in 2.5% and 10% FCS containing medium with Neo-TCam2 and sh36-TCam2 cell lines. We observed that the basal proliferation rate of sh36-TCam2 strain was significantly reduced compared to Neo-TCam2, indicating that ERα36 is necessary for normal cell growth even in rich culture medium (figure 5B). We were not able to repeat the same experiment in 1% stripped FCS containing medium because sh36-TCam2 cells did not survive starvation. This suggests that TCam2 cells proliferation is hormone-sensitive.

ERα36 induction depends on GPER activation

Taken together, the above results pointed out the potential role of GPER in estrogen-dependent stimulation of ERα36 expression. Therefore, we tested the ability of E_2 to induce ERα36 protein expression in TCam2 cells transfected by GPER targeted siRNA. In control siRNA transfected cells, a 24h E_2 treatment stimulated ERα36 expression whereas this induction was blocked in cells transfected by GPER targeted siRNA (Figure 6A). This confirmed that GPER is necessary for E_2 to trigger ERα36 stimulation of expression.

In order to study short to mid-term E_2 effects on ERα36 expression, we performed a kinetic of GPER blockage after E_2 treatment. G15, the specific antagonist of GPER (Dennis et al., 2009) was added either alone, at the same time as E_2, or 3h after E_2 addition. Then, ERα36 expression was measured by realtime-PCR. As previously described in other cell lines, G15 treatment alone triggered a moderate stimulating effect on ERα36 expression. Nevertheless, the antagonist did block ERα36 induction when added concomitantly with E_2 but not when added after 3h (figure 6B). This suggests that GPER is necessary for the early and rapid (3h) stimulation of ERα36 but not for the maintenance of its expression at a high level.

Estradiol signals through a GPER-cAMP/PKA pathway

Since many signaling pathways were described downstream GPER in various cell type, we then tested the ability for E_2 to activate the cAMP/PKA, the PI3K or the MAPK pathway in TCam2 cells. Since ERK phosphorylation seems to be constitutive in TCam2 cells (deJong et al., 2008), no more stimulation of either ERK1/2 or AKT phosphorylation was detected following E_2 treatment (data not shown). The activation of cAMP/PKA pathway was studied by measuring CREB phosphorylation by western blotting. E_2 did stimulate CREB phosphorylation but this effect was impaired in the presence of the PKA inhibitor H89 (10µM). Moreover, E_2-mediated CREB phosphorylation was absent in sh36-TCam2 cells (figure 7A).

This result was confirmed by immunofluorescent microscopy 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_2 treated cells. In contrast, the phosphorylated form was absent in DMSO treated cells. Following 15min exposure to 1 nM E_2, phospho-CREB protein was detected in more than 80% of TCam2 cells nuclei (figure 7). A 30 minute incubation in the presence of H89 before E_2 treatment impaired the induction of CREB

phosphorylation. Finally, the stimulation of CREB phosphorylation was also observed in sh36-TCam2 cell line suggesting that ERα36 is a downstream target rather than an upstream component of this phosphorylation pathway. Taken together, these results indicate that E_2 signals mainly through GPER-cAMP/PKA dependent pathway in TCam2 cells and further suggest that ERα36 could be the end point target of this rapid signaling pathway.

ERα36 is necessary for E_2-mediated EGFR regulation

Since an estrogen-dependent positive feedback loop involving ERα36 and EGFR was recently described in breast cancer cells, we investigated the relationship between both receptors in TCam2 cells. Western blot analysis shows that E_2 can stimulate EGFR protein expression (figure 8A) in TCam2. Moreover, the basal level of EGFR is greatly diminished in sh36-TCam2 cells and the stimulation is no more detectable after E_2 treatment (figure 8B). This result indicates that ERα36 is necessary for EGFR expression and for E_2-mediated EGFR stimulation.

Discussion

TCam2 seminoma cells are hormone-sensitive

Since TCam2 cells proliferation rate is stimulated by either estradiol or testosterone through an estrogen-related pathway, we propose to classify this cell line as "hormone-sensitive", despite the absence of ERα. This phenotype supports the hypothesis that germ cell tumours originating from CIS escape dormancy at puberty after exposure to endogen estrogen and/or estrogen-like endocrine disruptors. Indeed, there is now growing evidence for a correlation between TGCT risk and pre- or perinatal exposure to estrogen compounds (Martin et al., 2008). In contrast, the association between occupational exposure to endocrine disruptors compounds (EDCs) and the risk of TGCT has been poorly studied. Nevertheless, McDuffie et al. (2007) showed that farmers from Saskatchewan (Canada) were significantly more likely than non farmers to be diagnosed at stage 2 or higher testis cancer. A more comprehensive study performed among Finnish men in 1971-1995, also demonstrated that the risk of seminoma increased significantly in four occupations dealing with pesticides, textile dust, aliphatic and alicyclic hydrocarbons or some other organic solvents (Guo et al., 2005). Even if these studies are scarce, they provide elements in the line with a relationship with adult exposure to EDCs and an increased risk of TGCT.

Estrogens act through a GPER-dependent signaling pathway

The mechanisms underlying such EDCs exposure-response trends are still not known. In our study, we used TCam2 cell line, the unique pure seminoma cell line available to evaluate the impact of estrogen treatment and to decipher the signaling pathways involved in the absence of ERα. Thus, we showed that estradiol acts via a GPER-cAMP/PKA dependent pathway. Indeed, GPER was recently detected at high level in all intratubular germ cell tumours, seminomas and embryonal carcinomas (Franco et al., 2011). These results confirm and extend

previous data obtained with the seminoma derived cells JKT-1 by Fenichel's group (Roger et al., 2005; Bouskine et al., 2008; Bouskine et al., 2009). Like TCam2, JKT-1 cells do not express the full length form of ERα. Bouskine first described an E_2-dependent growth inhibition of JKT-1, mediated by ERβ nuclear receptor (Roger et al., 2005). In a second paper, they demonstrated on the contrary that BSA-coupled estradiol promote proliferation through an estrogen receptor located into the plasma membrane and both a PKA and ERK-dependent pathway (Bouskine et al., 2008). Finally, they addressed the role of bisphenol A in promoting cell growth and showed the involvement of GPCR and PKA/PKG pathway suggesting the implication of GPER (Bouskine et al., 2009). As described in the result section, we observed growth promoting effect of free and BSA-coupled estradiol through cAMP/PKA activation in TCam2. Therefore, we can hypothesize that the seminoma-derived cells JKT-1 and the pure seminoma cell line TCam2 do respond to estrogenic signal trough similar pathway. However, different expression levels of GPER and ERβ or the presence/absence of ER cofactors in both cell lines could explain the discrepancy between E_2 mediated proliferation in TCam2 and E_2 growth inhibition in JKT-1. In fact, Eckert et al. (2008) previously demonstrated that JKT-1 lacks expression for most of the genes detectable in TGCTs, thus providing evidences for great differences between TCam2 and JKT-1.

ERα36 expression portrays seminoma cell E_2 exposure

Based on the work of Wang and colleagues who analyzed the upstream signals leading to Erα36 activation in several breast cancer cell lines (Zhang et al., 2010; Wang et al., 2010), we showed that the GPER-dependent E_2 signaling ends to ERα36 expression induction. Moreover, the growth phenotype of our stably transfected sh36-TCam2 cell line suggests that a threshold of ERα36 protein should be reached to respond to estradiol otherwise cell activity

is compromised. Therefore, a high level of ERα36 expression seems to be sufficient to portray estradiol exposure in TCam2 and might be tested as a marker for EDCs exposure.

More recently, Zhang et al. (2010) further demonstrated that ERα36 mediates nongenomic estrogen signaling through the EGFR/Src/ERK signaling pathway in ER-negative breast cancer cells suggesting that these tumours can retain an estrogen mitogenic signaling in the absence of estrogens. This process is also suspected to be involved during acquired tamoxifen resistance of hormone-treated breast tumours (Lin et al., 2010). Indeed, we show in TCam2 cells that a minimal ERα36 expression level is necessary for both EGFR membrane localization and E_2-mediated stimulation of EGFR expression. Similar data were obtained in prostate cancer cells 22Rv1 which express 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 tumours that escape androgen deprivation therapy. Therefore, high ERα36 protein level may also reveal hormone independency in TGCTs. One even can hypothesize that a transient exposure to endocrine disruptor(s) (during early life or puberty for example) could trigger a positive feedback loop of ERα36/EGFR activation which could, in turn lead to estrogen-independent long term promotion of seminoma cell proliferation and tumour progression in adulthood.

Is ERα36 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 signaling cascades. In these complex processes, a critical role is played by the dynamic remodeling of the actin cytoskeleton, which forms the backbone of every cell. The role of sex steroids in the regulation of cell movement and actin-dependent

signaling has been demonstrated in numerous physiological processes (motility of spermatozoa, brain sexual differentiation, angiogenesis) 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, 2010b) recently reported that E_2 can trigger cytoskeleton remodelling and cell motility in several cell lines including breast cancer cells through ERα-dependent recruitment and phosphorylation of Focal Adhesion Kinases (FAK) and N-WASP. This process seems to be necessary for cancer cells migration and invasion. In our study, ERα36 was found to be associated with actin microfilament, suggesting a potential regulatory role of the truncated form of ERα in actin cytoskeleton remodeling and cell migration. Since ERα36 expression is enhanced by E_2 treatment, one can hypothesize that a critical threshold of protein must be reached to trigger cell motility. However, the precise domain of ERα36 protein involved in actin regulation remains to be determined and the expression of ERα36 was not tested in the cell lines used by Sanchez and Flamini. The involvement of ERα36 in the processes they describe remains to be elucidated.

Conclusion

Taken together, our results indicate a positive role of E_2 on TCam2 seminoma cell proliferation. The described pathway involves GPER-dependent signaling that triggers ERα36 upregulation. Our study also suggests a potential role of the ERα36 isoform in actin cytoskeleton remodeling. Case control study would be interesting in order to validate ERα36 expression as a marker of endocrine disruptor exposure and/or a prognostic marker in TGCTs.

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- ERα36 antibody, Professor B. Foliguet for great help in electron miscroscopy and J. Flayac for technical support.

Bibliography

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., Fénichel, 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.

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 Roozendaa,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 puberal testicular germ cell tumours. 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 remodelling, migration and invasion. PLoS ONE 3:e2238. doi:10.1371/journal.pone.0002238.

Guo, J., Pukkala, E., Kyyrönen, P., Lindbohm, M., Heikkilä, P., Kauppinen, T., 2005. Testicular cancer, occupation and exposure to chemical agents among Finnish men in 1971-1995. Cancer. Causes. Control. 16, 97-103.

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.

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 Feb 2, 5(2):e9013. doi:10.1371/journal.pone.0009013.

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.

McDuffie, H.H., Quail, J., Ghosh, S., Pahwa, P., 2007. Host factors, occupation, and testicular cancer in Saskatchewan, Canada: 1979-2002. J. Agric. Saf. Health. 13, 247-258.

McIntyre, A., Gilbert, D., Goddard, N., Looijenga, L.H., Shipley, J., 2008. Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumours of adolescents and adults. Genes. Chromosomes. Cancer. 47, 547-557.

McIntyre, A., Summersgill, B., Lu, Y.J., Missiaglia, E., Kitazawa, S., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H., Shipley, J., 2007. Genomic copy number and expression patterns in testicular germ cell tumours. 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 tumour 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.

Rajpert-de Meyts, E., Hoei-Hansen, C.E., 2007. From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. Ann. N. Y. 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., 2010. 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 signaling 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., 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, L., Zhang, X., Wang, Z., 2010. The Wilms' tumour 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.

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 signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 9063-9068.

Weber, S., Eckert, D., Nettersheim, D., Gillis, A.J.M., Schäfer, S., Kuckenberg, 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 signaling. 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-α36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. Oncogene. doi:10.1038/onc.2010.458.

Figure legends

Fig. 1 - Steroids induce TCam2 cell proliferation. (A) Proliferation test was performed by TCam2 cell treatment with 1nM estradiol (E_2) or 1µM testosterone (T) in medium containing 1% charcoal-stripped FCS for 24h and 48h. Control cells were treated with DMSO. Cell number was evaluated after 24h using the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay. Control cell growth was considered as 100%. Results are given as mean ± s.e.m. of 3 different counts. (B) Western-blot analysis of cyclin D1 expression after 24h E_2 or T treatment. Cells were cultured for 24h in phenol-red free, 0.5% FCS containing medium in the presence of 0.01% DMSO, 1nM E_2 or 1µM T. Total cell lysates were then submitted 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_2 or T as in (A). Colonies (>100 cells) were counted after 14 days. Results are given as mean ± s.e.m. of 3 different counts. *, Significantly different from DMSO treated control ($P < 0.05$).

Fig.2 - Estradiol can induce the expression of ERα36 in a GPER-dependent manner. (A) Western blot analysis of ERα isoform expression in TCam2 seminoma or NT2/D1 embryonal carcinoma cells compared to MCF-7 breast cancer cells. Proteins were prepared according to Wang et al. (2011) and several amounts submitted to SDS-PAGE as indicated above each well. Immunoblotting was performed with an anti-full length ERα66 antibody - i.e. ERα66 was used as the antigen. (B) Expression levels of ERα36 after 1h or 24h E_2 treatment in TCam2 cells as measured by realtime-PCR. Control cells received DMSO. The values represent the means ± s.e.m. of at least 3 different experiments. (C) Western blot analyses of ERα36 protein expression level after 24h treatment with DMSO, E_2 (1nM), E_2BSA (1nM), T (1µM), TBSA (1µM) in TCam2. Expression of alpha-tubulin is given as control.

Fig.3 – Localization of ERα36 in TCam2 cells by transmission electron microscopy. Arrowheads show gold-bead labelled ERα36 localization. (A) Plasma membrane (mb) and cytoplasm (cyto) indicating ERα36 localization at the ecto-endoplasm border, (B) at the basis of a microvillosity (mv) and (C) associated with actin cytoskeleton. af: actin filament.

Fig. 4 – Testosterone acts via an estrogenic pathway, partly through aromatization. (A) Qualitative RT-PCR detection of *Cyp19* transcripts (660bp) in TCam2 cells. *RPLPO* amplicon (530bp) is shown as control. (B) TCam2 cells were treated with DMSO, E_2 (1nM), E_2BSA (1nM), T (1µM), TBSA (1µM) for 24h in the presence or absence of 10nM P450 aromatase inhibitor (AI1). *Tfap2c* expression was measured by realtime-PCR. Control cells received DMSO. The values represent the means ± s.e.m. of at least 3 different experiments. *, Significantly different from T treated cells ($P < 0.05$).

Fig.5 – Establishment and phenotype of the sh36-TCam2 cell line. (A) Western blot analysis of ERα36 expression in Neo-TCam2 and sh36-TCam2 cells. (B) Analysis of cell proliferation of Neo- and sh36-TCam2 cells. Proliferation test was performed in medium containing 5% charcoal-stripped FCS after growing for 2 or 5 days. Cell numbers were evaluated after using the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay. Results are given as mean ± s.e.m. of 3 different counts. *, Significantly different from Neo-TCam2 cells ($P < 0.05$).

Fig.6 – Estradiol can induce the expression of ERα36 in a GPER-dependent manner. (A) Protein expression levels of ERα36 after 24h E_2 treatment in TCam2 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. GPER expression measured by semi-quantitative RT-PCR is shown as a control of knock-down efficiency. (B) ERα36 expression analysis as measured by realtime-PCR in TCam2 cells after 24h 1nM E_2 treatment and 1µM G15 treatment added at the same time or 3h after E_2 addition. Results are given as mean ± s.e.m. of 3 different experiments. *, Significantly different from E_2 treated cells ($P < 0.05$).

Fig.7 – E_2 acts trough a cAMP/PKA dependent pathway. (A) Phospho-CREB (P-CREB) protein expression analysis in either TCam2 or sh36-TCam2 cells. Cells were treated with 1nM E_2 for 15 minutes in the presence or absence of 10µM PKA inhibitor (H89). Expression of alpha-tubulin is given as control. (B) TCam2 cells IHC was performed using anti-P-CREB antibody. TCam2 as well as sh36-TCam2 cells treated for 15 minutes with E_2 show a great stimulation of CREB phosphorylation into the nucleus. This staining is impaired by pre-treatment with 10µM H89. TCam2 stained with anti-CREB antibody are shown as control for the presence of CREB in DMSO or E_2 treated cells. The scale bar represents 100µm.

1

2 **Fig.8** - E_2 stimulates EGFR expression in an ERα36-dependent way. (A) Western blot analysis of EGFR
3 expression was performed in TCam2 cells treated by E_2 (1nM) for 24h. (B) ICC analysis of EGFR
4 expression and localization in Neo-TCam2 and sh36-TCam2 cells treated by E_2 (1nM) for 15 minutes.
5 In Neo-TCam2 cells, EGFR is localized at the cell surface. In sh36-TCam2 cells, EGFR expression was
6 detected neither in DMSO nor in E_2 treated cells. The scale bar represents 100µm.

7

8

9

1 Table 1: Primer list

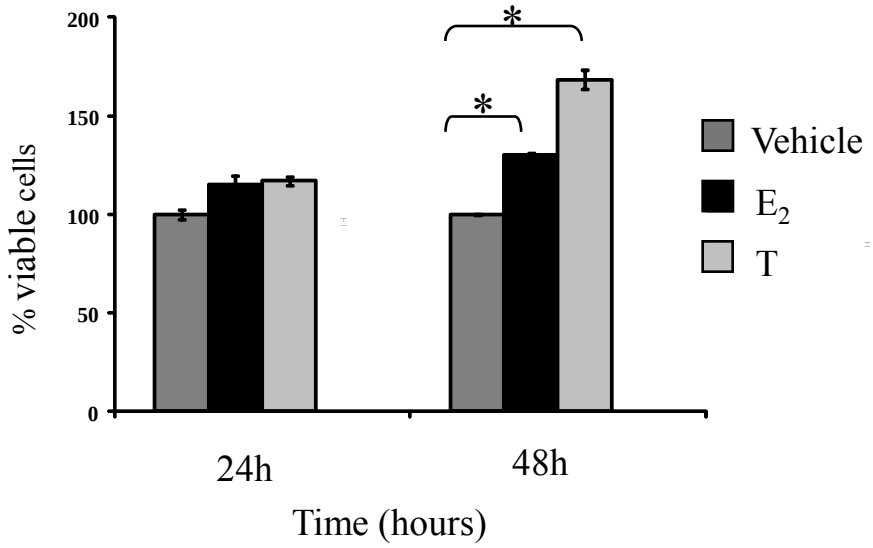
Gene	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
qRPLPO	GGCGACCTGGAAGTCCAACT	CCATCAGCACCACAGCCTTC
qER36	CCAAGAATGTTCAACCACAACCT	GCACGGTTCATTAACATCTTTCTG
CYP19 (AROM)	CTGGAAGAATGTATGGACTT	GATCATTTCCAGCATGTTTT
RPLPO	ACAACCCAGCTCTGGAGAAA	TCGTTTGTACCCGTTGATGA
GPER	TGGTGGTGAACATCAGCTTC	AAGCTCATCCAGGTGAGGAA

2

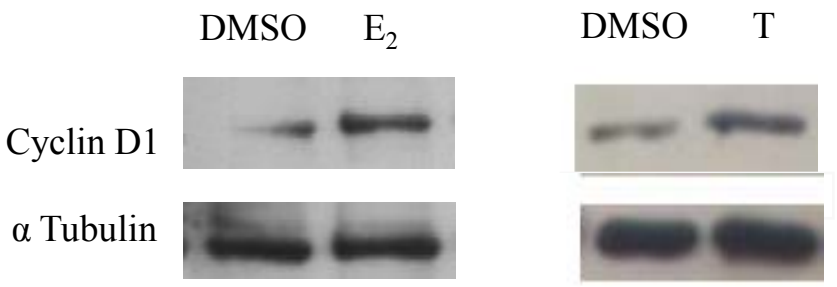
3

Figure 1

A)


200
150
100
50
0
% viable cells
*
*
Vehicle
E2
T
24h
48h
Time (hours)

B)


DMSO
E2
DMSO
T
Cyclin D1
α Tubulin

C)

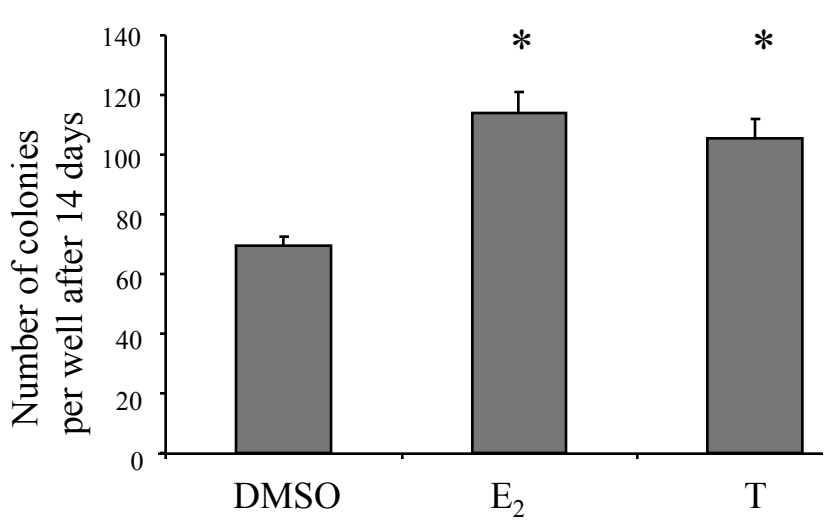
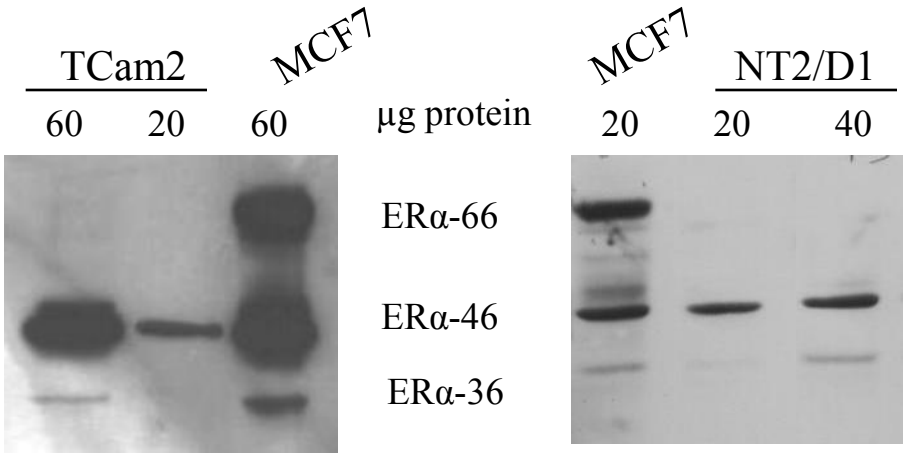
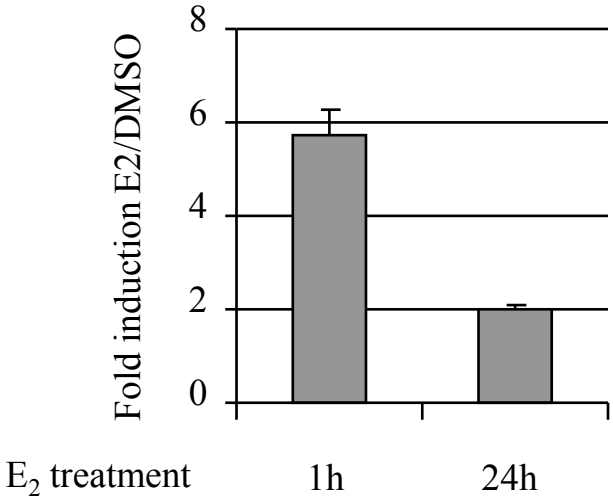

140
120
100
80
60
40
20
0
Number of colonies
per well after 14 days
*
*
DMSO
E2
T

Figure 2

A)


TCam2
MCF7
MCF7
NT2/D1
60
20
60
µg protein
20
20
40
ERα-66
ERα-46
ERα-36

B)


Fold induction E2/DMSO
8
6
4
2
0
E2 treatment
1h
24h

C)

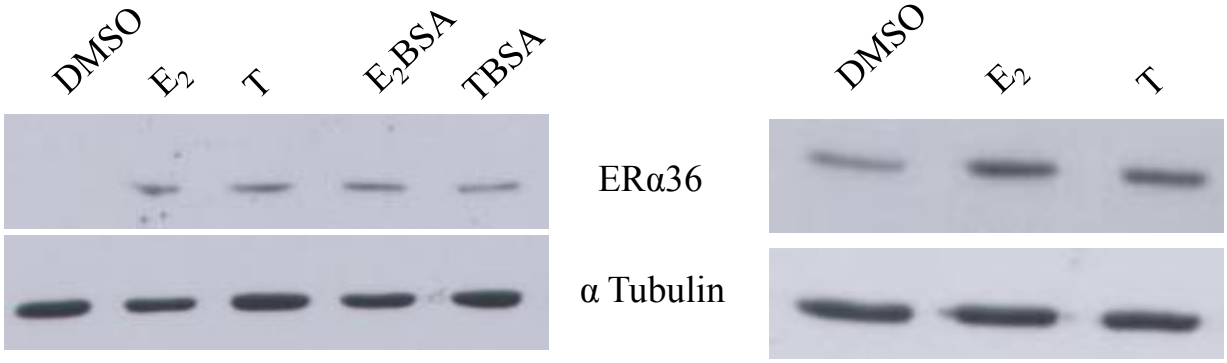

DMSO
E2
T
E2BSA
TBSA
ERα36
α Tubulin
DMSO
E2
T

Figure 3

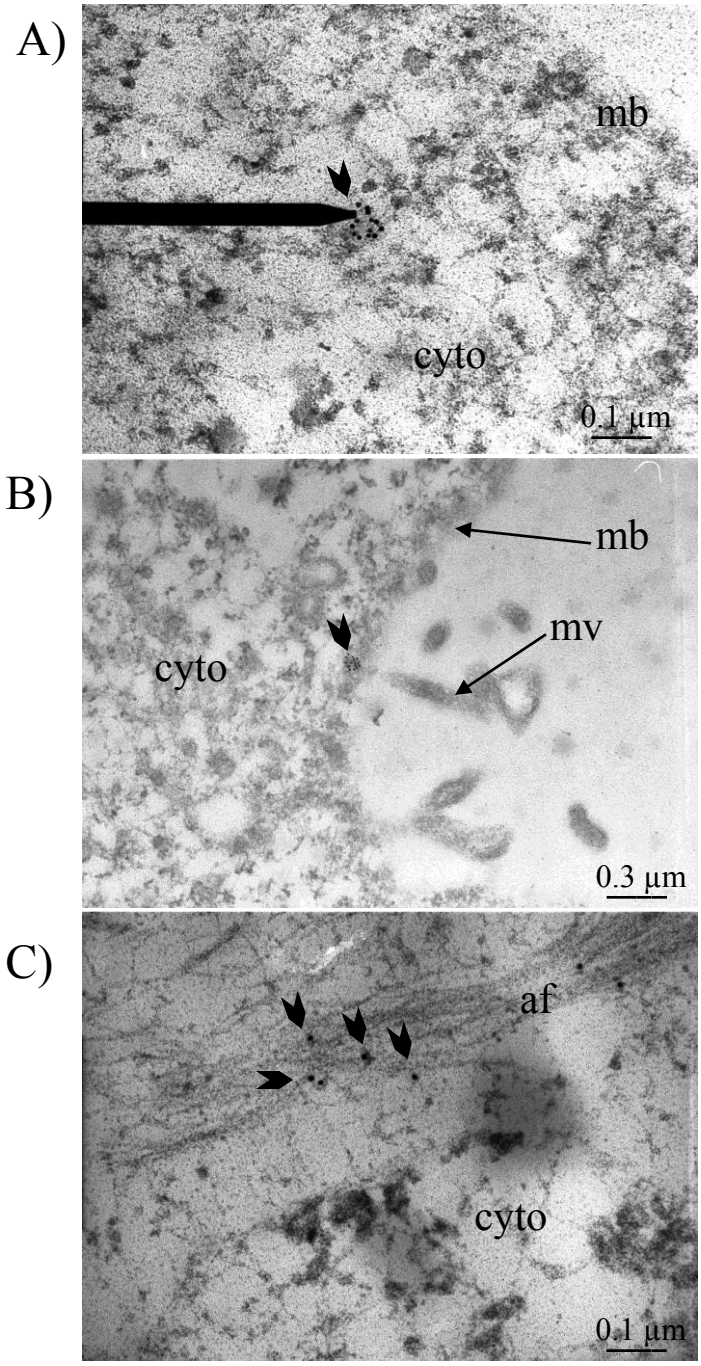
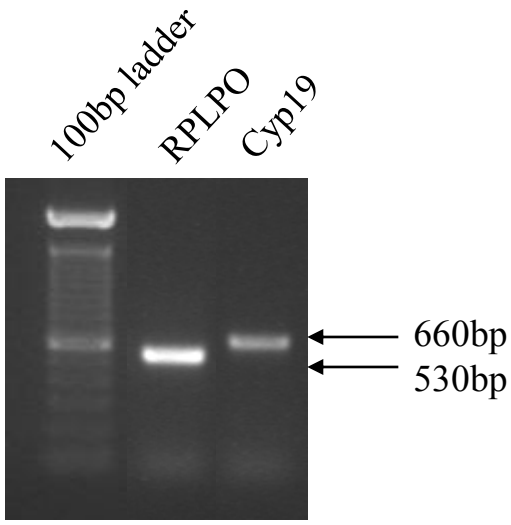


Figure 4

A)


100bp ladder
RPLPO
Cyp19
660bp
530bp

B)

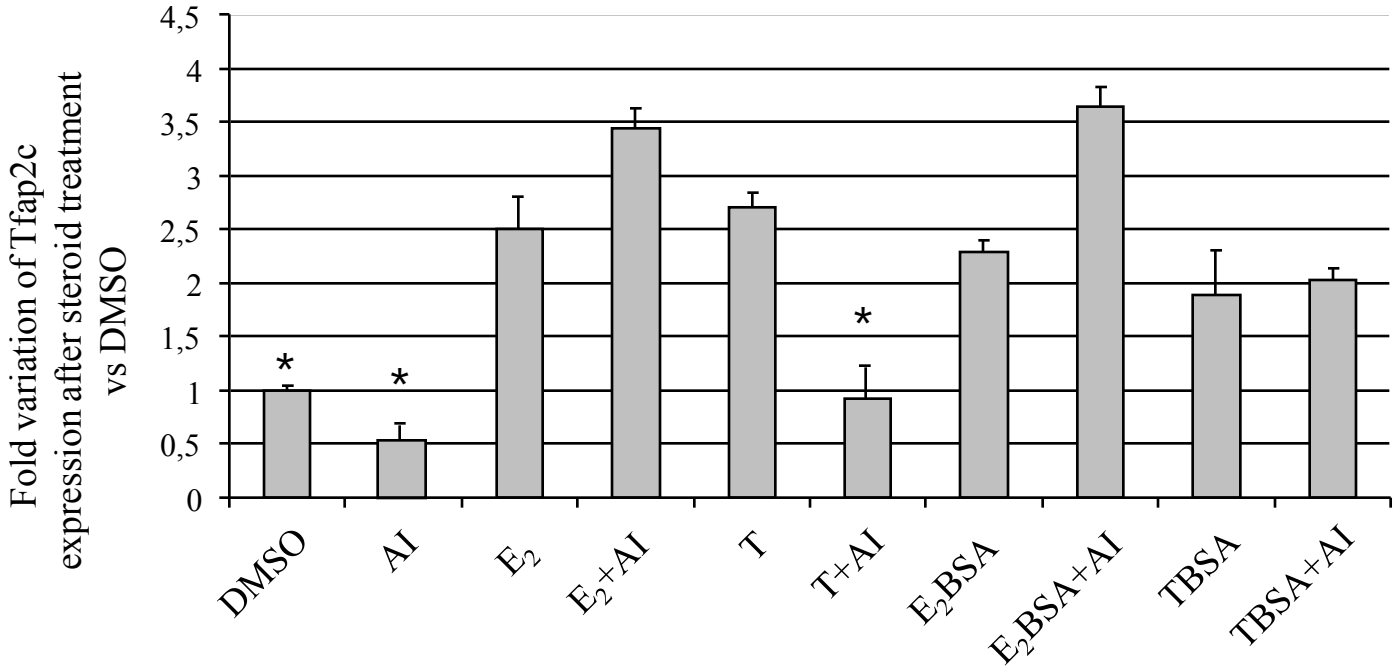
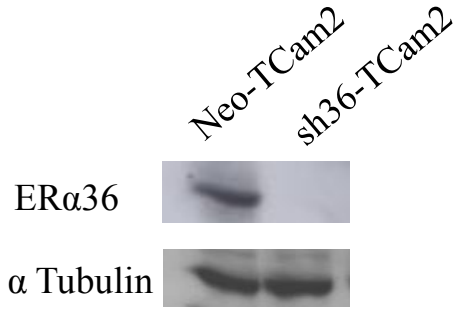

Fold variation of Tfap2c expression after steroid treatment vs DMSO
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*
*
*
DMSO
AI
E2
E2+AI
T
T+AI
E2BSA
E2BSA+AI
TBSA
TBSA+AI

Figure 5

A)


Neo-TCam2
sh36-TCam2
ERα36
α Tubulin

B)

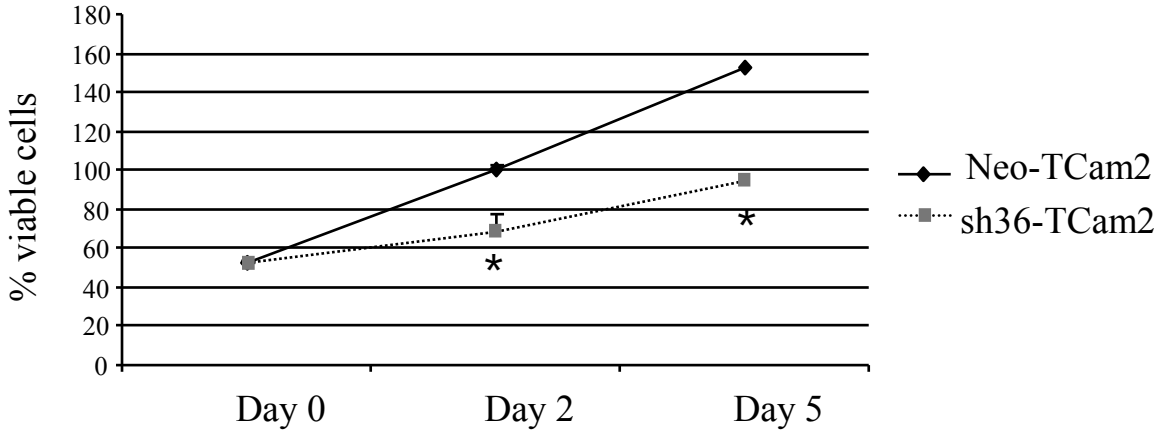
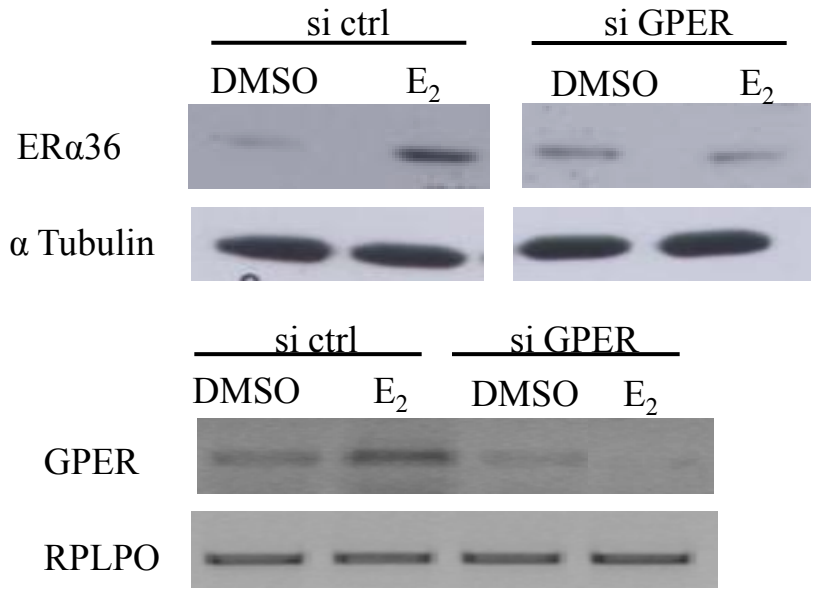

% viable cells
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Day 0
Day 2
Day 5
*
*
Neo-TCam2
sh36-TCam2

Figure 6

A)


si ctrl
si GPER
DMSO
E2
DMSO
E2
ERα36
α Tubulin
si ctrl
si GPER
DMSO
E2
DMSO
E2
GPER
RPLPO

B)

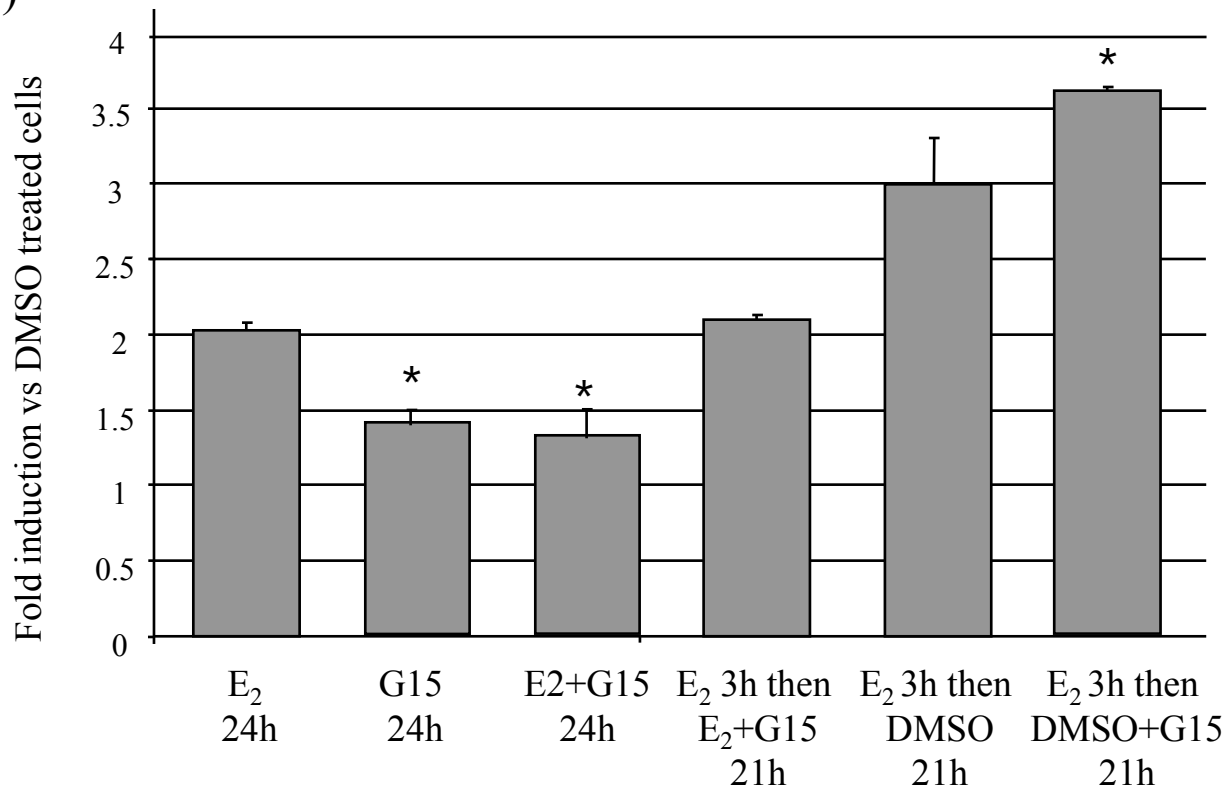

Fold induction vs DMSO treated cells
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
*
E2 24h
G15 24h
E2+G15 24h
E2 3h then E2+G15 21h
E2 3h then DMSO 21h
E2 3h then DMSO+G15 21h

Figure 7

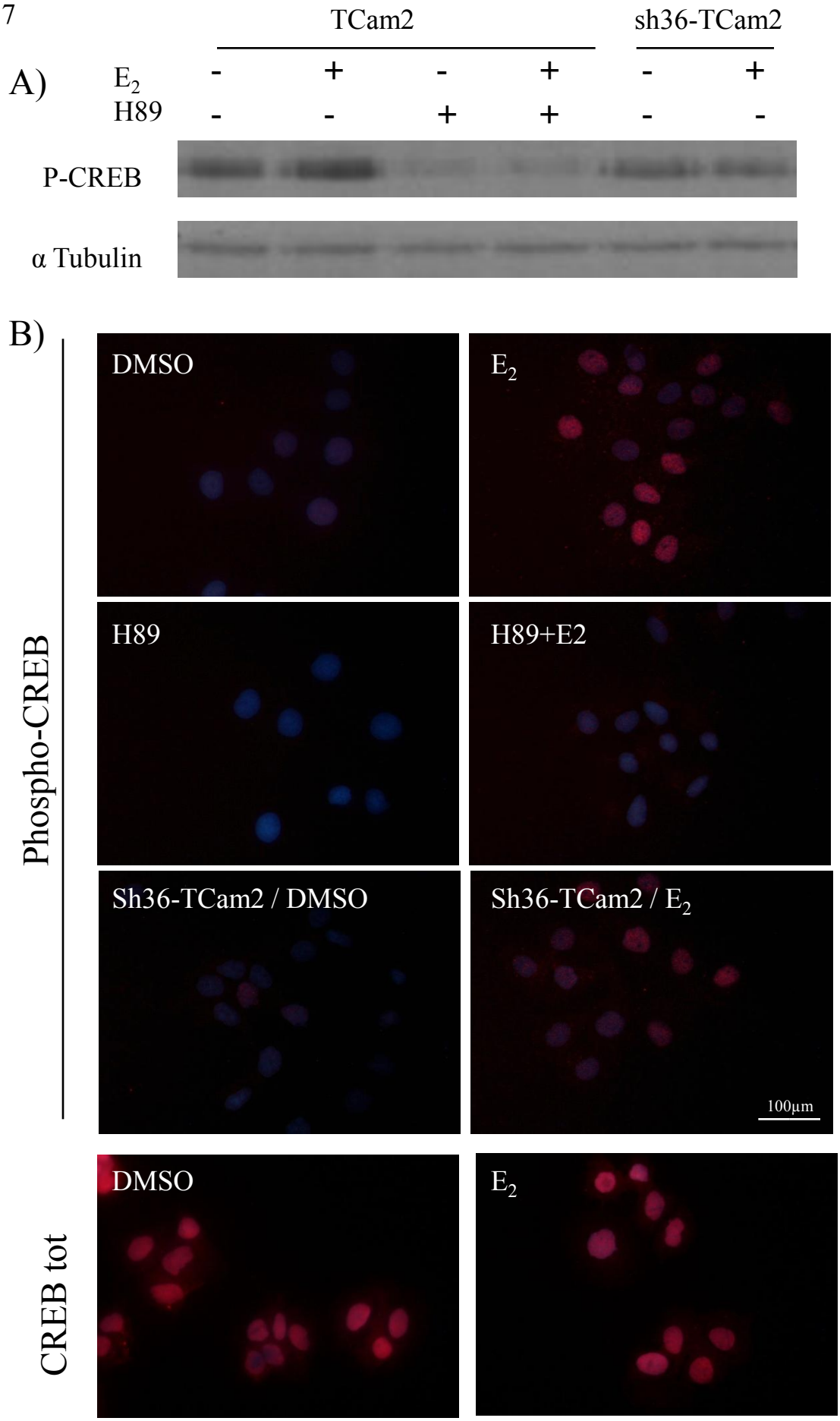
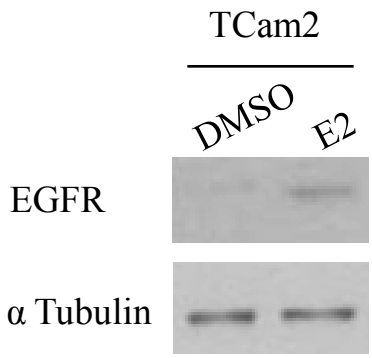
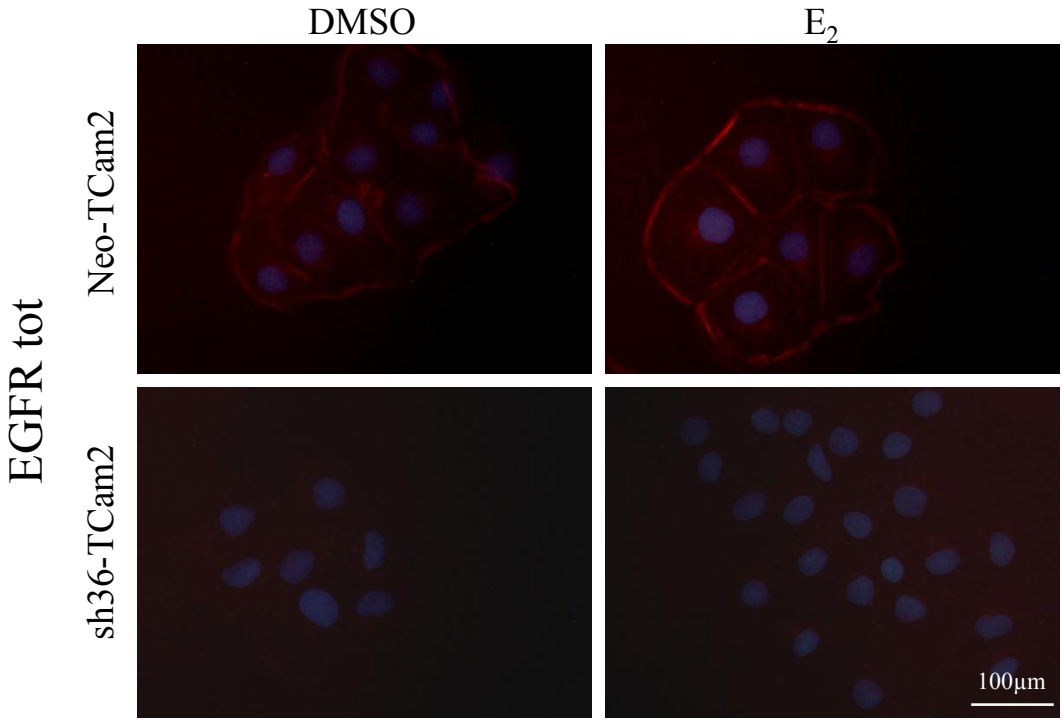

TCam2
sh36-TCam2
A)
E2
H89
- + - + - +
- - + + - -
P-CREB
α Tubulin
B)
Phospho-CREB
DMSO
E2
H89
H89+E2
Sh36-TCam2 / DMSO
Sh36-TCam2 / E2
100µm
CREB tot
DMSO
E2

Figure 8

A)


TCam2
DMSO
E2
EGFR
α Tubulin

B)


DMSO
E2
EGFR tot
Neo-TCam2
sh36-TCam2
100µm

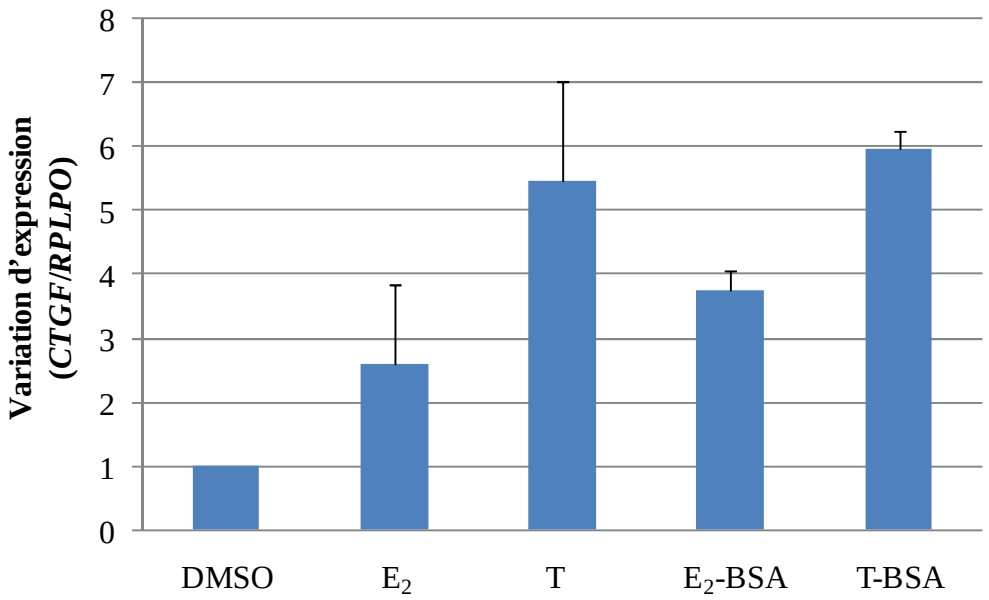


Figure 51 : Effet de traitements par des stéroïdes ou des stéroïdes couplés à la BSA sur l'expression de *CTGF* (un gène cible de GPER). L'expression de *CTGF* est rapportée à l'expression d'un gène de référence *RPLPO* et quantifiée par PCR en temps réel dans les cellules TCam2. Les cellules sont traitées pendant 1 heure avec DMSO (0,01%), E_2 (œstradiol, 1 nM), T (testostérone, 1 µM), E_2-BSA (1 nM) ou T-BSA (1 µM). Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± S.E.M. de deux expériences indépendantes. Le protocole de RT-PCR en temps réel utilisé est décrit dans les matériels et méthodes de l'article précédent. Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées sont montrées dans le tableau 8.

Gène	Amorces sens (5' -3')	Amorces antisens (5' -3')
qRPLPO	GGCGACCTGGAAGTCCAACT	CCATCAGCACCACAGCCTTC
qGPER	CTGGGGAGTTTCCTGCTGA	GCTTGGGAAGTCACACCAT
qCTGF	TCACTGACCTGCCTGTAG	GCTGAGTCTGCTGTTCTG
qcFOS	TCCAGCGAACGAGCAGTGAC	GTGGCTGTTAGGCAAAGC
qcJUN	TAACAGTGGGTGCCAACTCA	CGCAACCAGTCAAGTTCTCA

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

3.4. Résultats complémentaires

3.4.1. Induction de l'expression des gènes cibles de GPER par les stéroïdes dans les cellules TCam2.

Les œstrogènes induisent la prolifération de différentes lignées cancéreuses comme les cellules cancéreuses mammaires et les cellules cancéreuses ovariennes par l'activation du récepteur membranaire GPER (Albanito et al., 2007, 2008). Récemment, plusieurs gènes cibles de GPER ont été décrits comme médiant les effets proliératifs des œstrogènes dans des cellules cancéreuses mammaires (Pandey et al., o2009). La signalisation activée par GPER induit, via une cascade de kinases, l'activation d'un réseau de facteurs de transcription comme CREB. Ce dernier va activer à son tour l'expression d'autres facteurs de transcription comme cFOS, cJUN et EGR1 et également la transcription d'autres gènes comme *CTGF* après une heure de traitement avec l'E_2 (Pandey et al., 2009).

Dans ce contexte, nous avons étudié l'expression d'un gène cible de GPER, *CTGF*, par PCR en temps réel dans les cellules TCam2 traitées pendant une heure avec l'E_2 (1 nM) ou la testostérone (1 µM) (figure 51). Nous remarquons une induction de l'expression de *CTGF* deux fois et demie et cinq fois et demie dans les cellules traitées avec l'E_2 et la testostérone, respectivement. Une induction de l'expression de ce gène est également observée dans les cellules traitées avec les stéroïdes couplés à la protéine BSA (E_2-BSA, 1 nM et T-BSA, 1 µM) après une heure de traitement. Ceci confirme nos résultats qui montrent que le récepteur membranaire GPER est impliqué dans le déclenchement des voies de signalisation des stéroïdes dans les cellules TCam2.

Les cellules TCam2 ont ensuite été transfectées de manière transitoire avec un ARN interférent ciblant *GPER* (siGPER) ou un siRNA témoin. 48 heures après la transfection, les cellules sont traitées à l'E_2 (1 nM) pendant une heure. Afin de vérifier l'efficacité de l'interférence ARN dans ces cellules, nous avons quantifié l'expression de *GPER* par PCR en temps réel (figure 52A). Environ 60% d'inhibition de l'expression de *GPER* a été observée. Nous avons ensuite quantifié l'expression de trois gènes cibles de GPER (*CTGF*, *cFOS* et *cJUN*) dans les cellules transfectées avec un ARN interférent ciblant *GPER* (figure 52B). Une diminution significative de l'expression des gènes cibles de ce récepteur est observée par rapport aux cellules transfectées avec un siRNA témoin. Ces résultats suggèrent que GPER intervient dans la signalisation oestrogénique des cellules TCam2.

Gène	Séquence cible (5’-3’)	Séquences siRNA (5’-3’)
GPER	GCACCTTCATGTCGCTCTT TTGAACACCTCAATGAGGG AAGACTGCTTGCAGGGAGC	Duplex n°1 Sens: GCACCUUCAUGUCGCUCUU Antisens: AAGAGCGACAUGAAGGUGC Duplex n°2 Sens: UUGAACACCUCAAUGAGGG Antisens: CCCUCAUUGAGGUGUUCAA Duplex n°3 Sens: AAGACUGCUUGCAGGGAGC Antisens: GCUCCCUGCAAGCAGUCUU
Témoin négatif	-	Eurogentec SR-CL000-005

Tableau 9 : Séquences d’ARN interférent (siRNA) ciblant GPER. Le siRNA témoin ne possède aucune homologie de séquence avec un gène humain connu.

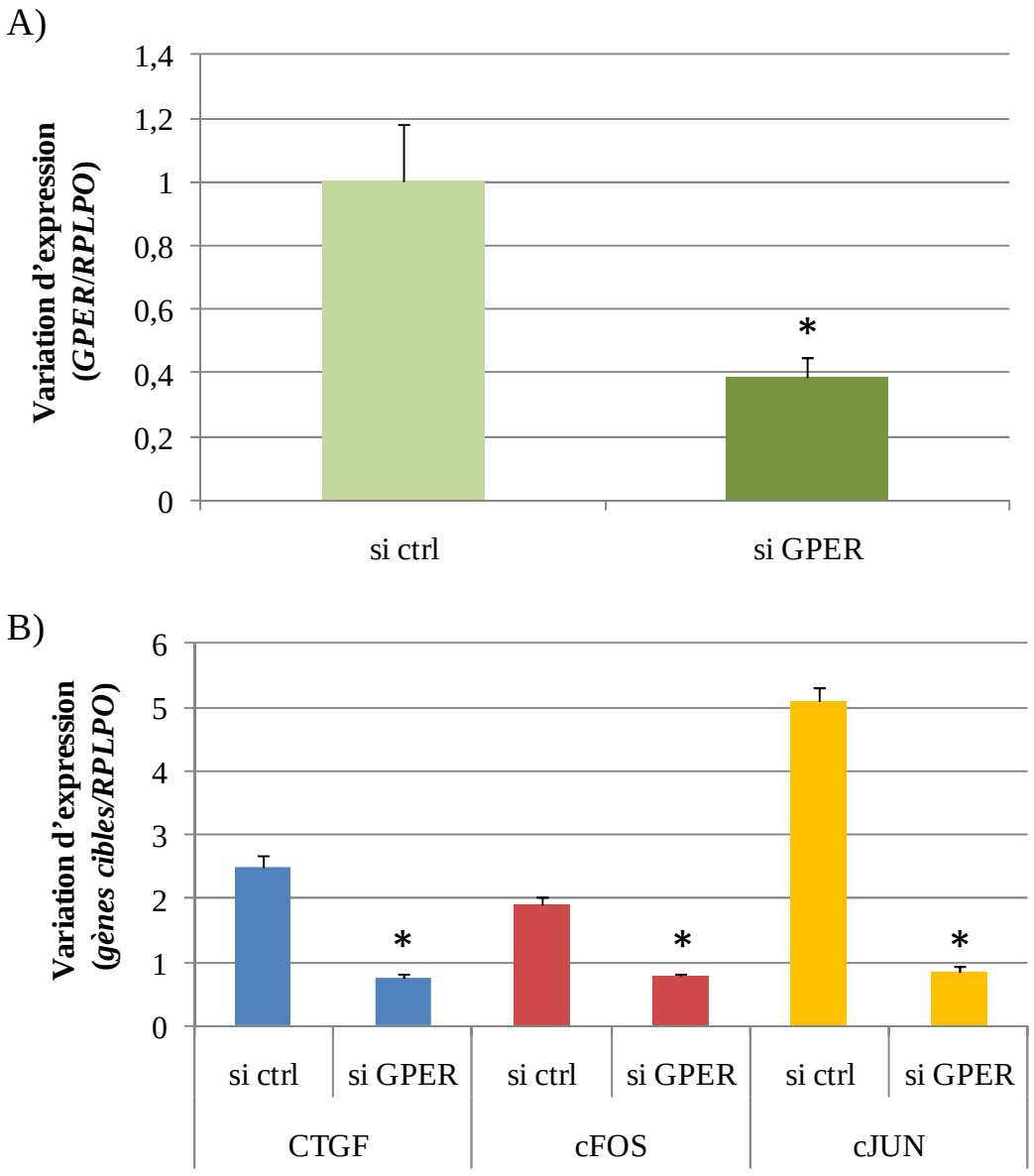


Figure 52 : Effet de l'œstradiol sur l'expression des gènes cibles de GPER dans les cellules TCam2 transfectées de manière transitoire avec un ARN interférent ciblant GPER (si GPER) ou si RNA témoin (si ctrl). A) Efficacité de la transfection transitoire avec si GPER ou si ctrl. L'expression de *GPER* est rapportée à l'expression du gène de référence *RPLPO* et quantifiée par PCR en temps réel dans les cellules TCam2 traitées pendant 1 heure avec DMSO (0,01%) ou E_2 (1 nM). B) L'expression de *CTGF*, *cFOS* et *cJUN* est rapportée à l'expression d'un gène de référence *RPLPO* et quantifiée par PCR en temps réel dans les cellules TCam2 traitées pendant 1 heure avec E_2 (1 nM). Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± S.E.M. de trois expériences indépendantes. *, significativement différent des cellules transfectées avec si ctrl. Les protocoles de transfection par ARN interférence et de RT-PCR en temps réel utilisés sont décrits dans le chapitre « matériels et méthodes » de l'article précédent. Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées sont montrées dans le tableau 8. Les séquences siRNA ciblant GPER sont montrées dans le tableau 9.

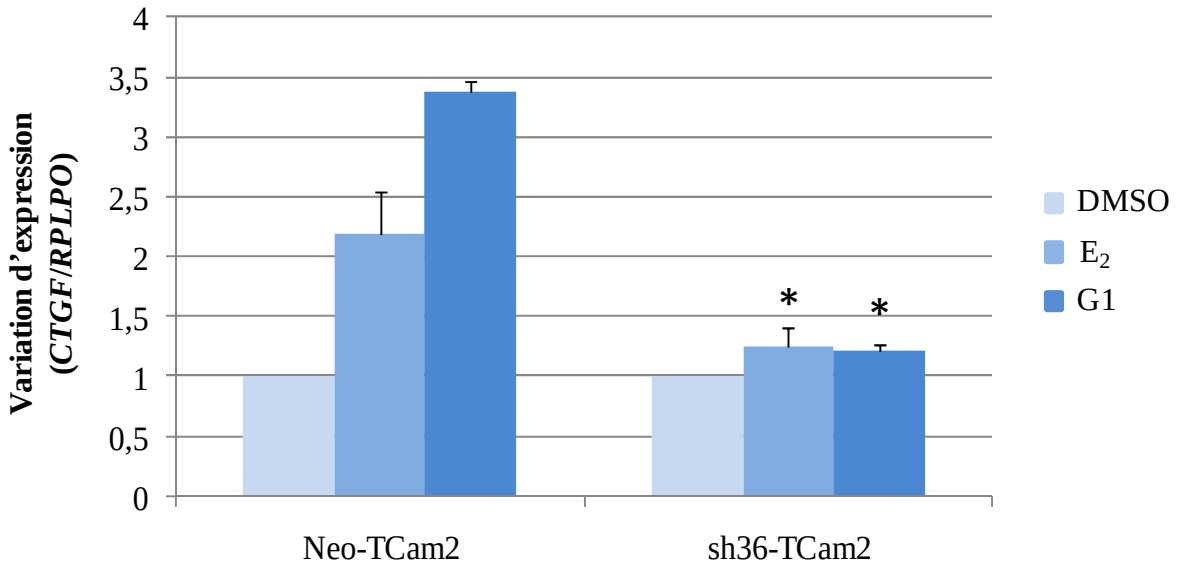


Figure 53 : Effet de traitements par l'œstradiol ou G-1 (agoniste spécifique du GPER) sur l'expression de *CTGF* (un gène cible de GPER). L'expression de *CTGF* est rapportée à l'expression d'un gène de référence *RPLPO* et quantifiée par PCR en temps réel dans les cellules Neo-TCam2 et sh36-TCam2. Ces deux lignées sont traitées pendant 1 heure avec DMSO (0,01%), E_2 (œstradiol, 1 nM) ou G-1 (100 nM). Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± S.E.M. de trois expériences indépendantes. *, significativement différent des cellules Neo-TCam2. Le protocole de RT-PCR en temps réel utilisé est décrit dans le chapitre « matériels et méthodes » de l'article précédent. Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées sont montrées dans le tableau 8.

Pour savoir si le récepteur ERα36 est capable de médier la signalisation oestrogénique déclenchée par GPER dans les cellules TCam2, nous avons bloqué l'expression d'ERα36 de façon stable par ARN interférence (shARN). Les cellules TCam2 dont l'expression d'ERα36 est inhibée (sh36-TCam2) et les cellules témoins transfectées avec un vecteur vide (Neo-TCam2) sont traitées pendant une heure avec E_2 ou G-1 (agoniste spécifique de GPER). L'expression de *CTGF* a été quantifiée dans ces deux lignées cellulaires par PCR en temps réel (figure 53). L'induction de l'expression de *CTGF* observée dans les cellules Neo-TCam2 traitées avec E_2 ou G-1 est significativement inhibée dans les cellules sh36-TCam2 traitées par les mêmes molécules.

Ces résultats confirment les données présentées dans la publication indiquant l'implication du récepteur membranaire des œstrogènes dans le déclenchement de la signalisation induite par les stéroïdes dans les cellules TCam2. L'isoforme tronquée du récepteur alpha des œstrogènes, ERα36, intervient également dans les voies de signalisation oestrogéniques.

3.4.2. Le récepteur ERβ joue-t-il un rôle dans la réponse à l'œstradiol des cellules TCam2 ?

Dans le testicule humain adulte, deux isoformes du récepteur bêta des œstrogènes sont exprimées, ERβ1 et ERβ2. ERβ1 représente l'isoforme sauvage fonctionnelle du récepteur tandis qu'ERβ2 est une isoforme qui ne possède pas certains acides aminés essentiels pour fixer l'E_2. En revanche, le récepteur alpha des œstrogènes Erα66 n'a pas été détecté dans le testicule (Saunders et al., 2002). Les deux isoformes d'ERβ mais pas ERα66 sont détectés dans les tumeurs séminomateuses (Rago et al., 2009). Dans la lignée TCam2, la forme longue d'ERα (66 kDa) n'est pas exprimée. Par contre, nous y avons détecté par RT-PCR une faible expression d'ERβ. Parallèlement, au niveau protéique, l'utilisation d'un anticorps spécifique anti-ERβ a permis de détecter par immunofluorescence un marquage nucléaire très faible dans les cellules TCam2 (données non montrées).

Stossi et al. ont identifié un certain nombre de gènes dont l'expression est régulée par les œstrogènes via le récepteur ERβ dans les cellules d'ostéosarcome humain (U2OS) (Stossi et al., 2004). Nous avons quantifié par PCR en temps réel l'expression des deux gènes décrits comme cibles spécifiques d'ERβ : l'Autotaxine (*ENPP2*) intervenant dans la stimulation de la migration des cellules de mélanome et la Cystatin D codant une protéine impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire. Ces gènes sont faiblement exprimés dans les cellules TCam2 et leur expression n'est pas modifiée par l'E_2 (données non montrées).

Nous avons traité les cellules TCam2 avec l'E_2 (1 nM) pendant 24 heures. Les cellules ont été transfectées par un plasmide qui possède un gène rapporteur codant la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément de réponse aux œstrogènes soit (1 µg, ERE1-TK-Luc, Pr Didier Picard, université de Genève, Suisse) soit (1 µg, ERE3-SV40-Luc, (Kudoh et al., 1996)). Un contrôle positif permettant la détection de l'activité luciférase (pGL3-Promoter vector, Promega) et un contrôle de niveau de base d'expression de luciférase (pGL3-Basic vector, Promega) ont été aussi utilisés. La mesure de l'activité luciférase n'a pas montré une induction par l'E_2 (données non montrées). Ces résultats suggèrent qu'ERβ n'est pas exprimé en quantité suffisante pour activer la luciférase ou bien qu'ERβ ne médie pas l'effet de l'E_2 dans les cellules TCam2.

Enfin, la transfection des cellules TCam2 avec un ARN interférent ciblant *ERβ* n'a pas modifié l'induction par l'E_2 de l'expression des gènes cibles de GPER comme *ERα36* et *CTGF*.

L'ensemble de ces observations suggèrent fortement qu'ERβ n'intervient pas dans les voies de signalisation oestrogéniques dans les cellules TCam2.

4. Discussion et perspectives

L'objectif général de l'étude consistait à déterminer l'influence des stéroïdes sur la prolifération des cellules séminomateuses TCam2 et à identifier les voies de signalisation activées. Sur la base de nombreux travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* montrant qu'ERα36 intervient dans l'induction de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, nous nous sommes focalisés sur le rôle d'ERα36 dans la progression des tumeurs testiculaires germinales. Ces travaux sont poursuivis dans la perspective d'aborder l'étude de cette protéine lors de l'initiation de ces tumeurs chez les fœtus humains.

4.1. Quel est le rôle d'ERα36 dans la progression des tumeurs testiculaires?

Au cours de notre étude, nous avons montré que les hormones stéroïdes (l'œstradiol et la testostérone) stimulent la prolifération des cellules séminomateuses humaines TCam2. Les stéroïdes activent la voie AMPc/PKA par le biais d'un récepteur membranaire non spécifique des œstrogènes, GPER. Les cellules TCam2 n'expriment pas le récepteur alpha des œstrogènes (ERα66$^-$) mais une isoforme tronquée de ce récepteur de 36 kDa dite ERα36. L'expression de cette isoforme est induite par les stéroïdes dans les cellules TCam2. Lorsque l'expression d'*ERα36* est inhibée de manière permanente par ARN interférence, les cellules prolifèrent moins vite même en présence d'E_2. ERα36 intervient ainsi dans la prolifération de la lignée TCam2. Les travaux de Zhang et al. montrent que l'E_2 stimule *in vitro* la prolifération des lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MDA-MB-436 (ERα66$^-$/ERα36$^+$) (Zhang et al., 2010). Pour savoir si ERα36 est à l'origine de la prolifération cellulaire et la progression tumorale *in vivo*, l'expression d'*ERα36* est inhibée par ARN interférence dans les deux lignées cellulaires. Une injection sous-cutanée de ces cellules a été réalisée dans le tissu adipeux de souris Nude ovariectomisées et préalablement traitées avec l'E_2 pendant cinq jours. Des souris injectées de cellules dont l'expression d'*ERα36* n'est pas bloquée sont utilisées comme témoins. Quelques semaines après l'injection, des tumeurs sont observées chez ces souris témoins, le traitement avec l'E_2 induisant un volume tumoral plus grand. Les souris injectées par des cellules dont l'expression d'*ERα36* est inhibée présentent des petites tumeurs uniquement si elles ont été traitées avec l'E_2. L'utilisation d'un modèle de souris xénogreffées (actuellement en cours de mise au point au laboratoire, voir la fin de ce

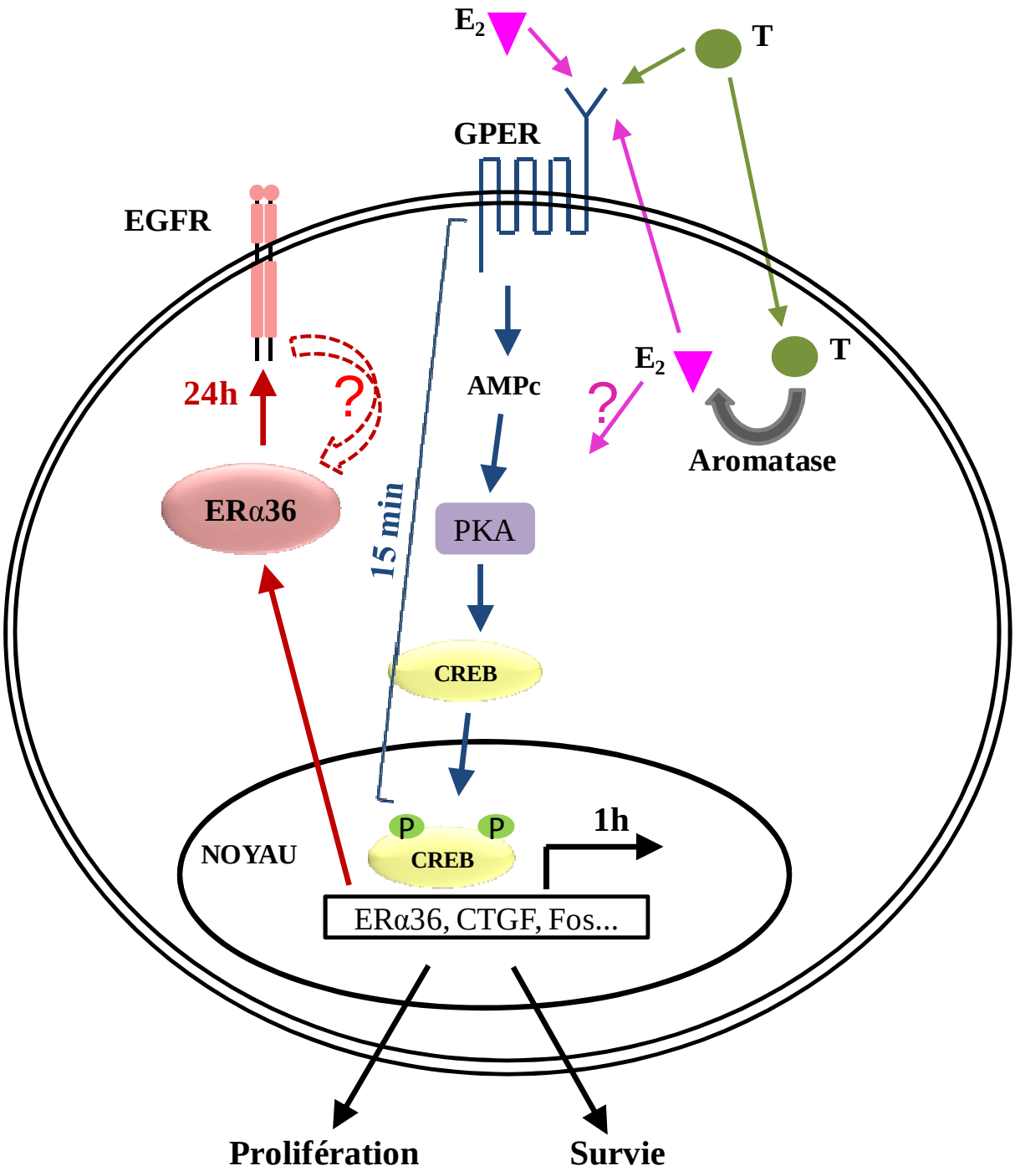


Figure 54: Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la réponse à l'œstradiol dans les cellules TCam2.

paragraphe) par des cellules TCam2 ou sh36-TCam2 permettrait de valider *in vivo* le rôle d'ERα36 dans la progression des tumeurs séminomateuses.

Zhang et al. ont aussi montré que l'E_2 stimule la prolifération tumorale en activant la voie MAPK/ERK via un rétrocontrôle positif entre EGFR et ERα36 (Zhang et al., 2010). Parallèlement, l'activation de la voie MAPK/ERK et également la voie PI3K/AKT par la testostérone sont médiées par ERα36 dans les cellules de cancer de l'endomètre Hec1A qui n'expriment pas ERα66 (Lin et al., 2009). Pour notre part, *in vitro* nous avons montré qu'ERα36 induit l'expression du récepteur à l'EGF dans les cellules TCam2. Il serait intéressant d'étudier maintenant sa fonctionnalité. Dans le modèle de tumeurs xénogreffées, il serait également intéressant de montrer l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif entre ERα36 et EGFR. Ces deux protéines pourraient alors être utilisées comme marqueurs de progression tumorale dans les TGCTs.

Concernant la localisation d'ERα36 dans les cellules TCam2, l'observation en microscopie électronique à transmission montre qu'il est localisé sous la membrane plasmique à la bordure endoplasme/ectoplasme, associé avec les microfilaments d'actine. La même localisation est observée dans les cellules TCam2 traitées avec E_2. ERα36 possède trois sites potentiels de myristoylation qui lui donnent la possibilité de se fixer au niveau de la membrane plasmique (Wang et al., 2005). Des fractions nucléaire, cytosolique et membranaire ont été analysées par western blot à partir de cellules HEK293 transfectées avec un vecteur exprimant ERα36 de façon stable (Wang et al., 2006). La quantification d'ERα36 dans chaque fraction a montré qu'environ 50% est localisé dans la membrane plasmique et 40% dans le cytosol. De plus, l'étude de Lin et al. a montré qu'ERα36 est associé à la membrane plasmique des cellules Hec1A (Lin et al., 2009). Une autre étude a également montré une localisation membranaire et cytoplasmique d'ERα36 dans des coupes tissulaires des tumeurs mammaires analysées par immunohistochimie (Lee et al., 2008). Dans les cellules TCam2, ERα36 n'est pas localisé au niveau de la membrane plasmique mais dans le cytoplasme. De ce fait, on peut se demander si la fonction de ce récepteur est différente selon sa localisation.

Nos travaux ont montré dans les cellules TCam2 que le récepteur membranaire GPER peut médier l'action non-génomique des oestrogènes. La signalisation déclenchée par GPER conduit à l'induction de l'expression d'ERα36 (figure 54). Ce dernier agit à son tour comme un récepteur extranucléaire des œstrogènes pour médier les voies de signalisation non-génomiques. Ces observations sont cohérentes avec les travaux de Kang et al. montrant

qu'*ERα36* agit comme gène cible de GPER dans plusieurs lignées cellulaires (Kang et al., 2010). Il est à noter que les gènes cibles d'ERα36 sont pour l'instant inconnus. Par ailleurs, un certain nombre de gènes a été récemment identifié comme cible du récepteur GPER dans des cellules cancéreuses mammaires, notamment le gène *CTGF* (Pandey et al., 2009). En effet, une induction de l'expression de ce gène est observée après une heure de traitement avec l'E_2 dans les cellules SKBR3 qui n'expriment pas les ERs mais seulement le récepteur GPER. L'inhibition de l'expression de ce récepteur par ARN interférence bloque l'induction de l'expression de *CTGF* par l'E_2 (Pandey et al., 2009). Dans les cellules TCam2, nos résultats ont montré que l'inhibition de l'expression de *GPER* par ARN interférence bloque l'induction de l'expression *CTGF*, *cFOS* et *cJUN* par l'E_2 .Parallèlement, dans les cellules TCam2, l'implication de GPER dans les voies de signalisation non-génomiques des stéroïdes est confortée par l'utilisation des stéroïdes couplés à la BSA qui ne peuvent pas traverser la membrane plasmique. Ces stéroïdes sont capables d'induire l'expression d'ERα36 qui agit en aval de GPER. Une induction de l'expression de *CTGF* détectée par RT-PCR quantitative est également observée après une heure de traitement avec les stéroïdes couplés à la BSA. De plus, un doctorant au laboratoire a montré que l'inhibition de l'expression du récepteur des androgènes par ARN interférence dans les cellules TCam2, ne bloque pas l'induction de l'expression des gènes cibles de GPER comme *CTGF* par la testostérone. L'ensemble de ces résultats confirme que GPER est impliqué dans le déclenchement des voies de signalisation des stéroïdes dans les cellules TCam2.

Les anti-œstrogènes sont des molécules utilisées dans la thérapie de certains cancers mammaires. Ils bloquent l'action des œstrogènes en se fixant à la place de l'œstradiol sur les ERs. Le tamoxifène représente le composé le plus utilisé dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendants ($ERα66^+$). Il est à noter que le tamoxifène agit comme agoniste partiel ou antagoniste partiel pour ERα66 selon les tissus. L'inefficacité de cette molécule dans le traitement des cancers du sein $ERα36^+$ semble due à son activité agoniste sur ERα36. En effet, les travaux de Wang et al. ont montré *in vitro* que le tamoxifène agit comme agoniste et active la voie MAPK/ERK dans les cellules HEK293 transfectées par un vecteur exprimant ERα36 de façon stable (Wang et al., 2006).

ICI 182,780 est un antagoniste pur d'ERα66, il n'a pas d'effet agoniste. ICI 182,780 se fixe sur ERα66, provoque un changement conformationnel du récepteur ce qui va empêcher sa dimérisation et induit sa dégradation. L'étude de Kang et Wang a montré dans les cellules MCF-7 ($ERα66^+/ERα36^+$) que ICI 182,780 accélère la dégradation de la protéine ERα66 et

inhibe la prolifération cellulaire de façon dose-dépendante. Cependant, il n'affecte pas le niveau d'ARNm ou de protéine ERα36. Parallèlement, dans les cellules SKBR3 et MDA-MB-231 (ERα66$^-$/ERα36$^+$), ICI 182,780 n'a pas d'effet sur la dégradation de ERα36 ni sur la prolifération cellulaire de ces deux lignées (Kang et Wang, 2010). En effet, il a été montré qu'une altération de l'hélice 12 du domaine LBD du récepteur ERα66 induit sa stabilisation et empêche sa dégradation en présence d'ICI 182,780. Ceci indique que l'hélice 12 intervient dans la dégradation d'ERα66 par le protéasome en présence d'ICI 182,780. Cependant ERα36 possède un domaine LBD tronqué à qui il manque les quatre dernières hélices (hélices 9-12) d'ERα66. L'absence de l'hélice 12 du récepteur ERα36 pourrait expliquer l'absence de l'effet de ICI 182,780 sur la dégradation d'ERα36. Ces résultats expliquent en partie la résistance des cellules exprimant ERα36 aux traitements anti-œstrogéniques dirigés contre ERα66 (Kang et Wang, 2010).

Les observations *in vitro* de l'implication d'ERα36 dans les cellules tumorales résistantes aux anti-œstrogènes ont été confirmées *in vivo*. Une étude a montré qu'environ 40% des patientes présentant des tumeurs mammaires ERα66$^+$ expriment un taux élevé d'ERα36 dans leur tumeur. Chez ces patients (ERα66$^+$), la surexpression d'ERα36 est significativement associée à un taux de survie faible. La chimiothérapie est plus efficace dans le traitement de ces patients par rapport à l'utilisation du tamoxifène qui ne bloque pas l'initiation des voies de signalisation oestrogéniques médiées par ERα36. Les auteurs concluent à une association entre l'expression d'ERα36 et la résistance au tamoxifène dans les tumeurs cancéreuses mammaires et qu'ERα36 peut être une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de ces tumeurs (Shi et al., 2009).

Néanmoins, une autre étude a montré qu'en mesurant le niveau d'ARNm d'ERα36 dans des tissus mammaires normaux et cancéreux, ERα36 est moins exprimé dans les tissus cancéreux. L'expression d'ERα36 est moins élevée dans les tumeurs cancéreuses du sein qui mesurent plus de 2 cm et également dans les tumeurs métastatiques. Ces observations suggèrent que la diminution de l'expression d'ERα36 est associée à la progression des tumeurs cancéreuses mammaires (Zheng et al., 2010). Les mécanismes qui expliqueraient ce paradoxe entre les deux études restent à déterminer et permettraient de savoir dans quelle mesure ERα36 pourrait constituer un marqueur de progression tumorale dans le cancer du sein.

Dans une première étape de cette étude, nous avons montré que les hormones stéroïdes stimulent la prolifération de cellules TCam2 issues d'une tumeur testiculaire d'origine

germinale. Nous avons également déterminé les voies de signalisations et les gènes cibles régulés par les œstrogènes.

Comme cela a été détaillé dans l'introduction, paragraphe III.1.3.3, les micropolluants à effet œstrogéno-mimétique sont susceptibles d'accélérer la croissance des tumeurs testiculaires. Dans une deuxième étape, il serait intéressant d'étudier les effets des micropolluants à potentialité oestrogénique sur la prolifération *in vitro* de la lignée TCam2 ainsi que la lignée de carcinome embryonnaire NT2/D1. Nous pourrions développer par la suite un modèle de souris Nude xénogreffées par ces cellules et traitées par les mélanges de micropolluants.

Par ailleurs, l'impact des perturbateurs endocriniens sur la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* a été montré par l'utilisation de la lignée JKT-1, lignée cellulaire dérivée d'une tumeur séminomateuse humaine. En effet, l'étude de Bouskine et al. a montré que le BPA stimule la prolifération de la lignée JKT-1 à des doses très faibles (10^{-9} à 10^{-12}M). L'exposition au BPA induit l'activation du récepteur membranaire GPER conduisant à la stimulation des voies PKA et PKG. Ces kinases stimulent la phosphorylation du facteur de transcription CREB (Bouskine et al., 2009).

Au laboratoire, l'étude de l'impact des micropolluants sur la prolifération *in vitro* de la lignée TCam2 est initiée. Deux mélanges de molécules œstrogéno-mimétiques ont été choisis afin de déterminer leur effet sur la croissance de cette lignée cellulaire : Mélange M2 : octylphénol + nonylphénol, Mélange M3 : estriol + estrone + mestranol + prednisolone. Les cellules ont été exposées aux molécules isolées ou à chaque mélange dans lequel les concentrations finales de chaque molécule étaient 10^{-8}M, 10^{-10}M ou 10^{-12}M. Concernant l'effet des micropolluants sur la prolifération cellulaire *in vitro*, des mesures de la répartition des cellules TCam 2 dans les phases G0-G1, S et G2 du cycle cellulaire après traitement pendant 24 heures avec ces mélanges ont été analysés par cytométrie en flux. Les premiers résultats indiquent un effet commun aux différents mélanges : une augmentation du nombre de cellules en phase G2.

Suite à ces résultats, nous pourrions étudier les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire notamment l'implication d'ERα36. Si une induction de l'expression d'ERα36 est observée dans les cellules TCam2 et NT2/D1 (ERα66^{-}/ERα36^{+}) après traitement par ces polluants, ERα36 pourrait être considéré comme un marqueur d'exposition à ces perturbateurs endocriniens. De plus, il serait intéressant de déterminer par puces à ADN

l'ensemble des gènes cibles de l'E_2 ou du mélange qui se révélera le plus inducteur de prolifération dans notre étude dans la lignée TCam2. La même étude réalisée dans la lignée sh36-TCam2 n'exprimant plus ERα36 permettrait également d'identifier les gènes cibles et de préciser le rôle d'ERα36 dans la réponse à ces molécules.

Enfin, la mise au point du modèle de souris Nude xénogreffées a été initié. En effet, des essais d'implantation sous-cutanée de cellules TCam2 ont été réalisées récemment sur souris Nude femelles. Mais ces essais n'ont donné lieu à aucune prise tumorale, même à forte concentration (10^7 cellules/mL). Une injection intra-testiculaire des cellules TCam2 et NT2/D1 a alors été effectuée à trois concentrations : 10^5, 10^6 et 10^7 cellules/mL à raison d'environ 30 µL de suspension par testicule. Deux mois et demi après l'injection, les tumeurs ont atteint un volume d'environ 2 cm^3 pour les deux lignées. La croissance tumorale étant rapide, nous ne pourrons pas effectuer de traitements chroniques. Nous proposons alors de prétraiter les souris pendant 14 jours avant injection intra-testiculaire des cellules ; ou avant implantation sous-cutanée du greffon tumoral récupéré de la première injection intra-testiculaire puis de poursuivre les traitements pendant les jours suivants.

L'ensemble de ces données permettra, à terme, de préciser le rôle d'ERα36 dans la réponse des tumeurs germinales testiculaires aux micropolluants œstrogéno-mimétiques.

4.2. Quel est le rôle d'ERα36 dans l'initiation des tumeurs testiculaires ?

Chez les mammifères, le traitement par les hormones stéroïdes sexuelles (5-10 mg) pendant la vie fœtale affecte l'ensemble du tractus génital et de ses dérivés. La différenciation des gonades n'est pas modifiée par les traitements hormonaux chez les Euthériens, alors que chez les Marsupiaux, l'E_2 provoque une féminisation marquée des gonades chez les mâles génétiques. C'est le seul cas connu chez les mammifères d'une inversion partielle du sexe des gonades induite par les stéroïdes (Gallien, 1973). Néanmoins, une publication récente a comparé les données de la littérature concernant les effets *in vivo* d'une exposition prénatale à l'E_2 ou à des composés œstrogéno-mimétiques (DES, BPA ou éthinyl-œstradiol) sur le développement testiculaire chez les rongeurs. Une altération du nombre de gonocytes, de cellules de Sertoli et de Leydig ainsi que de la production de la testostérone intra-testiculaire a été observée chez les animaux traités (Delbès et al., 2006).

Par ailleurs, les travaux de Delbès et al. ont montré que l'invalidation d'ERβ chez les souris mâles conduit à une augmentation de 50% du nombre de gonocytes à 2 jpp. En

revanche, l'invalidation d'ERα ne modifie pas le nombre des CGs mais augmente la production de testostérone qui s'observe dès 13,5 jpc. Ces observations démontrent alors un effet négatif des œstrogènes endogènes sur les fonctions et le développement du testicule pendant la vie fœtale et néonatale (Delbès et al., 2004, 2005). Ces effets oestrogéniques sont médiés par les deux types de récepteurs des oestrogènes ERα et ERβ dont l'expression de ces récepteurs est détectée au cours du développement testiculaire chez les rongeurs (O'Donnell et al., 2001). En revanche, il serait intéressant de déterminer si l'isoforme tronquée ERα36 est exprimée dans la lignée germinale au cours du développement embryonnaire. Nous pourrons aussi déterminer son rôle au cours de ce processus en effectuant soit des KO soit de la surexpression de ce récepteur. Ceci permettra de mieux caractériser le phénotype des CGs au cours du développement testiculaire.

Le récepteur membranaire GPER est fortement exprimé dans les cellules cancéreuses TCam2 et NT2/D1 (Franco et al., 2011). De plus, plusieurs composés oestrogéniques ou œstrogèno-mimétiques sont capables d'agir comme agonistes ou antagonistes de GPER et ainsi de moduler les voies de signalisation médiées par ce récepteur. L'étude de l'expression de GPER dans la lignée germinale au cours du développement fœtal ainsi que l'influence des micropolluants sur la modulation de son expression seraient nécessaires afin de déterminer l'implication de ce récepteur dans l'apparition des tumeurs testiculaires.

Les cellules pré-invasives dites de « carcinome in situ » (CIS), qui proviendraient des gonocytes ou des CGs fœtales qui ne se seraient pas différenciées normalement en spermatogonies, sont considérées comme les précurseurs des tumeurs testiculaires germinales (TGCTs) excepté pour le séminome spermatocytaire (Skakkebaek et al., 1987). Une exposition anormale *in utero* à des xénobiotiques environnementaux créant un déséquilibre de la balance hormonale androgène/œstrogène pourrait ainsi perturber le programme de développement fœtal du testicule et favoriser cette transformation maligne des CGs (Sharpe et Skakkebaek, 1993). De nombreuses observations et expériences confortent cette hypothèse formulée par Sharpe et Skakkebaek en indiquant que ces molécules pourraient entraîner des effets délétères sur le développement fœtal du testicule. Ces effets seront observés chez l'adulte et pourraient être transmis par la lignée germinale sur plusieurs générations d'individus.

Néanmoins, l'expression d'ERα36 dans les cellules CIS précurseurs des TGCTs n'est pas élucidée. Il serait également intéressant de déterminer l'impact des micropolluants sur l'expression d'ERα36 dans les cellules CIS.

En conclusion, cette étude nous a permis de montrer l'effet des hormones stéroïdes notamment l'œstradiol et la testostérone sur la croissance de cellules cancéreuses testiculaire d'origine germinale. Ces cellules n'expriment pas le récepteur alpha des œstrogènes (ERα66) mais ERα36 une isoforme tronquée de ce récepteur. Nous avons mis en évidence l'implication des voies de signalisation oestrogéniques non-génomiques déclenchées par un récepteur membranaire GPER et médiées par ERα36 dans la prolifération de ces cellules. L'étude d'un nouveau mécanisme d'action des œstrogènes permet de comprendre les effets physiologiques et pathologiques de ces molécules ainsi que d'appliquer ces connaissances à la détection d'effets délétères de polluants dont le nombre et la concentration sont en augmentation permanente dans l'environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Acconcia, F., et Kumar, R. (2006). Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. Cancer Lett. *238*, 1 -14.

Aksglaede, L., Sørensen, K., Petersen, J. H., Skakkebaek, N. E., et Juul, A. (2009). Recent decline in age at breast development: the Copenhagen Puberty Study. Pediatrics *123*, e932-939.

Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Musti, A. M., Ando, S., et Maggiolini, M. (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.

Albanito, L., Sisci, D., Aquila, S., Brunelli, E., Vivacqua, A., Madeo, A., Lappano, R., Pandey, D. P., Picard, D., Mauro, L., Ando, S., et Maggiolini, M. (2008). Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. Endocrinology *149*, 3799 -3808.

Albers, P. (2007). Management of stage I testis cancer. Eur. Urol *51*, 34-43.

Albrecht, K. H., et Eicher, E. M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. Dev. Biol *240*, 92-107.

Algaba, F., et Sesterhenn, I. (2010). Histological Classifcation and Pathology of Testicular Tumors. Dans Cancer of the Testis (Springer London Ltd), p. 3-26.

Almstrup, K., Nielsen, J. E., Mlynarska, O., Jansen, M. T., Jørgensen, A., Skakkebæk, N. E., et 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.

Ancelin, K., Lange, U. C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A. J., Kouzarides, T., et Surani, M. A. (2006). Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. Nat. Cell Biol *8*, 623-630.

Anderson, E. L., Baltus, A. E., Roepers-Gajadien, H. L., Hassold, T. J., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M. M., et 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.

Andrade, A. J. M., Grande, S. W., Talsness, C. E., Gericke, C., Grote, K., Golombiewski, A., Sterner-Kock, A., et Chahoud, I. (2006). A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. Toxicology *228*, 85-97.

Andrews, P. (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. Dev Biol *103*, 285-293.

Anway, M. D., Rekow, S. S., et Skinner, M. K. (2008). Comparative anti-androgenic actions

of vinclozolin and flutamide on transgenerational adult onset disease and spermatogenesis. Reprod. Toxicol *26*, 100-106.

Aquila, S., Middea, E., Catalano, S., Marsico, S., Lanzino, M., Casaburi, I., Barone, I., Bruno, R., Zupo, S., et Andò, S. (2007). Human sperm express a functional androgen receptor: effects on PI3K/AKT pathway. Hum. Reprod *22*, 2594-2605.

Arango, N. A., Lovell-Badge, R., et Behringer, R. R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. Cell *99*, 409-419.

Arnold, S. J., Maretto, S., Islam, A., Bikoff, E. K., et 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., et Marino, M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. Mol. Aspects Med *27*, 299-402.

B

Baltus, A. E., Menke, D. B., Hu, Y.-C., Goodheart, M. L., Carpenter, A. E., de Rooij, D. G., et 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.

Barsoum, I., et Yao, H. H.-C. (2006). The road to maleness: from testis to Wolffian duct. Trends Endocrinol. Metab *17*, 223-228.

Baskin, L. S. (2000). Hypospadias and urethral development. The Journal of Urology *163*, 951-956.

Baudat, F., et de Massy, B. (2004). [SPO11: an activity that promotes DNA breaks required for meiosis]. Med Sci (Paris) *20*, 213-218.

Bosl, G. J., et Motzer, R. J. (1997). Testicular germ-cell cancer. N. Engl. J. Med *337*, 242-253.

Boukari, K., Meduri, G., Brailly-Tabard, S., Guibourdenche, J., Ciampi, M. L., Massin, N., Martinerie, L., Picard, J.-Y., Rey, R., Lombès, M., et Young, J. (2009). Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Mullerian hormone repression during early human testis development. J. Clin. Endocrinol. Metab *94*, 1818-1825.

Bouskine, A., Nebout, M., Brucker-Davis, F., Benahmed, M., et 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., et Koopman, P. (2007). Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. Development *134*, 3401-3411.

Bowles, J., Feng, C.-W., Spiller, C., Davidson, T.-L., Jackson, A., et Koopman, P. (2010). FGF9 Suppresses Meiosis and Promotes Male Germ Cell Fate in Mice. Developmental Cell *19*, 440-449.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., et Koopman, P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science *312*, 596 -600.

Brennan, J., et Capel, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nat. Rev. Genet *5*, 509-521.

Brevini, T. A. L., Zanetto, S. B., et Cillo, F. (2005). Effects of endocrine disruptors on developmental and reproductive functions. Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord *5*, 1-10.

Brydøy, M., Fosså, S. D., Klepp, O., Bremnes, R. M., Wist, E. A., Wentzel-Larsen, T., et Dahl, O. (2010). Paternity and testicular function among testicular cancer survivors treated with two to four cycles of cisplatin-based chemotherapy. Eur. Urol *58*, 134-140.

C

Capel, B. (2000). The battle of the sexes. Mech. Dev *92*, 89-103.

Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U., et 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., Bois, C., Zanatta, L., Silva, F. R. M. B., Bouraima-Lelong, H., et Delalande, C. (2011). Estrogen signaling in testicular cells. Life Sci. doi:10.1016/j.lfs.2011.06.004.

Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., et Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad□: a review. Reprod. Biol. Endocrinol *1*, 35.

Carreau, S., Silandre, D., Bourguiba, S., Hamden, K., Said, L., Lambard, S., Galeraud-Denis, I., et Delalande, C. (2007). Estrogens and male reproduction: a new concept. Braz. J. Med. Biol. Res *40*, 761-768.

Carreau, S., Wolczynski, S., et Galeraud-Denis, I. (2010). Aromatase, oestrogens and human male reproduction. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci *365*, 1571-1579.

Carver, B. S., et Sheinfeld, J. (2005). Germ cell tumors of the testis. Ann. Surg. Oncol *12*, 871-880.

Cenni, B., et Picard, D. (1999). Ligand-independent Activation of Steroid Receptors: New Roles for Old Players. Trends Endocrinol. Metab *10*, 41-46.

Chang, C., Chen, Y.-T., Yeh, S.-D., Xu, Q., Wang, R.-S., Guillou, F., Lardy, H., et Yeh, S. (2004). Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *101*, 6876-6881.

Chang, H., et Matzuk, M. M. (2001). Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. Mech. Dev *104*, 61-67.

Chardard, D., Desvages, G., Pieau, C., et Dournon, C. (1995). Aromatase activity in larval

gonads of Pleurodeles waltl (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. Gen.Comp Endocrinol *99*, 100 -107.

Chardard, D., et Dournon, C. (1999). Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt Pleurodeles waltl. J.Exp.Zool *283*, 43 -50.

Chardard, D., Kuntz, S., Chesnel, A., et Flament, S. (2003). Effects of androgens on sex differentiation of the urodele Pleurodeles waltl. J.Exp.Zool.A Comp Exp.Biol *296*, 46 -55.

Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E. P., Roepers-Gajadien, H. L., Taketo, M. M., Camerino, G., de Rooij, D. G., Schedl, A., et Chaboissier, M.-C. (2008). Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. Hum. Mol. Genet *17*, 1264-1277.

Chaudhary, L. R., Hutson, J. C., et Stocco, D. M. (1989). Effect of retinol and retinoic acid on testosterone production by rat Leydig cells in primary culture. Biochem. Biophys. Res. Commun *158*, 400-406.

Cheville, J. C. (1999). Classification and pathology of testicular germ cell and sex cord-stromal tumors. Urologic Clinics of North America *26*, 595-609.

Childs, A. J., Cowan, G., Kinnell, H. L., Anderson, R. A., et Saunders, P. T. K. (2011). Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. PLoS ONE *6*, e20249.

Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Andò, S., Maggiolini, M., Carreau, S., et Pezzi, V. (2010). 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. Mol. Cell. Endocrinol *320*, 136-144.

Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C., et Haelens, A. (2008). Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. Nucl Recept Signal *6*, e008.

Collenot, A. (1973). [Obtaining, by the method of grafts of embryonic gonads, a female descended from a unisexual female, in the triton Pleurodeles waltlii Michah]. Experientia *29*, 885-887.

Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B., et Ornitz, D. M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. Cell *104*, 875-889.

Cravedi, J.-P., Zalko, D., Savouret, J.-F., Menuet, A., et Jégou, B. (2007). [The concept of endocrine disruption and human health]. Med Sci (Paris) *23*, 198-204.

Czene, K., Lichtenstein, P., et 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

Damgaard, I. N., Jensen, T. K., Petersen, J. H., Skakkebaek, N. E., Toppari, J., et Main, K. M. (2007). Cryptorchidism and maternal alcohol consumption during pregnancy. Environ. Health

Perspect *115*, 272-277.

Damgaard, I. N., Jensen, T. K., Petersen, J. H., Skakkebaek, N. E., Toppari, J., et Main, K. M. (2008). Risk factors for congenital cryptorchidism in a prospective birth cohort study. PLoS ONE *3*, e3051.

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 Roozendaa, K., Oosterhuis, J. W., et 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., Duquenne, C., Racine, C., Pakarinen, P., et Habert, R. (2005). Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. Endocrinology *146*, 2454-2461.

Delbès, G., Levacher, C., et Habert, R. (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. Reproduction *132*, 527-538.

Delbès, G., Levacher, C., Pairault, C., Racine, C., Duquenne, C., Krust, A., et Habert, R. (2004). Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. Endocrinology *145*, 3395-3403.

Den Hond, E., et Schoeters, G. (2006). Endocrine disrupters and human puberty. Int. J. Androl *29*, 264-271.

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., Sklaret, L. A., Hathaway, H. J., Arterburn, J. B., Oprea, T. I., et Prossnitz, E. R. (2009). In vivo effects of a GPR30 antagonist. Nat.Chem.Biol. *5*, 421 -427.

Detti, B., Livi, L., Scoccianti, S., Gacci, M., Lapini, A., Cai, T., Meattini, I., Mileo, A. M., Iannalfi, A., Bruni, A., et Biti, G. (2009). Management of Stage II testicular seminoma over a period of 40 years. Urol. Oncol *27*, 534-538.

DiNapoli, L., et Capel, B. (2008). SRY and the standoff in sex determination. Mol. Endocrinol *22*, 1-9.

Dixon, J. E., Allegrucci, C., Redwood, C., Kump, K., Bian, Y., Chatfield, J., Chen, Y.-H., Sottile, V., Voss, S. R., Alberio, R., et Johnson, A. (2010). Axolotl Nanog activity in mouse embryonic stem cells demonstrates that ground state pluripotency is conserved from urodele amphibians to mammals. Development *137*, 2973-2980.

Dolinoy, D. C., Huang, D., et 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.

Dournon, C., Durand, D., Demassieux, C., et Lesimple, M. (1990). Differential germ cell proliferation in the salamander pleurodeles waltl: controls by sexual genotype and by thermal epigenetic factor before differentiation of sexual phenotype of gonads. Int. J. Dev. Biol *34*, 365-375.

Dournon, C., et Houillon, C. (1984). Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'Amphibien urodèle Pleurodeles waltl Michah. Reprod. Nutr. Dev *24*, 361-378.

Dournon, C., et Houillon, C. (1985). Thermosensibilite de la differenciation sexuelle chezl'Amphibien Urodele Pleurodeles waltlii Michah. Conditions pour obtenir l'inversion duphenotype sexuel de toutes les femelles genetiques sous l'action de la temperatured'elevage. Reprod. Nutr. Dev *25*, 671-688.

Dudley, B. M., Runyan, C., Takeuchi, Y., Schaible, K., et Molyneaux, K. (2007). BMP signaling regulates PGC numbers and motility in organ culture. Mech. Dev *124*, 68-77.

Dudley, B., Palumbo, C., Nalepka, J., et Molyneaux, K. (2010). BMP signaling controls formation of a primordial germ cell niche within the early genital ridges. Dev. Biol *343*, 84-93.

Dumond, H., Kuntz, S., Chesnel, A., Ko, C. I., Wallacides, A., Chardard, D., et Flament, S. (2008a). Sexual development of the urodele amphibian Pleurodeles waltl. Sex. Dev *2*, 104 - 114.

Dumond, H., Maufroid, J.-P., Ko, C.-I., Chardard, D., Chesnel, A., et Flament, S. (2008b). Freemartin in the amphibian Pleurodeles waltl: parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. Mol. Reprod. Dev *75*, 439-449.

E

Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I. M., et Wagers, A. J. (2006). Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. Nature *441*, 1109-1114.

Ewen, K. A., et Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. Mol. Cell. Endocrinol *323*, 76-93.

Extavour, C. G., et Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. Development *130*, 5869-5884.

F

Feng, Y., et Gregor, P. (1997). Cloning of a Novel Member of the G Protein-Coupled Receptor Family Related to Peptide Receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun *231*, 651-654.

Ferrier, V., Gasser, F., Jaylet, A., et Cayrol, C. (1983). A genetic study of various enzyme polymorphisms in Pleurodeles waltlii (Urodele Amphibian). II. Peptidases: demonstration of sex linkage. Biochem. Genet *21*, 535-549.

Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., et 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.

Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton, A. R., et Bland, K. I. (2002). Estrogen action via the G

protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. Mol. Endocrinol *16*, 70-84.

Fisher, J. S. (2004). Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. Reproduction. *127*, 305 -315.

Flament, S., Dumond, H., Chardard, D., et Chesnel, A. (2009). Lifelong testicular differentiation in Pleurodeles waltl (Amphibia, Caudata). Reprod. Biol. Endocrinol *7*, 21.

Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., et Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. EMBO J *19*, 4688-4700.

Foresta, C., Zuccarello, D., Garolla, A., et Ferlin, A. (2008). Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. Endocr. Rev *29*, 560-580.

Franco, R., Boscia, F., Gigantino, V., Marra, L., Esposito, F., Ferrara, D., Pariante, P., Botti, G., Caraglia, M., Minucci, S., et Chieffi, P. (2011). GPR30 is overexpressed in post-puberal testicular germ cell tumors. Cancer Biol. Ther *11*, 609-613.

Frolov, A., Chahwan, S., Ochs, M., Arnoletti, J. P., Pan, Z.-Z., Favorova, O., Fletcher, J., von Mehren, M., Eisenberg, B., et Godwin, A. K. (2003). Response markers and the molecular mechanisms of action of Gleevec in gastrointestinal stromal tumors. Mol. Cancer Ther *2*, 699-709.

G

Galani, A., Kitsiou-Tzeli, S., Sofokleous, C., Kanavakis, E., et Kalpini-Mavrou, A. (2008). Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. Hormones (Athens) *7*, 217-229.

Gallien, L. (1951). Unisexual progeny of a female Pleurodeles Waltlii Michah, subjected, during the larval stage, to the gynogenic effect of estradiol benzoate. C.R.Hebd.Seances Acad.Sci *233*, 828-830.

Gallien, L. (1952). Elevage et comportement du Pleurodèle en laboratoire. Bull. Soc. Zool., Fr *77*, 456-461.

Gallien, L. (1954). Demonstration of homogametic characteristics of the male sex in triton Pleurodeles waltlii Michah. by the study of descendence of animals of the sex physiologically inverse following estradiol benzoate therapy. C.R.Hebd.Seances Acad.Sci *238*, 402-404.

Gallien, L. (1973). Différenciation et organogenèse sexuelle des métazoaires (MASSON ET CIE).

Gallien, L., et Durocher, M. (1957). Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltl. Bull.Biol.Fr.Belg *91*, 97-114.

Gao, W., Bohl, C. E., et Dalton, J. T. (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. Chem. Rev *105*, 3352-3370.

Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. J. Clin. Oncol *20*, 3001-3015.

Gill, W. B., Schumacher, G. F., Bibbo, M., Straus, F. H., et Schoenberg, H. W. (1979). Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. J. Urol *122*, 36-39.

Gnessi, L., Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Spera, G., Wang, C., Bondjers, C., Karlsson, L., et Betsholtz, C. (2000). Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. J. Cell Biol *149*, 1019-1026.

Golub, M. S., Collman, G. W., Foster, P. M. D., Kimmel, C. A., Rajpert-De Meyts, E., Reiter, E. O., Sharpe, R. M., Skakkebaek, N. E., et Toppari, J. (2008). Public health implications of altered puberty timing. Pediatrics *121 Suppl 3*, S218-230.

Gori, S., Porrozzi, S., Roila, F., Gatta, G., De Giorgi, U., et Marangolo, M. (2005). Germ cell tumours of the testis. Crit. Rev. Oncol. Hematol *53*, 141-164.

Greene, M. H., Kratz, C. P., Mai, P. L., Mueller, C., Peters, J. A., Bratslavsky, G., Ling, A., Choyke, P. M., Premkumar, A., Bracci, J., Watkins, R. J. McMaster, M. L. et Korde, L. A. (2010). Familial testicular germ cell tumors in adults: 2010 summary of genetic risk factors and clinical phenotype. Endocr. Relat. Cancer *17*, R109-121.

Gruber, C. J., Gruber, D. M., Gruber, I. M. L., Wieser, F., et Huber, J. C. (2004). Anatomy of the estrogen response element. Trends Endocrinol. Metab *15*, 73-78.

Guerquin, M. J., Duquenne, C., Lahaye, J. B., Tourpin, S., Habert, R., et Livera, G. (2010). New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. Dev.Biol *346*, 320 -330.

Guigon, C. J., et Magre, S. (2006). Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. Biol. Reprod *74*, 450-458.

H

Habert, R., Delbes, G., Duquenne, C., Livera, G., et Levacher, C. (2006). [Effects of estrogens on the development of the testis during fetal and neonatal life]. Gynecol.Obstet.Fertil *34*, 970 -977.

Hassan, H. C., Cullen, I. M., Casey, R. G., et Rogers, E. (2008). Gynaecomastia: an endocrine manifestation of testicular cancer. Andrologia *40*, 152-157.

Hatch, E. E., Troisi, R., Wise, L. A., Titus-Ernstoff, L., Hyer, M., Palmer, J. R., Strohsnitter, W. C., Robboy, S. J., Anderson, D., Kaufman, R., Adam, E. et Hoover, R. N. (2010). Preterm Birth, Fetal Growth, and Age at Menarche among Women Exposed Prenatally to Diethylstilbestrol (DES). Reprod Toxicol *31*, 151-157.

Hayashi, K., Kobayashi, T., Umino, T., Goitsuka, R., Matsui, Y., et Kitamura, D. (2002). SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast. Mech. Dev *118*, 99-109.

Hayes, T. B. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. J. Exp. Zool *281*, 373-399.

Hoei-Hansen, C. E., Nielsen, J. E., Almstrup, K., Sonne, S. B., Graem, N., Skakkebaek, N. E., Leffers, H., et Rajpert-De Meyts, E. (2004). Transcription factor AP-2gamma is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. Clin.Cancer Res *10*, 8521 -8530.

Horwich, A., Shipley, J., et Huddart, R. (2006). Testicular germ-cell cancer. Lancet *367*, 754-765.

Houillon, C. (1988). Production de tératomes à partir d'implants embryonnaires allogéniques chez l'amphibien urodèle, Pleurodeles waltlii Michah. C. R. Acad. Sci *306*, 213-219.

Houlgatte, A., et Bauduceau, O. (2005). Tumeurs germinales séminomateuses du testicule : diagnostic et traitement. Annales d'Urologie *39*, 159-169.

Howdeshell, K. L., Furr, J., Lambright, C. R., Rider, C. V., Wilson, V. S., et Gray, L. E. (2007). Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: altered fetal steroid hormones and genes. Toxicol. Sci *99*, 190-202.

Hughes, I. A., et Acerini, C. L. (2008). Factors controlling testis descent. Eur.J.Endocrinol. *159 Suppl 1*, S75 -S82.

Huyghe, E., Plante, P., et Thonneau, P. F. (2007). Testicular cancer variations in time and space in Europe. Eur. Urol *51*, 621-628.

J

Jakob, S., et Lovell-Badge, R. (2011). Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals. FEBS J *278*, 1002-1009.

Johnson, A. D., Drum, M., Bachvarova, R. F., Masi, T., White, M. E., et Crother, B. I. (2003). Evolution of predetermined germ cells in vertebrate embryos: implications for macroevolution. Evol. Dev *5*, 414-431.

Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H.-J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., et Tilly, J. L. (2005). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. Cell *122*, 303-315.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., et Tilly, J. L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature *428*, 145-150.

Jorgensen, N., Carlsen, E., Nermoen, I., Punab, M., Suominen, J., Andersen, A. G., Andersson, A. M., Haugen, T. B., Horte, A., Jensen, T. K., Magnus, O., Petersen, J. H., Vierula, M., Toppari, J., et Skakkebaek, N. E. (2002). East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. Hum.Reprod *17*, 2199 -2208.

Josso, N., Racine, C., di Clemente, N., Rey, R., et Xavier, F. (1998). The role of anti-

Müllerian hormone in gonadal development. Mol. Cell. Endocrinol *145*, 3-7.

K

Kanai, Y., Hiramatsu, R., Matoba, S., et Kidokoro, T. (2005). From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. J.Biochem *138*, 13 -19.

Kang, K.-S., Che, J.-H., Ryu, D.-Y., Kim, T.-W., Li, G.-X., et Lee, Y.-S. (2002). Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). J. Vet. Med. Sci *64*, 227-235.

Kang, L., et Wang, Z.-Y. (2010). Breast cancer cell growth inhibition by phenethyl isothiocyanate is associated with down-regulation of oestrogen receptor-alpha36. J. Cell. Mol. Med *14*, 1485-1493.

Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., et Wang, Z.-Y. (2010). Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. Mol. Endocrinol *24*, 709-721.

Karl, J., et Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. Dev. Biol *203*, 323-333.

Kim, Y., et Capel, B. (2006). Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: a new perspective on an old problem. Dev. Dyn *235*, 2292-2300.

Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., Poulat, F., Behringer, R. R., Lovell-Badge, R., et Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. PLoS Biol *4*, e187.

Kocer, A., Reichmann, J., Best, D., et Adams, I. R. (2009). Germ cell sex determination in mammals. Mol. Hum. Reprod *15*, 205-213.

Koopman, P. (1999). Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. Cell. Mol. Life Sci *55*, 839-856.

Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., et Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature *351*, 117-121.

Kos, M., Reid, G., Denger, S., et Gannon, F. (2001). Minireview: Genomic Organization of the Human ER {alpha} Gene Promoter Region. Mol Endocrinol *15*, 2057-2063.

Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., et 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.

Kristensen, D. M., Sonne, S. B., Ottesen, A. M., Perrett, R. M., Nielsen, J. E., Almstrup, K., Skakkebaek, N. E., Leffers, H., et Meyts, E. R. (2008). Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. Mol.Cell Endocrinol *288*, 111 -118.

Kroll, K. L., et Amaya, E. (1996). Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. Development *122*,

3173-3183.

Kudoh, M., Susaki, Y., Ideyama, Y., Nanya, T., Mori, M., Shikama, H., et Fujikura, T. (1996). Inhibitory effect of a novel non-steroidal aromatase inhibitor, YM511 on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cell. J. Steroid Biochem. Mol. Biol *58*, 189-194.

Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., et Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *93*, 5925-5930.

Kukreja, A., et Maclaren, N. K. (2002). NKT cells and type-1 diabetes and the « hygiene hypothesis » to explain the rising incidence rates. Diabetes Technol. Ther *4*, 323-333.

Kumar, S., Chatzi, C., Brade, T., Cunningham, T. J., Zhao, X., et Duester, G. (2011). Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. Nat Commun *2*, 151.

Kuntz, S., Chardard, D., Chesnel, A., Grillier-Vuissoz, I., et Flament, S. (2003). Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt Pleurodeles waltl. Cytogenet. Genome Res *101*, 283-288.

Kurimoto, K., Yamaji, M., Seki, Y., et Saitou, M. (2008). Specification of the germ cell lineage in mice: a process orchestrated by the PR-domain proteins, Blimp1 and Prdm14. Cell Cycle *7*, 3514-3518.

Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M., et Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. J. Steroid Biochem. Mol. Biol *74*, 311-317.

L

Lambard, S., et Carreau, S. (2005). Aromatase and oestrogens in human male germ cells. Int. J. Androl *28*, 254-259.

Lambrot, R., Coffigny, H., Pairault, C., Donnadieu, A.-C., Frydman, R., Habert, R., et Rouiller-Fabre, V. (2006). Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. J. Clin. Endocrinol. Metab *91*, 2696-2703.

Lambrot, R., et Kimmins, S. (2011). Histone methylation is a critical regulator of the abnormal expression of POU5F1 and RASSF1A in testis cancer cell lines. Int. J. Androl *34*, 110-123.

Lambrot, R., Muczynski, V., Lecureuil, C., Angenard, G., Coffigny, H., Pairault, C., Moison, D., Frydman, R., Habert, R., et Rouiller-Fabre, V. (2009). Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. Environ.Health Perspect *117*, 32 -37.

Lau, Y.-F. C., Li, Y., et Kido, T. (2009). Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome. Birth Defects Res. C Embryo Today *87*, 114-122.

Lavery, D. N., et Bevan, C. L. (2011). Androgen receptor signalling in prostate cancer: the functional consequences of acetylation. J. Biomed. Biotechnol *2011*, 862125.

Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P., et Hogan, B. L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes Dev *13*, 424-436.

Lawson, K. A., et Hage, W. J. (1994). Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. Ciba Found. Symp *182*, 68-84.

Le Bouffant, R., Guerquin, M. J., Duquenne, C., Frydman, N., Coffigny, H., Rouiller-Fabre, V., Frydman, R., Habert, R., et Livera, G. (2010). Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. Hum. Reprod *25*, 2579-2590.

Lee, H. K., Yoo, M. S., Choi, H. S., Kwon, H. B., et Soh, J. (1999). Retinoic acids up-regulate steroidogenic acute regulatory protein gene. Mol. Cell. Endocrinol *148*, 1-10.

Lee, H.-J., et Chang, C. (2003). Recent advances in androgen receptor action. Cell. Mol. Life Sci *60*, 1613-1622.

Lee, L. M. J., Cao, J., Deng, H., Chen, P., Gatalica, Z., et 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.

Lefèvre, A., Rogier, E., Astraudo, C., Duquenne, C., et Finaz, C. (1994). Regulation by retinoids of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor, cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta (5-4)-isomerase and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P-450 messenger ribonucleic acid levels in the K9 mouse Leydig cell line. Mol. Cell. Endocrinol *106*, 31-39.

Lehraiki, A., Racine, C., Krust, A., Habert, R., et Levacher, C. (2009). Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. Toxicol.Sci *111*, 372 -382.

Levin, E. R. (2009). Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. J. Physiol. (Lond.) *587*, 5019-5023.

Li, J., et Al-Azzawi, F. (2009). Mechanism of androgen receptor action. Maturitas *63*, 142-148.

Lin, S.-L., Yan, L.-Y., Liang, X.-W., Wang, Z.-B., Wang, Z.-Y., Qiao, J., Schatten, H., et 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.

Livera, G., Pairault, C., Lambrot, R., Lelievre-Pegorier, M., Saez, J. M., Habert, R., et Rouiller-Fabre, V. (2004). Retinoid-sensitive steps in steroidogenesis in fetal and neonatal rat testes: in vitro and in vivo studies. Biol.Reprod *70*, 1814 -1821.

Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Valla, J., et Habert, R. (2000). Effects of retinoids on the meiosis in the fetal rat ovary in culture. Mol.Cell Endocrinol *165*, 225 -231.

M

Ma, H.-M., Du, M.-L., Luo, X.-P., Chen, S.-K., Liu, L., Chen, R.-M., Zhu, C., Xiong, F., Li, T., Wang, W., et Liu, G.-L. (2009). Onset of breast and pubic hair development and menses in

urban chinese girls. Pediatrics *124*, e269-277.

MacLean, H. E., Warne, G. L., et Zajac, J. D. (1997). Localization of functional domains in the androgen receptor. J. Steroid Biochem. Mol. Biol *62*, 233-242.

Magelssen, H., Brydøy, M., et Fosså, S. D. (2006). The effects of cancer and cancer treatments on male reproductive function. Nat Clin Pract Urol *3*, 312-322.

Maggiolini, M., et Picard, D. (2010). The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. J.Endocrinol. *204*, 105 -114.

Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A. G., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, A. M., Picard, D., et Ando, S. (2004). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. J.Biol.Chem *279*, 27008 -27016.

Mahood, I. K., Scott, H. M., Brown, R., Hallmark, N., Walker, M., et Sharpe, R. M. (2007). In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. Environ.Health Perspect *115 Suppl 1*, 55 -61.

Main, K. M., Kiviranta, H., Virtanen, H. E., Sundqvist, E., Tuomisto, J. T., Tuomisto, J., Vartiainen, T., Skakkebaek, N. E., et Toppari, J. (2007). Flame retardants in placenta and breast milk and cryptorchidism in newborn boys. Environ. Health Perspect *115*, 1519-1526.

Main, K. M., Skakkebaek, N. E., Virtanen, H. E., et Toppari, J. (2010). Genital anomalies in boys and the environment. Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab *24*, 279 -289.

Mark, M., Jacobs, H., Oulad-Abdelghani, M., Dennefeld, C., Féet, B., Vernet, N., Codreanu, C-A., Chambon, P. et Ghyselinck, N. (2008). STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. J. Cell. Sci. *121*, 3233-3242.

Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R., et Capel, B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. Curr. Biol *7*, 958-968.

Massagué, J., Seoane, J., et Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. Genes Dev *19*, 2783-2810.

Matsui, Y., et Okamura, D. (2005). Mechanisms of germ-cell specification in mouse embryos. Bioessays *27*, 136-143.

Matsumoto, T., Takeyama, K.-ichi, Sato, T., et Kato, S. (2003). Androgen receptor functions from reverse genetic models. J. Steroid Biochem. Mol. Biol *85*, 95-99.

Maufroid, J. P., et Capuron, A. (1973). [Experimental demonstration of germinal cells in the presumptive lateral mesoderm of the young gastrula of Pleurodeles waltii (urodele amphibian)]. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D *676*, 821-824.

Maufroid, J. P., et Capuron, A. (1977a). [Induction of the mesoderm and primordial germ cells by the endoderm of Pleurodeles waltlii (Amphibia, Urodele): development during gastrulation]. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D *284*, 1713-1716.

Maufroid, J. P., et Capuron, A. (1977b). Recent researches on primordial germ cells of Pleurodeles waltlii (Amphibia, Urodele). Mem. Soc. Zool. Fr *41*, 43-60.

McIntyre, A., Gilbert, D., Goddard, N., Looijenga, L., et 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., Grygalewicz, B., Gillis, A. J. M., Stoop, J., van Gurp, R. J. H. L. M., Dennis, N., Fisher, C., Huddart, R., Cooper, C., Clark, J., Oosterhuis, J. W., Looijenga, L., et Shipley, J. (2005). Amplification and overexpression of the KIT gene is associated with progression in the seminoma subtype of testicular germ cell tumors of adolescents and adults. Cancer Res *65*, 8085-8089.

McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. Dev. Biol *262*, 1-15.

Mendonca, B. B., Domenice, S., Arnhold, I. J. P., et Costa, E. M. F. (2009). 46,XY disorders of sex development (DSD). Clin. Endocrinol. (Oxf) *70*, 173-187.

Miller, W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocr. Rev *9*, 295-318.

Mizuno, Y., Gotoh, A., Kamidono, S., et 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.

Moller, H., et 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 Lehmann, R. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. Development *130*, 4279-4286.

Mongraw-Chaffin, M. L., Cohn, B. A., Cohen, R. D., et Christianson, R. E. (2008). Maternal smoking, alcohol consumption, and caffeine consumption during pregnancy in relation to a son's risk of persistent cryptorchidism: a prospective study in the Child Health and Development Studies cohort, 1959-1967. Am. J. Epidemiol *167*, 257-261.

Monniaux, D., Caraty, A., Clement, F., Dalbiès-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gérard, N., Mermillod, P., Monget, P., et Uzbekova, S. (2009). Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. Inra Prod. Anim *22*, 59-76.

Moore, J. T., McKee, D. D., Slentz-Kesler, K., Moore, L. B., Jones, S. A., Horne, E. L., Su, J. L., Kliewer, S. A., Lehmann, J. M., et Willson, T. M. (1998). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. Biochem. Biophys. Res. Commun *247*, 75-78.

Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M., et Kondoh, H. (2007). The hotei mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *104*, 9691-9696.

Mosselman, S., Polman, J., et Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett *392*, 49-53.

Mouritsen, A., Aksglaede, L., Sørensen, K., Mogensen, S. S., Leffers, H., Main, K. M., Frederiksen, H., Andersson, A.-M., Skakkebaek, N. E., et Juul, A. (2010). Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. Int. J. Androl *33*, 346-359.

Myers, J. P., Zoeller, R. T., et vom Saal, F. S. (2009). A Clash of Old and New Scientific Concepts in Toxicity, with Important Implications for Public Health. Environ Health Perspect *117*, 1652–1655.

N

Nakamura, T., et Miki, T. (2010). Recent strategy for the management of advanced testicular cancer. Int. J. Urol *17*, 148-157.

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.

Nef, S., et Parada, L. F. (2000). Hormones in male sexual development. Genes Dev *14*, 3075-3086.

Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., et Jefferson, W. N. (2006). Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. Endocrinology *147*, S11-17.

O

O'Donnell, L., Robertson, K. M., Jones, M. E., et Simpson, E. R. (2001). Estrogen and spermatogenesis. Endocr.Rev. *22*, 289 -318.

O'Shaughnessy, P. J., Baker, P. J., et Johnston, H. (2006). The foetal Leydig cell--differentiation, function and regulation. Int. J. Androl *29*, 90-95.

Oelschlaeger, P., Lange, S., Schmitt, J., Siemann, M., Reuss, M., et Schmid, R. D. (2003). Identification of factors impeding the production of a single-chain antibody fragment in Escherichia coliby comparing in vivo and in vitro expression. Appl. Microbiol. Biotechnol *61*, 123-132.

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., et Muramatsu, M. (1998). The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun *243*, 122-126.

Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., et Saitou, M. (2009). A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice. Cell *137*, 571-584.

Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., et Surani, M. A. (2005).

Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. Nature *436*, 207-213.

Oishi, S. (2002a). Effects of propyl paraben on the male reproductive system. Food Chem. Toxicol *40*, 1807-1813.

Oishi, S. (2002b). Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. Arch. Toxicol *76*, 423-429.

Oldenburg, J., Wahlqvist, R., et Fosså, S. D. (2009). Late relapse of germ cell tumors. World J Urol *27*, 493-500.

Olesen, I. A., Sonne, S. B., Hoei-Hansen, C. E., Rajpert-De Meyts, E., et Skakkebaek, N. E. (2007). Environment, testicular dysgenesis and carcinoma in situ testis. Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab *21*, 462 -478.

Ormond, G., Nieuwenhuijsen, M. J., Nelson, P., Toledano, M. B., Iszatt, N., Geneletti, S., et Elliott, P. (2009). Endocrine disruptors in the workplace, hair spray, folate supplementation, and risk of hypospadias: case-control study. Environ.Health Perspect *117*, 303 -307.

Orso, F., Cottone, E., Hasleton, M. D., Ibbitt, J. C., Sismondi, P., Hurst, H. C., et De Bortoli, M. (2004). Activator protein-2gamma (AP-2gamma) expression is specifically induced by oestrogens through binding of the oestrogen receptor to a canonical element within the 5'-untranslated region. Biochem. J *377*, 429-438.

Ottolenghi, C., Omari, S., Garcia-Ortiz, J. E., Uda, M., Crisponi, L., Forabosco, A., Pilia, G., et Schlessinger, D. (2005). Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. Hum. Mol. Genet *14*, 2053-2062.

Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Décimo, D., Gansmuller, A., Heyberger, S., Dollé, P., Bronner, S., Lutz, Y., et Chambon, P. (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. J. Cell Biol *135*, 469-477.

P

Pandey, D. P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M., et Picard, D. (2009). Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. EMBO J *28*, 523 -532.

Parisotto, M., Brodeur, H., Bhat, P. V., et Mader, S. (2006). [Retinoid metabolism and cancer]. Med Sci (Paris) *22*, 1101-1106.

Parker, K. L. (1998). The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. Mol. Cell. Endocrinol *145*, 15-20.

Patrão, M. T. C. C., Silva, E. J. R., et Avellar, M. C. W. (2009). Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. Arq Bras Endocrinol Metabol *53*, 934-945.

Pelletier, G., et El-Alfy, M. (2000). Immunocytochemical Localization of Estrogen Receptors {alpha} and {beta} in the Human Reproductive Organs. J Clin Endocrinol Metab *85*, 4835-4840.

Phillips, B. T., Gassei, K., et Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci *365*, 1663-1678.

Pierantoni, R., Andersson, G., Meccariello, R., Palmiero, C., Fienga, G., Minucci, S., et Fasano, S. (2002). The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol *132*, 131-139.

Pittman, D. L., Cobb, J., Schimenti, K. J., Wilson, L. A., Cooper, D. M., Brignull, E., Handel, M. A., et 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.

R

Rago, V., Romeo, F., Giordano, F., Ferraro, A., Andò, S., et Carpino, A. (2009). Identification of ERbeta1 and ERbeta2 in human seminoma, in embryonal carcinoma and in their adjacent intratubular germ cell neoplasia. Reprod. Biol. Endocrinol *7*, 56.

Rahman, F., et Christian, H. C. (2007). Non-classical actions of testosterone: an update. Trends Endocrinol.Metab *18*, 371 -378.

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., et 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., Hanstein, R., Jørgensen, N., Graem, N., Vogt, P. H., et Skakkebaek, N. E. (2004). Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. Hum. Reprod *19*, 1338-1344.

Rapley, E. A., et Nathanson, K. L. (2010). Predisposition alleles for Testicular Germ Cell Tumour. Curr. Opin. Genet. Dev *20*, 225-230.

Rapley, E. A., Hockley, S., Warren, W., Johnson, L., Huddart, R., Crockford, G., Forman, D., Leahy, M. G., Oliver, D. T., Tucker, K., Friedlander, M., Phillips, K. A., Hogg, D., Jewett, M. A., Lohynska, R., Daugaard, G., Richard, S., Heidenreich, A., Geczi, L., Bodrogi, I., Olah, E., Ormiston, W. J., Daly, P. A., Looijenga, L. H., Guilford, P., Aass, N., Fosså, S. D., Heimdal, K., Tjulandin, S. A., Liubchenko, L., Stoll, H., Weber, W., Einhorn, L., Weber, B. L., McMaster, M., Greene, M. H., Bishop, D. T., Easton, D., et Stratton, M. R. (2004). Somatic mutations of KIT in familial testicular germ cell tumours. Br. J. Cancer *90*, 2397-2401.

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., Morrison, J., Nsengimana, J., Deloukas, P.; Rahman, N., Bishop, D. T., Easton, D. F., et Stratton, M. R. (2009). A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. Nat. Genet *41*, 807-810.

Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G. L., et Levin, E. R. (2004). Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. Mol. Endocrinol *18*, 2854-2865.

Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., et Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science *307*,

1625-1630.

Robertson, K. M., O'Donnell, L., Jones, M. E., Meachem, S. J., Boon, W. C., Fisher, C. R., Graves, K. H., McLachlan, R. I., et Simpson, E. R. (1999). Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *96*, 7986-7991.

Rochira, V., Granata, A. R. M., Madeo, B., Zirilli, L., Rossi, G., et Carani, C. (2005). Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years? Asian J. Androl *7*, 3-20.

Ross, A. J., et Capel, B. (2005). Signaling at the crossroads of gonad development. Trends Endocrinol.Metab *16*, 19 -25.

Roth, M. Y., Lin, K., Amory, J. K., Matsumoto, A. M., Anawalt, B. D., Snyder, C. N., Kalhorn, T. F., Bremner, W. J., et 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., Lecureuil, C., Pairault, C., Bakalska, M., Courtot, A. M., Frydman, R., et Habert, R. (2008). [Development and regulations of testicular functions in the human foetus]. Gynecol.Obstet.Fertil *36*, 898 -907.

Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., et Wylie, C. (2006). Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. Development *133*, 4861-4869.

S

Sadovsky, Y., et Dorn, C. (2000). Function of steroidogenic factor 1 during development and differentiation of the reproductive system. Rev. Reprod *5*, 136-142.

Safe, S., et Kim, K. (2008). Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. J. Mol. Endocrinol *41*, 263-275.

Saga, Y. (2010). Function of Nanos2 in the male germ cell lineage in mice. Cell. Mol. Life Sci *67*, 3815-3822.

Saitou, M., Payer, B., O'Carroll, D., Ohinata, Y., et Surani, M. A. (2005). Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. Cell Cycle *4*, 1736-1740.

Salian, S., Doshi, T., et Vanage, G. (2009). Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. Toxicology *265*, 56-67.

Saunders, P. T. K., Millar, M. R., Macpherson, S., Irvine, D. S., Groome, N. P., Evans, L. R., Sharpe, R. M., et Scobie, G. A. (2002). ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. J. Clin. Endocrinol. Metab *87*, 2706-2715.

Saunders, P. T. K., Sharpe, R. M., Williams, K., Macpherson, S., Urquart, H., Irvine, D. S., et Millar, M. R. (2001). Differential expression of oestrogen receptor á and â proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. Mol Hum Reprod *7*, 227 -236.

Sava, T., Consoli, F., Santo, A., et Cetto, G. L. (2008). Adjuvant treatment in the management of testis-confined germ cell tumours after orchidectomy. BJU Int *101*, 155-159.

Schmahl, J., Eicher, E. M., Washburn, L. L., et Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. Development *127*, 65-73.

Schnack, T. H., Zdravkovic, S., Myrup, C., Westergaard, T., Christensen, K., Wohlfahrt, J., et Melbye, M. (2008a). Familial aggregation of hypospadias: a cohort study. Am. J. Epidemiol *167*, 251-256.

Schnack, T. H., Zdravkovic, S., Myrup, C., Westergaard, T., Wohlfahrt, J., et Melbye, M. (2008b). Familial aggregation of cryptorchidism--a nationwide cohort study. Am. J. Epidemiol *167*, 1453-1457.

Schrager, S., et Potter, B. E. (2004). Diethylstilbestrol exposure. Am Fam Physician *69*, 2395-2400.

Scott, H. M., Hutchison, G. R., Jobling, M. S., McKinnell, C., Drake, A. J., et Sharpe, R. M. (2008). Relationship between androgen action in the « male programming window » fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. Endocrinology *149*, 5280-5287.

Sekido, R., et Lovell-Badge, R. (2009). Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? Trends Genet *25*, 19-29.

Sharpe, R. M. (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab *20*, 91-110.

Sharpe, R. M., et 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., et Skakkebaek, N. E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet *341*, 1392 -1395.

Sharpe, R. M., et Skakkebaek, N. E. (2008). Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. Fertil.Steril. *89*, e33 -e38.

Shi, D. L., et Boucaut, J. C. (1995). The chronological development of the urodele amphibian Pleurodeles waltl (Michah). Int. J. Dev. Biol *39*, 427-441.

Shi, L., Dong, B., Li, Z., Lu, Y., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., Fan, T., Lin, B., Wang, Z., et Xie, Y. (2009). Expression of ER-{alpha}36, a novel variant of estrogen receptor {alpha}, and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. J. Clin. Oncol *27*, 3423-3429.

Shono, T., Shima, Y., Kondo, T., et Suita, S. (2005). In utero exposure to mono-n-butyl phthalate impairs insulin-like factor 3 gene expression and the transabdominal phase of testicular descent in fetal rats. J.Pediatr.Surg. *40*, 1861 -1864.

Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Caruso, A., Varone, G., et Genazzani, A. R. (2004). Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. Steroids *69*, 537-542.

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster,

J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., et Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature *346*, 240-244.

Sirianni, R., Chimento, A., Ruggiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Andò, S., Maggiolini, M., et Pezzi, V. (2008). The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. Endocrinology *149*, 5043-5051.

Skakkebaek, N. E., Berthelsen, J. G., Giwercman, A., et 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., et Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum.Reprod *16*, 972 -978.

Skinner, M. K., Manikkam, M., et Guerrero-Bosagna, C. (2010). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. Reprod Toxicol *31*, 337-343.

Smith, C. A., Roeszler, K. N., Bowles, J., Koopman, P., et Sinclair, A. H. (2008). Onset of meiosis in the chicken embryo; evidence of a role for retinoic acid. BMC Dev. Biol *8*, 85.

Solakidi, S., Psarra, A.-M. G., Nikolaropoulos, S., et Sekeris, C. E. (2005). Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. Hum. Reprod *20*, 3481-3487.

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., et 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.

Sonne, S. B., Kristensen, D. M., Novotny, G. W., Olesen, I. A., Nielsen, J. E., Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., et Leffers, H. (2008). Testicular dysgenesis syndrome and the origin of carcinoma in situ testis. Int.J.Androl *31*, 275 -287.

Soto-Suazo, M., et Zorn, T. M. (2005). Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. Anim. Reprod *2*, 147-160.

Speirs, V., et Walker, R. A. (2007). New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. J. Pathol *211*, 499-506.

Spiller, C. M., Wilhelm, D., et 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.

Stossi, F., Barnett, D. H., Frasor, J., Komm, B., Lyttle, C. R., et Katzenellenbogen, B. S. (2004). Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors. Endocrinology *145*, 3473-3486.

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., et Hatch, E. E. (2001). Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. J. Natl. Cancer Inst *93*, 545-551.

Suzuki, A., et Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. Genes Dev *22*, 430-435.

T

Taimi, M., Helvig, C., Wisniewski, J., Ramshaw, H., White, J., Amad, M., Korczak, B., et 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.

Takada, Y., Kato, C., Kondo, S., Korenaga, R., et Ando, J. (1997). Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. Biochem. Biophys. Res. Commun *240*, 737-741.

Tam, P. P. L., et Loebel, D. A. F. (2009). Specifying mouse embryonic germ cells. Cell *137*, 398-400.

Tam, P. P., et Zhou, S. X. (1996). The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. Dev. Biol *178*, 124-132.

Teilmann, G., Pedersen, C. B., Skakkebaek, N. E., et Jensen, T. K. (2006). Increased risk of precocious puberty in internationally adopted children in Denmark. Pediatrics *118*, e391-399.

Teilmann, G., Petersen, J. H., Gormsen, M., Damgaard, K., Skakkebaek, N. E., et Jensen, T. K. (2009). Early puberty in internationally adopted girls: hormonal and clinical markers of puberty in 276 girls examined biannually over two years. Horm. Res *72*, 236-246.

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., et Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. Endocrinology *146*, 624-632.

Thornton, J. W., et Kelley, D. B. (1998). Evolution of the androgen receptor: structure-function implications. Bioessays *20*, 860-869.

Thorup, J., McLachlan, R., Cortes, D., Nation, T. R., Balic, A., Southwell, B. R., et 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.

Tilly, J. L., et Telfer, E. E. (2009). Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? Mol. Hum. Reprod *15*, 393-398.

Toppari, J., et Juul, A. (2010). Trends in puberty timing in humans and environmental modifiers. Mol. Cell. Endocrinol *324*, 39-44.

Toppari, J., Virtanen, H. E., Main, K. M., et Skakkebaek, N. E. (2010). Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol *88*, 910-919.

Trautmann, E., Guerquin, M. J., Duquenne, C., Lahaye, J. B., Habert, R., et Livera, G. (2008). Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. Cell Cycle *7*, 656 -664.

Tsai, M.-Y., Yeh, S.-D., Wang, R.-S., Yeh, S., Zhang, C., Lin, H.-Y., Tzeng, C.-R., et Chang, C. (2006). Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *103*, 18975-18980.

U

Ulbright, T. M. (2005). Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. Mod.Pathol. *18 Suppl 2*, S61 -S79.

V

van de Geijn, G. J., Hersmus, R., et Looijenga, L. H. (2009). Recent developments in testicular germ cell tumor research. Birth Defects Res.C.Embryo.Today *87*, 96 -113.

Verville, K. M. (2009). Testicular Cancer 1er éd. (Chelsea House Publishers).

Virtanen, H. E., Tapanainen, A. E., Kaleva, M. M., Suomi, A.-M., Main, K. M., Skakkebaek, N. E., et Toppari, J. (2006). Mild gestational diabetes as a risk factor for congenital cryptorchidism. J. Clin. Endocrinol. Metab *91*, 4862-4865.

W

Wallacides, A., Chesnel, A., Chardard, D., Flament, S., et Dumond, H. (2009). Evidence for a conserved role of retinoic acid in urodele amphibian meiosis onset. Dev.Dyn *238*, 1389 - 1398.

Walvoord, E. C. (2010). The Timing of Puberty: Is It Changing? Does It Matter? Journal of Adolescent Health *47*, 433-439.

Wang, N., et Tilly, J. L. (2010). Epigenetic status determines germ cell meiotic commitment in embryonic and postnatal mammalian gonads. Cell Cycle *9*, 339-349.

Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B. W., Chang, Y., et 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.

Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B. W., Chang, Y., et 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.

Warde, P., Specht, L., Horwich, A., Oliver, T., Panzarella, T., Gospodarowicz, M., et von der Maase, H. (2002). Prognostic factors for relapse in stage I seminoma managed by surveillance: a pooled analysis. J. Clin. Oncol *20*, 4448-4452.

Watson, C. S., Bulayeva, N. N., Wozniak, A. L., et Alyea, R. A. (2007). Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. Steroids *72*, 124-134.

Weber, S., Eckert, D., Nettersheim, D., Gillis, A. J. M., Schäfer, S., Kuckenberg, P., Ehlermann, J., Werling, U., Biermann, K., Looijenga, L. H. J., et Schorle, H. (2010). Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance. Biol. Reprod *82*, 214-223.

Westergaard, T., Olsen, J. H., Frisch, M., Kroman, N., Nielsen, J. W., et Melbye, M. (1996). Cancer risk in fathers and brothers of testicular cancer patients in Denmark. A population-based study. Int. J. Cancer *66*, 627-631.

Western, P. S., Miles, D. C., van den Bergen, J. A., Burton, M., et Sinclair, A. H. (2008). Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. Stem Cells *26*, 339-347.

Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C. S., Zoeller, R. T., et Belcher, S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. Reprod. Toxicol *24*, 178-198.

Williams, S. B., Steele, G. S., et Richie, J. P. (2009). Primary retroperitoneal lymph node dissection in patients with clinical stage IS testis cancer. J. Urol *182*, 2716-2720.

Wohlfahrt-Veje, C., Main, K. M., et Skakkebaek, N. E. (2009). Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. Clin.Endocrinol.(Oxf) *71*, 459 -465.

Wozniak, A. L., Bulayeva, N. N., et Watson, C. S. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca2+ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. Environ. Health Perspect *113*, 431-439.

Wylie, C. (1999). Germ cells. Cell *96*, 165-174.

Y

Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., et Saitou, M. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. Nat. Genet *40*, 1016-1022.

Yao, H. H. C., Matzuk, M. M., Jorgez, C. J., Menke, D. B., Page, D. C., Swain, A., et Capel, B. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. Dev. Dyn *230*, 210-215.

Yao, H. H.-C., Whoriskey, W., et Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. Genes Dev *16*, 1433-1440.

Yaoi, T., Itoh, K., Nakamura, K., Ogi, H., Fujiwara, Y., et Fushiki, S. (2008). Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. Biochem. Biophys. Res. Commun *376*, 563-567.

Yeh, S., Tsai, M.-Y., Xu, Q., Mu, X.-M., Lardy, H., Huang, K.-E., Lin, H., Yeh, S.-D., Altuwaijri, S., Zhou, X., Xing, L., Boyce, B. F., Hung, M. C., Zhang, S., Gan, L., Chang, C., et Hung, M. C. (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *99*, 13498-13503.

Yen, P. (2007). RBMY and DAZ in spermatogenesis. Dans The Y Chromosome and Male

Germ Cell Biology in Health and Diseases (World Scientific Publishing Co Pte Ltd), p. 127-148.

Ying, Y., et 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., et Zhao, G. Q. (2000). Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. Mol. Endocrinol *14*, 1053-1063.

Yoshimizu, T., Obinata, M., et Matsui, Y. (2001). Stage-specific tissue and cell interactions play key roles in mouse germ cell specification. Development *128*, 481-490.

You, L., et Sar, M. (1998). Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. Endocrine *9*, 253-261.

Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., et Höög, C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. Mol. Cell *5*, 73-83.

Z

Zagars, G. K., Ballo, M. T., Lee, A. K., et Strom, S. S. (2004). Mortality after cure of testicular seminoma. J. Clin. Oncol *22*, 640-647.

Zhang, D., et Trudeau, V. L. (2006). Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol *144*, 306-315.

Zhang, X. T., Kang, L. G., Ding, L., Vranic, S., Gatalica, Z., et Wang, Z.-Y. (2011). A positive feedback loop of ER-á36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. Oncogene *30*, 770-780.

Zhang, Z., Kumar, R., Santen, R. J., et Song, R. X.-D. (2004). The role of adapter protein Shc in estrogen non-genomic action. Steroids *69*, 523-529.

Zhao, C., Dahlman-Wright, K., et Gustafsson, J.-A. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. Nucl Recept Signal *6*, e003.

Zheng, Y., Zhang, J., Xu, Z.-zhen, Sheng, J.-ming, Zhang, X.-chen, Wang, H.-hao, Teng, X.-dong, Liu, X.-jiao, Cao, J., et Teng, L.-song (2010). Quantitative profiles of the mRNAs of ER- alpha and its novel variant ER-alpha36 in breast cancers and matched normal tissues. J Zhejiang Univ Sci B *11*, 144-150.

Zhou, X. (2010). Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from global and cell-specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. J. Androl *31*, 235-243.

Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, H., Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q., Zhang, Y., Hou, R., et Wu, J. (2009). Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. Nat Cell Biol *11*, 631-636

Résumé

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la différenciation normale et pathologique des cellules germinales (CGs). Dans une première partie, la différenciation normale a été étudiée chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*. L'acide rétinoïque (AcR) est impliqué dans l'induction de l'entrée en méiose des cellules germinales (CGs) chez les amniotes (Bowles et al., 2006 ; Smith et al., 2008). Nous avons voulu savoir si l'AcR était aussi impliqué dans ce processus chez le pleurodèle. Nous avons montré que l'expression de *PwDmc1* (marqueur de méiose), survient plus précocement dans les gonades femelles (avant la métamorphose) que dans les gonades mâles (après la métamorphose). *In vitro*, l'application d'AcR sur des gonades mâles et femelles en culture organotypique ainsi que l'inhibition de la dégradation de l'AcR endogène induisent l'entrée en méiose des CGs. Nous avons également montré que la balance synthèse/dégradation l'AcR endogène est modulée par les hormones stéroïdes. Les mécanismes de différenciation des CGs décrits chez les mammifères semblent donc conservés chez les urodèles.

La seconde partie de la thèse s'inscrit dans le contexte de la différenciation pathologique des CGs. De nombreuses études ont montré qu'une exposition *in utero* à des xénobiotiques pouvait provoquer des altérations de la différenciation des CGs. Ces cellules altérées restent en dormance pendant l'enfance. A la puberté, elles prolifèrent et donnent naissance aux tumeurs testiculaires, suggérant que le développement de ces tumeurs est hormono-sensible (McIntyre et al., 2008). Nous avons étudié les effets des hormones stéroïdes sur la prolifération des cellules séminomateuses humaines TCam2. L'œstradiol et la testostérone stimulent leur prolifération ainsi que l'expression d'une isoforme tronquée du récepteur alpha des œstrogènes ERα36. Ce récepteur est induit par la voie GPER-AMPc/PKA et semble nécessaire à l'expression du récepteur à l'EGF. Il pourrait donc constituer une cible thérapeutique potentielle.

Mots clés : *Pleurodeles waltl*, cellules germinales, méiose, acide rétinoïque, cancers testiculaires, TCam2, séminome, œstrogènes, ERα36, prolifération.

Summary

Retinoic acid (RA) is involved in germ cells meiosis onset (CGs) in amniotes (Bowles et al., 2006 ; Smith et al., 2008). The aim of the first part of our study was to determine if RA is able to induce meiosis entry in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Our data on *PwDmc1* (meiosis marker) expression indicate an earlier meiosis onset in females compared with males depending on RA biosynthesis. *In vitro*, the treatment of male and female gonads with RA induces an earlier meiosis entry in both sexes. Moreover, we have shown that RA biosynthesis is regulated by steroid hormones. Therefore, the mechanisms which trigger GCs differentiation in mammals might be conserved in urodeles.
Many studies indicated that *in utero* xenobiotic exposure is able to induce alterations in GCs differentiation. These neoplasic cells enter in a period of dormancy until after puberty where they proliferate and the testicular tumours emerge. This prepubertal dormancy suggests that the testicular cancer development is hormone sensitive (McIntyre et al., 2008). In the second part we studied the effects of steroid hormones on the proliferation of the seminoma cell line TCam2. Our results indicate that estradiol and testosterone can induce the proliferation of this cell line and the expression of ERα36, a truncated form of estrogen receptor alpha. This expression is stimulated by GPER-cAMP/PKA signalisation pathway and activates EGFR expression. ERα36 could be a potential therapeutic target.

Keywords : *Pleurodeles waltl*, germ cells, meiosis, retinoic acid, testicular cancer, TCam2, seminoma, estrogen, ERα36, proliferation.