NNT :2017SACLS197

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE AU
"CENTRE MEDITERRANEEN DE MEDECINE MOLECULAIRE C3M"

ECOLE DOCTORALE N° 568
Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie (BioSigne)

Spécialité de doctorat: Sciences de la Vie et de la Santé

Par
Mme Lilia Inoubli

Effet d'une exposition foetale à de faibles doses de perturbateur endocrinien à activité anti-androgénique, le flutamide, sur le testicule de rat adulte

Thèse présentée et soutenue à Nice, le 12/07/2017 :

Composition du Jury :

M, Michiels Jean François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier Université Sophia Antipolis, Service d'Anatomie Pathologie, Nice	Président
M, Assou Saïd	Chargé de Recherche CR, INSERM U1183, Montpellier	Rapporteur
M, Jimenez Clément	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier Université de Bordeaux, Service de Biologie de la Reproduction, Bordeaux	Rapporteur
M, Lombès Marc	Directeur de Recherche DR1, INSERM U-1185, Le Kremlin-Bicêtre	Examinateur
Mme, Mauduit Claire	Maitre de conférence des Universités-Praticien Hospitalier. INSERM U1065, Centre Méditerranéen deMédecine Moléculaire, Nice	Examinatrice
M, Benahmed Mohamed	Directeur de Recherche DR1, INSERM U1065, Centre	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je me suis imaginé de bien des façons ce moment où je commencerai à rédiger mes remerciements. Un grand "OUF!" qui signerait la fin de la rédaction et où je me ferai un plaisir de citer toutes celles et ceux qui ont partagé ces années à mes côté. Maintenant que j'y suis, je ne sais par où commencer. Je vais y aller spontanément, en espérant n'oublier personne…

Je tiens tout d'abord à remercier et à dédier mon travail à mes parents. Mon cœur explose de mille et une émotions à vous évoquer. Que dire? Vous avez toujours été derrière moi à m'encourager dans mes études et dans toutes les étapes de ma vie, à me pousser à viser plus haut et à toujours faire au mieux. Papa, si j'ai tenu jusque là, c'est pour la promesse que je t'ai faite. J'espère que d'où tu es, tu me vois et que tu es fier de moi. Et toi, maman, tout ce que je pourrai écrire ou dire ne saurait rendre grâce à tout ce que tu as apporté à ma vie. J'aurai aimé que tu sois là… Je vous aime tant.

Mon travail de thèse a été effectué dans le cadre d'une collaboration CIFRE. Je tiens à remercier l'ANRT et BAYER Cropscience pour avoir financé ma thèse et pour cette opportunité enrichissante qui m'a été accordé de côtoyer laboratoire de recherche et industrie pharmaceutique.

Je remercie l'ensemble des membres du jury de thèse, qui me font l'honneur de juger ce travail. Merci au Professeur Jean François MICHIELS de présider mon jury de thèse; à Messieurs Clément JIMENEZ et Saïd ASSOU d'avoir accepté de consacrer de votre temps à la lecture et à l'appréciation de mon manuscrit. Je remercie aussi Monsieur Marc LOMBES et Madame Claire MAUDUIT de me faire l'honneur et la gentillesse de votre présence pour examiner mon travail.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, M. Mohamed BENAHMED de m'avoir permis d'effectuer ce travail de thèse et accueillie au sein de votre équipe. Je vous remercie pour votre présence bienveillante durant ces années, pour les discussions enrichissantes que nous avons eu. J'ai beaucoup appris avec vous et je sors grandie de cette expérience à vos côtés.

Je tiens à vous remercier tout particulièrement Mme Claire MAUDUIT pour tout ce que vous êtes au quotidien. Pour votre disponibilité, votre aide et vos conseils précieux à toutes les étapes de ma thèse. Je pense que ce n'est pas trop, que de dire que sans vous, je n'en serai pas là. Merci mille fois Claire.

J'adresse aussi mes remerciement à toute l'équipe de BAYER CS. M. Rémi BARS, Mme Hélène TiINWELL et plus particulièrement M. David ROUQUIÉ pour les échanges toujours enrichissants lors de nos réunions. Vous m'avez apporté le côté toxicologie de ma réflexion et une autre façon de voir les choses, côté industriel.

Merci à M. Patrick AUBERGER de m'avoir accueillie au C3M, de votre bienveillance et votre écoute.

Je tiens à adresser un remerciement particuliers à Messieurs les Directeur et Secrétaire de l'ED BioSIgne, M. Michael SCHUMACHER et M. Laurent SURDI, pour votre aide, votre écoute et vos conseils. Merci pour tout…

Durant ces années, j'en ai vu du monde! J'espère n'oublier personne. Je sais ô combien on aime tous lire les remerciements des thèses et y retrouver son petit nom.

Alors, je commence par les membres de mon équipe. L'équipe 5. Et quelle équipe me direz-vous!!

Je voudrai commencer par toi Rachel. Nos débuts ont été un peu froids j'avoue, tu m'intimidais un peu (beaucoup!). Mais on a pris le temps de se connaitre et les épreuves de la vie nous ont rapproché. Je ne saurai t'exprimer ma gratitude pour ta présence, ton aide, tes conseils, tes encouragements et pour tous les week-ends que nous avons passé à l'animalerie.

Je remercie aussi tous les thésards que j'ai côtoyé, mes compagnons de galère comme j'aime à dire, dans l'ordre Basma, Nadjem, Nicolas, Wafa et Katia. J'aurai aimé pouvoir plus vous épauler, mais le timing a fait que ce ne fut pas possible. Bon courage pour la suite les filles! Wifi et Katkout vous êtes les meilleures!

Merci à Lolita, Nathalie, Aurélien, Stéphanie et Thomas pour le travail en équipe qui fut un plaisir à vos côtés. Les stagiaires qui sont passé par là et qui ont "abusé" de mon précieux temps (hein!).Je pense particulièrement à "Riri" et surtout à "Ammoul" pour les éclats de rire et pour les bêtises que je devais réparer par la suite. La "team urologie" Ji-Wann, Yohan et Branwell, j'ai beaucoup apprécié vous avoir dans l'équipe, nos discussions sérieuses et beaucoup moins sérieuses ont toujours été un régal!

Comment ne pas te consacrer un paragraphe à toi toute seule ma milouchette d'amour? Outre le côté travail et ta disponibilité et aide à tout moment, tu as été ma plus belle rencontre durant ma thèse. J'ai gagné une sœur. Je ne pourrai compter les souvenirs que nous avons partagé. Les bons moments et les coups durs, les fous rires et les crises de larmes cachée dans ta laverie; tu as tout partagé avec moi. Merci pour tout Milouch et que tout le monde retienne qu'Emilie Brun est un amour.

Nedra, je tiens à te remercier aussi pour ton aide, pour ton amitié et pour m'avoir reboosté lors des coups de mou. Tu as un coeur en or. Je te souhaite le meilleur.

Zouhour, merci à toi aussi pour les fous rires non stop face au nombre incalculable de phrases incohérentes dont tu as le secret. Merci pour tes conseils en biostats.

Merci à tous les membres du C3M qui m'ont aidé de près ou de loin, par leurs conseils, leurs aide logistique, leurs échanges de matériels ou simplement pour les échanges qu'on a pu avoir.

Je remercie les 3 responsables qui se sont succédé à la plateforme imagerie et qui m'ont chacun énormément aidé: François, Sébastien et Damien.

Merci au personnel de l'animalerie pour avoir facilité la manutention de toutes ces grosses manips animales et à tous les membres de la gestion: Philippe Rostagno, Jeannine (et sa petite araignée au plafond comme elle le dit si bien!), Virginie, Carole et tous les autre. Merci à Zoulikha, Nadia et Jean (Juanitooo!) pour votre aide au quotidien, votre bonne humeur et votre amitié.

Un énorme merci à F. Bost pour nos discussions, tes conseils, ton aide, notamment à l'animalerie et toute la bonne humeur qui émane de toi.

Je remercie Greg et Emilie de l'équipe 6; Michele et Emanuella de l'équipe 10; P. Gual et S. Bonnafous; J. Gilleron pour ta gentillesse et les discussions super enrichissantes; J.F. Peyron et D. Mary de l'équipe 4 pour les échanges d'idées que nous avons eu, j'aurai aimé avoir le temps de pousser un peu plus les investigations, ma curiosité reste sur sa faim.

Merci à tous sans exception, vraiment.

Ah! J'oubliais!!! Merci à ma puce, ma fille adorée. Merci mon amour pour le retard accumulé, pour les cernes, les cheveux blancs, la fatigue et les nuits blanches à ne plus compter. Que tu le veuilles ou non, tu as été une étape clé de ma thèse. Et surement ma plus belle réussite. Je t'aime à l'infini et plus encore Eya.

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Signalisation et réseaux intégratifs en biologie (BIOSIGNE)

Titre : Effet d'une exposition fœtale à de faibles doses de perturbateur endocrinien à activité anti-androgénique, le flutamide, sur le testicule de rat adulte.

Mots clés : perturbateurs endocriniens, flutamide, faibles doses, testicule

Résumé : L'exposition durant la vie périnatale à des perturbateurs endocriniens (PE) anti-androgéniques, induit des altérations durables du système reproducteur mâle. Si leur action a été objectivée chez l'homme et l'animal, la question du seuil de toxicité reste entière, car l'exposition environnementale correspond à de faibles doses. Ici, nous exposons *in utero* des rats mâles à de faibles doses de flutamide: **10 mg/kg/j** ; **1**; 3 doses faibles selon la définition de l'OMS **0.1**; **0.01**; **0.001** et 0. L'exposition fœtale induit chez l'adulte (1) des altérations morphologiques à la dose 10 mg/kg/j (diminution du poids des organes du tractus génital et une diminution du compte spermatique); (2) des altérations cellulaires à partir de 1mg (augmentation de l'apoptose des cellules germinales) et (3) des altérations moléculaires à toutes les doses testées pour MCL1, BCL2, XIAP, HSPA2, ELAVL1 et MOV10L1. Ces altérations s'intègrent dans la dérégulation de 2 voies de signalisation expliquant l'apoptose des cellules germinales
Lorsque l'exposition a lieu à l'âge l'adulte dans les mêmes conditions, les effets morphologiques et cellulaires sont observés uniquement à 10mg, les effets moléculaires uniquement aux doses 10 et 1 mg. Ces effets ne sont plus observés 2 mois après l'arrêt de l'exposition. En conclusion : Nous avons (i) identifié des voies de signalisation impliquées dans le phénotype d'infertilité induite par une exposition à de faibles doses d'anti-androgène ; (ii) montré que ces voies étaient actives aux plus faibles doses testées prédisposant à une infertilité masculine programmée in utero..

Title : Effect of fetal exposure to low doses of an anti-androgenic endocrine disruptor, flutamide, on the adult rat testis

Keywords : endocrine disruptor, flutamide, low doses, testis

Abstract : Exposure during perinatal life to anti-androgenic endocrine disruptors (ED) induces sustained alterations of the male reproductive system. Although their action has been objectified in humans and animals, the question of the threshold of toxicity remains unchanged, as environmental exposure corresponds to low doses. Here, we exposed male rats, in utero, to low doses of flutamide: 10 mg/kg/d; 1; 3 low doses as defined by WHO 0.1; 0.01; 0.001 and 0. Fetal exposure induced in adults (1) morphological alterations at a dose of 10 mg/kg/day (decrease in the weight of organs of the genital tract and a decrease in the sperm count); (2) cellular alterations from 1mg (increase in germ cell apoptosis) and (3) molecular alterations at all doses tested for MCL1, BCL2, XIAP, HSPA2,LAVL1 and MOV10L1. These alterations are integrated in the deregulation of 2 signaling pathways explaining the apoptosis of the germ cells
When exposure occurs at adult age under the same conditions, morphological and cellular effects are observed only at 10mg, molecular effects only at doses 10 and 1 mg. These effects are no longer observed 2 months after discontinuation of exposure. In conclusion: We have (i) identified signaling pathways involved in the phenotype of infertility induced by exposure to low doses of antiandrogen; (ii) showed that these pathways were active at the lowest doses tested predisposing to programmed male infertility in utero

TABLES DES MATIÈRES

TABLES DES MATIÈRES 1

LISTE DES FIGURES 7

LISTE DES TABLEAUX 9

LISTE DES ABEVIATIONS 11

AVANT PROPOS 13

INTRODUCTION 15

CHAPITRE 1: TESTICULE ET PATHOLOGIES TESTICULAIRES 17

1- Aspect morphologique et histologique du testicule: 18

2- Physiologie et fonction: 20

2-1- Compartiment interstitiel: Fonction endocrine du testicule: 20

2-1-1- Les cellules de Leydig: 20

2-1-2- Les cellules péritubulaires myoïdes: 20

2-1-3- Les macrophages et les artérioles: 21

2-2- Compartiment tubulaire: Fonction exocrine du testicule: 21

2-2-1- Les cellules de Sertoli: 21

A- Un rôle structural: 21

B- Création de la barrière hémato-testiculaire: 22

C- Mouvement des cellules germinales: 23

D- Spermiation: 24

E- Phagocytose et pinocytose: 24

F- Fonction sécrétrice: 24

2-2-2- La spermatogenèse: 25

A- Phase prolifération et de différenciation des spermatogonies: 27

B- Phase méiotique des spermatocytes: 28

C- Spermiogenèse des spermatides: 29

2-3- Contrôle neuro-endocrinien de la fonction testiculaire: 30

3- Pathologies du testicule: 35

3-1- Généralités: 35

3-2- Syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT): 36
3-2-1-L'hypospadias: 37
3-2-2- La cryptorchidie: 39
3-2-3- Le cancer testiculaire: 40
3-2-4- L'infertilité: 44
3-3- Etiologie du SDT: 48
3-3-1- Origine génétique: 48
3-3-2- Origine environnementale: 49
3-3-3- Conclusion: 50
4- Apoptose des cellules germinales: 51
4-1- Généralités: 51
4-2- Processus apoptotique: 51
4-2-1- Phase d'initiation: 52
A- Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de la mort: 52
B- Voie intrinsèque ou voie mitochondriale: 53
C- Voie perforines/granzymes dépendante: 54
4-2-2- Phase effectrice: 54
4-2-3- Phase de dégradation: 54
4-3- Apoptose des cellules germinales: 55
4-3-1- Apoptose des cellules germinales chez le mâle prépubère: 55
4-3-2- Apoptose des cellules germinales chez le mâle adulte: 55
4-3-3- Effecteurs de l'apoptose des cellules germinales: 56
A- Protéines de la famille de Bcl2 et p53: 57
B- Protéines de la famille des Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAP): 58
C- La protéine Fas et son ligand FasL: 58
D- La familles des caspases: 59
E Autres effecteurs: 59
CHAPITRE 2: CHOC THERMIQUE ET PROTÉINES DE RÉPONSE AU CHOC THERMIQUE 61
1- La réponse au choc thermique: 61
2- Les facteurs de transcription de choc thermique ou Heat Shock Factors (HSFs): 62
2-1- Classification et rôles des HSFs: 62
2-2- Activation des HSFs: 63
2-3- HSF1: 64
2-4- HSF2: 66

3- Les protéines de choc thermique ou Heat Shock Proteins (HSPs): 67
3-1- Généralités: 67
3-2- Nouvelle nomenclature et caractéristiques des HSPs: 68
3-2-1- La famille des petites HSPs ou HSPBs: 69
3-2-2- La famille des HSP40 ou DNAJs: 70
3-2-3- La famille des HSP70 ou HSPAs: 71
3-2-4- La famille des HSP90 ou HSPCs: 72
3-2-5- La famille HSP110 ou HSPHs: 72
3-3- HSP70: 73
3-3-1- Généralités: 73
3-3-2- HSP70 constitutivement exprimées: cas de HSP70-2 ou HSPA2: 73
3-3-3- HSP70 induites par le stress: exemple de HSP70 ou HSPA1: 76
CHAPITRE 3: RÉGULATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES 77
1- Généralités: 77
2- La méthylation de l'ADN: 78
3- Le remodelage de la chromatine par modification des histones: 79
4- Les miARNs: 80
4-1- Mécanismes d'action: 80
4-1-1- Inhibition de la traduction: 81
4-1-2- Déstabilisation de l'ARNm cible: 82
4-1-3- Autre mécanisme: 83
4-2- Rôles: 83
4-3- Implication des miARNs dans l'infertilité masculine: 85
CHAPITRE 4: LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS 87
1- Définition: 87
2- Origine: 88
2-1- Origine naturelle: 88
2-1-1- Les hormones mammifères naturelles, les œstrogènes: 88
2-1-2- Les phytohormones, les phyto-œstrogènes: 88
2-1-3- Les myco-hormones: les myco-œstrogènes: 90
2-2- Origine artificielle: 91
2-2-1- Molécules produites pour leur effet hormonal: 92
2-2-2- Molécules produites pour leurs effets autres que hormonal: 93
3- Mécanisme d'action: 96

3-1- Interaction avec le métabolisme hormonal: 96
3-1-1- Modification de la concentration hormonale via une altération de sa synthèse, de son transport, de son métabolisme ou de son excrétion: 97
3-1-2- Interaction avec le récepteur hormonal: 97
3-2- Mécanismes épigénétiques: 99
3-2-1- Altération du profil de méthylation de l'ADN: 99
3-2-2- Modification des histones: 100
3-2-3- Modification des profils d'expressions des miARNs: 100
4- Effets des perturbateurs endocriniens sur les pathologies testiculaires: 101
4-1- Altération de la stéroïdogenèse: 101
4-2- Altération de la spermatogenèse: 103
4-3- Fenêtres d'expositions aux PEs et notion de programmation des pathologies du testicule: 105
5- Modèle d'un perturbateur endocrinien a activité antiandrogénique: Le flutamide: 108
5-1- Mode d'action du flutamide: 109
5-2-Effet d'une exposition fœtale au flutamide: 111
5-3- Effet d'une exposition adulte au flutamide: 112
6- Problématique des faibles doses: 113
6-1- Qu'est ce qu'une faible dose de PE? 114
6-2- Courbes monotone *versus* non monotone des effets des PEs 115
6-3- Effets potentiels d'une exposition à de faibles doses de PEs sur la fonction de reproduction: 117
MATERIELS ET METHODES 121
1- Rationnel pour le choix d'un modèle d'étude des effets des PEs: 123
1-1- Pourquoi le modèle *in vivo* plutôt que le modèle *in vitro*? 123
1-2- Recommandations de l'OCDE pour les modèles *in vivo* dans l'exploration des effets chimiques sur la reproduction: 124
1-3- Choix de la souche Sprague Dawley: 127
1-4- Choix du perturbateur endocrinien antiandrogénique: le Flutamide: 127
2- Modèle d'exposition *in utero* au flutamide: 128
3- Modèle d'exposition adulte au flutamide avec ou sans période de récupération: 129
4- Prélèvements: 130
5- Principales techniques utilisées: 130
6- Analyses statistiques: 132
OBJECTIFS 135

RÉSULTATS..... 139

1- Liste des publications: 141

2- Article: Programming of adult male germ cell diseases after fetal exposure to low doses of anti-androgen. 143

3- Résultats complémentaires à l'article: Régulation épigénétique de l'apoptose des cellules germinales par les miARNs lors d'une exposition fœtale aux faibles doses de flutamide:..... 197

DISCUSSION..... 201

1- Génération d'un modèle isomorphique pour l'étude de l'exposition développementale aux PEs de type antiandrogènes: 204

2- L'exposition *in utero* au flutamide induit une hypospermatogenèse irréversible à l'âge adulte: mécanismes moléculaires. 208

3- L'exposition au flutamide à l'âge adulte induit des effets réversibles: notion de programmation développementale d'une pathologie adulte 214

4- Exposition *in utero* aux antiandrogènes, notion de seuil d'activité: Courbes monotones et non monotones. 215

CONCLUSION & PERSPECTIVES..... 219

ANNEXES..... 223

Annexes 1: article2 225

BIBLIOGRAPHIE..... 251

& LISTE DES FIGURES &

Figure 1: Structure de l'appareil reproducteur masculin chez l'homme. D'après [1] 17
Figure 2: Histologie du testicule (coupe longitudinale) 18
Figure 3: Structure des tubes séminifères (A) à faible grossissement et (B) à fort grossissement 19
Figure 4: Représentation schématique de la structure du tube séminifère avec les différents types de jonctions selon [13] 22
Figure 5: Représentation schématique illustrant la théorie du mouvement des cellules germinales de la base vers le compartiment adluminal de l'épithélium séminifère et de la restructuration des jonctions de l'épithélium séminifère d'après [11] 23
Figure 6: Représentation schématique de la spermatogenèse chez les rongeurs. D'après [22] 26
Figure 7: Modèle comparatif des spermatogonies chez les rongeurs et les primate. D'après [24] 27
Figure 8: Spermiogenèse 29
Figure 9: Modèle représentatif du contrôle hormonal de la fonction testiculaire chez trois espèces différentes. 31
Figure 10: Les modes d'action de FSH et la testostérone (T) sur la spermatogenèse du rat(a) et de l'homme(b) 33
Figure 11: Complexité des facteurs impliqués dans la régulation endocrine et paracrine du testicule. 34
Figure 12: Origine fœtale de l'altération des fonctions de reproduction masculine aboutissant au SDT d'après [70] 37
Figure 13: Evolution de l'incidence annuelle de l'hypospadias en France de 1979 à 2001 D'après les données du registre des malformations/ institut Européen des Génomutations 38
Figure 14:Evolution de l'incidence annuelle du cancer testiculaire dans dix pays. D'après [123] 42
Figure 15: Evolution de l'incidence annuelle du cancer testiculaire dans dix pays.D'après [124] 42
Figure 16: Le syndrome de dysgénésie testiculaire (SDS) D'après [77] 50
Figure 17: Représentation morphologique et biochimique des trois phases de l'apoptose: phases d'initiation, effectrice et de dégradation. D'après [181] 52
Figure 18: Représentation schématique des processus apoptotiques: Avec les deux principales voies intrinsèque et extrinsèque ainsi que la voie des perforines/granzymes. D'après[180] 53
Figure 19: représentation schématique de l'apoptose des cellules germinales avec les différents effecteurs pro et anti-apoptotiques impliqués. D'après [183] 56
Figure 20 : Comparaison de la structure des protéines de la famille Bcl-2 d'après[207]. 57
Figure 21 : Structure des differents HSFs humains adapté de [244] 63
Figure 22: Activation des HSFs (exemple de HSF1) D'aprés [260] 64
Figure 23: Représentation schématique de l'induction des HSPs après un stress environnemental. D'après [233] 68
Figure 24: Fonctions de BAG6 durant le processus de maturation spermatique.D'après[322] 75
Figure 25: Contrôle post transcriptionnel de HSPA2 par ELAVL1 et son implication dans la progression de la spermatogenèse. D'après [321] 75
Figure 26: Mécanismes épigénétiques. 78

Figure 27: Mécanisme moléculaire de l'action des miARNs via le complexe miRISC . Modifié d'après [375] 81
Figure 28: Expression de certains miARNs et leur principales cibles pendant la spermatogenèse et dans chaque type cellulaire d'après [409]..... 84
Figure 29: Homologie de structure de certaines phyto-œstrogènes avec le 17-ß-oestradiol (E2). Différentes classes peuvent être citées: les isoflavones, les coumestans, les stilbenoïdes et les liganans. D'après [452] 89
Figure 30: Structure chimique de la zéaralénone (ZEA) 91
Figure 31: Structure chimique de deux hormones de synthèse (diéthylstilbestrol et l'éthinylestradiol) comparées à celle du 17-ß-oestradiol 92
Figure 32: Structure chimique de quelques xéno-œstrogène de synthèses. 94
Figure 33: Modes d'action agoniste et antagoniste d'un PE par interactions avec le récepteur hormonal. 98
Figure 34: Schéma représentatif des effets de quelques PEs sur la stéroïdogenèse des cellules de Leydig. D'après [493] 102
Figure 35: Schémas représentatif des effets de quelques PEs sur la spermatogenèse via une altération du fonctionnement des cellules de Sertoli. D'après [493] modifié. 104
Figure 36: Schéma représentatif de l'effet de l'environnement tout au long de la vie sur le développement et le déclin de la fonction d'un organe jusqu'au développement d'une éventuelle pathologie. D'après [340]. 106
Figure 37: Schémas représentatif des différents stades de développement testiculaire, des différentes cellules et hormones qui peuvent être affectées par une exposition à certains PEs. D'après [493] ... 107
Figure 38: Structure chimique du flutamide et de son métabolite l'hydroxyflutamide comparées à celle de la testostérone et de la DHT. 109
Figure 39: Mécanisme d'action du flutamide sur sa cellule cible. En se fixant sur le AR, le flutamide empêche la fixation des ligands naturels(T ou DHT) et inhibe ainsi la transcription des gènes cibles. 110
Figure 40: Effet dose-réponse d'une molécule X. On y distingue la zone de toxicité (représentée par le cadre rouge), la LOAEL et la NOAEL. 113
Figure 41: Principales courbes dose-réponse à allure monotone ou non monotone..... 116
Figure 42: Modèle expérimental d'exposition in utero au Flutamide..... 128
Figure 43: Modèle expérimental d'exposition à l'âge adulte au Flutamide avec et sans période de récupération. 129
Figure 44: Exemple de résultats obtenus pour un comptage des spermatozoïdes avec le compteur automatique de Life Technology aux doses extrèmes 0 et 10mg/kg/j de flutamide 131
Figure 45: Exemple de résultats obtenus pour une mesure du diamètre des tubules séminifères sur deux rats exposés aux doses 0 et 10 mg/kg/j de flutamide...... 131
Figure 46: Expression des miARNs-29a, b et c et du miARN-125a après exposition in utero au flutamide par rapport à l'expression du miARN de ménage RNU6...... 198
Figure 47: Expression des DNMT a, b et c après exposition in utero au flutamide 199
Figure 48: Signature moléculaire des effets testiculaires persistants chez le rat adulte exposé in utero à de faibles doses de flutamide. (String network)..... 210
Figure 49: Schémas Récapitulatif des voies de signalisations impliquées dans le phénotype d'hypofertilité chez le rat adulte exposé in utero aux faibles doses de flutamide...... 213
Figure 50: Courbe dose réponse représentant le nombre de phénomènes observés à chaque dose de flutamide testée pour l'exposition in utero. 216

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Quelques éléments pouvant favoriser les risques d'hypospadias selon la bibliographie ... 38
Tableau 2: Quelques éléments pouvant favoriser les risques de cryptorchidie selon la bibliographie 40
Tableau 3: Quelques éléments pouvant favoriser les risques de cancer testiculaire selon la bibliographie ... 43
Tableau 4: Valeurs normales du spermogramme selon les normes de l'OMS 2011 ... 45
Tableau 5: Quelques éléments pouvant favoriser les risques d'infertilité selon la littérature ... 47
Tableau 6 : Nomenclature des petites HSPs d'après [297]. ... 69
Tableau 7: Nomenclature de quelques HSP40s d'après [297]. ... 70
Tableau 8: Nomenclature des HSP70 d'après [297]. ... 71
Tableau 9: Nomenclature des HSP90 d'après [297]. ... 72
Tableau 10: Nomenclature des HSP110 d'après [297]. ... 73
Tableau 11: Quelques effets des PE d'origine chimique sur le fonctionnement des cellules de Leydig et la stéroïdogenèse. D'après [493] ... 95
Tableau 12: Effets recensés dans la littérature depuis 20ans des effets de certains PEs sur la fonction de reproduction ... 119
Tableau 13: Principaux protocoles de l'OCDE envisagés pour l'étude des effets d'une substance sur la fonction reproductive ... 126
Tableau 14: Organes prélevés et analyses effectuées ... 130
Tableau 15: Tableau comparatif des différentes corrections statistiques testées avant de choisir Dunnett ... 133
Tableau 16: Résumé des données obtenues sur les testicules de rats adultes traités in utero au flutamide. ... 206
Tableau 17: Résumé des critères d'analyse avec leurs valeurs associées utilisés lors de l'évaluation de la plausibilité statistique d'une relation NMDR. D'après [701] et [702]. ... 217
Tableau 18: Résumé du score total pour évaluer la plausibilité statistique d'une relation NMDR. D'après [701] et [702]. ... 217

LISTE DES ABEVIATIONS

- **3βHSD:** 3β-hydroxystéroïde déhydrogénase de type1

- **aCASP3:** Caspase 3 activée
- **ADN:** Acide désoxyribonucléique
- **AGO:** Argonaute
- **AIF:** Apoptosis Inducing Factor
- **AMH: H**ormone Anti-Müllerienne
- **AMPc:** Adénosine Monophosphate cyclique
- **ANSES:** Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail
- **Apaf-1:** Apoptotic Protease Activating Factor-1
- AR: Récepteur aux Androgènes
- **ARE:** Eléments de Réponse aux Androgènes
- **ARN:** Acide Ribonucléique
- **ATP:** Adénosine Trophosphate

- **BAD:** BCL2 Associated Agonist Of Cell Death
- **BAG6:** BCL2-Associated Athanogene 6
- **BAK:** BCL2 Antagonist/Killer
- **BARD1:** BRCA1 Associated Ring Domain 1
- **BAT3:** HLA-B-associated transcript3
- **BAX:** BCL2 Associated X Protein
- **BCL2:** B-Cell CLL/Lymphoma 2
- **BH:** Bcl-2 Homology domain
- **BPA:** Bisphénol A

- **CASP:** Caspase
- **CIPR:** Commission Internationale de Protection Radiologique
- **CIS:** Carcinome *in situ*
- **CRBP1:** Cellular Retinol Binding Protein 1
- **CSS:** Cellule Souche Spermatogoniale

- **DBD:** Domaine de liaison à l'ADN
- **DCED:** Danish Center for Endocrine Disruptors
- **DDT:** Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane
- DEHP: DiEthylHexyl Phthalate
- **DES:** Diéthylstilbestrol
- **DGCR8** (DiGeorge syndrome critical region 8
- **DHT:** dihydrotestostérone
- **DISC:** Death Inducing Signaling Complex
- **DJA:** Dose Journalière Admissible
- **DMRT1:** Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1
- **DNAJA:** Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member A
- **DND1:** DND MicroRNA-Mediated Repression Inhibitor 1
- **DNMT:** ADN methyltransferase

- **DPC:** Day Post Partum

- **E2:** 17-ß-oestradiol
- **EB:** Estradiol Benzoate
- **EE2:** 17α-ethinyl estradiol
- **EFSA:** Autorité européenne de sécurité des aliment
- **eIF:** eukaryotic Initiation Factor
- **ELAVL1:** ELAV Like RNA Binding Protein 1
- **ELFE:** Etude Longitudinale Française Dès l'Enfance
- **EPA:** Agence de Protection de l'Environnement
- **ER:** Récepteur aux Estrogènes
- **EZH2:** Enhancer of Zeste Homolog 2

- **FADD:** Fas-associated death domain
- **FEQ:** Concentration Equivalente de Flutamide
- **FSH:** Hormone Folliculo-Stimulante

- **GD:** Gestational Day
- **GDF3:** Glial Cell Derived Neurotrophic Factor 3
- **GnRH:** Gonadotropin Releasing Hormone
- **GTP:** Guanosine Triphosphate

- **hCG:** hormone Chorionique Gonadotrope humaine
- **HDL:** Lipoprotéines de Haute Densité
- **HSE:** Heat Shock Elements
- **HSF:** Heat Shock Factor
- **HSP:** Heat Shock Proteins
- **HSR:** Heat Shock Response
- **HSPA:** Heat Shock Protein Family A (HSP70)
- HSPB: Heat Shock Protein Family B
- **HuR:** Human antigen R

- **IAP:** Inhibitors of Apoptosis Proteins
- **IGF:** Iinsulin-like Growth Factor
- **IL:** Interleukine
- **INSL3:** Insulin-Like 3
- **IRM:** Imagerie à Résonnance Magnétique

- **LH:** Hormone Lutéinisante
- **LO(A)EL:** Lowest Observed (Adverse) Effect Level

- **MCL1:** Myeloid Cell Leukemia Sequence 1
- **MEKK:** MAPK/ERK Kinase Kinase 1
- **MRE:** Eléments de Reconnaissance aux miRNA

- **ncARN:** ARN non codant
- **NCD:** Non Communicable Diseases
- **NMDR:** Non-Monotonic Dose Response
- **NOA:** Azoospermie Non Obstructive
- **NOAEL:** No Observed Adverse Effect Level

- **TCDD:** 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine

- **OCDE:** Organisation de coopération et de développement économiques
- **OCT3/4:** Octamer-Binding Transcription Factor 3/4
- **OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

- **PABP:** poly A Binding Protein
- **PCB:** Polychlorobiphényle
- **PE:** Perturbateurs Endocriniens
- **PEE:** Perturbateurs Endocriniens Environnementaux
- **PFC:** Composés Perfluocarburés
- **PFOS:** Acide Perfluorooctanesulfonique
- **PGC:** Cellules Germinales Primitives
- **piARN:** petits ARNs piwi-associés
- **PKC:** Protéine Kinase C
- **PND:** Post Natal Day
- **PTN:** programme toxicologique national
- **PVC:** polyvinyl chloride

- **RISC:** RNA-induced silencing complex

- **SD:** Sprague Dawley
- ***SDT:*** Syndrome de Dysgénésie Testiculaire
- **SF-1:** Steroidogenic Factor-1
- **SG:** Semaine de Gestation
- **siARN:** ARN interférant
- **Smac DIABLO:** Second mitochondria-derivated activator of caspase/Direct Inhibitor of Apoptotsis Binding protein with Low pI
- **SOX:** SRY-related HMG-box
- **StAR:** Steroidogenic Acute Regulatory

- **TGCT:** Tumeur Testiculaire des Cellules Germinales
- **TGF:** *Transforming Growth Factor*
- **TNF:** Tumor Necrosis Factor
- **TRAIL:** TNFα related apoptosis-inducing ligand
- **TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

- **US-EPA:** Agence de Protection Environnementale des USA
- **US-NTP:** Programme National de Toxicologie des Etats Unis

- **WH:** Wistar Han

- **XIAP:** X-linked inhibitor of apoptosis

- **ZAL:** Zéranol
- **ZEA:** Zéaralénone

AVANT PROPOS

Parallèlement à des anomalies de la reproduction de plusieurs espèces de la faune sauvage, nous observons depuis une cinquantaine d'années, chez l'homme, un déclin drastique de la qualité du sperme, une augmentation de la prévalence des pathologies de la sphère uro-génitale et des taux de cancers testiculaires. Ces pathologies sont regroupées sous le nom de syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT).

Lors des vingt dernières années, l'implication de substances chimiques ayant la propriété d'interférer avec le système endocrinien et appelées "perturbateurs endocriniens" (PEs) est de plus en plus au centre de la problématique. La prise de conscience des effets réels de ces molécules a probablement été favorisée par les conséquences de la consommation pendant la grossesse de diéthylstilbestrol (DES). Cette molécule découverte en 1938, présentait une activité œstrogénique bien plus importante que toutes celles synthétisées auparavant et beaucoup moins chère à produire. Les effets du DES sur les générations à venir ont été drastiques (adénocarcinome vaginal et malformation des organes reproducteurs chez les filles et hypospadias, cryptorchidie, et hypofertilité chez les garçons)

La communauté scientifique multiplie depuis les rapports et les programmes ayant pour buts de mieux appréhender le fonctionnement des PEs et de développer des modèles d'études robustes et reproductibles qui permettent d'évaluer au plus juste le mode d'action de ces PEs ainsi que leurs risques.

Néanmoins, une question critique est la détermination d'une dose potentiellement sans effet des PEs afin de pouvoir estimer une dose sans risque pour l'exposition humaine. Les études portant sur les effets d'une exposition aux faibles doses de PEs sont très rares et souvent controversées. L'existence d'un seuil de toxicité aux PEs, la présence ou pas d'effets aux très faibles doses ainsi que le mécanisme moléculaire mis en jeu par ces substances restent peu documentés et souvent des questions ouvertes.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon travail de thèse présenté dans ce manuscrit.

Nous avions ainsi pour objectifs majeurs:

1- d'évaluer les risques, sur le testicule de rat adulte, d'une exposition durant la vie fœtale à une pollution anti-androgénique (ici, le flutamide)

2- d'évaluer les effets potentiels de faibles doses de flutamide (jusqu'à 1000 fois inférieures à la NOAEL décrite)

3- de décrypter un mécanisme d'action moléculaire éventuellement signature d'une exposition aux faibles doses

4- de comparer les résultats obtenus à une autre fenêtre d'exposition à l'âge adulte

INTRODUCTION

CHAPITRE 1: TESTICULE ET PATHOLOGIES TESTICULAIRES

Le tractus génital mâle est constitué de quatre parties (fig.1)

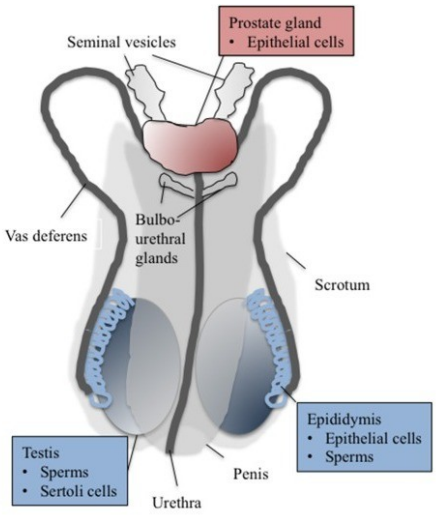


Figure 1: *Structure de l'appareil reproducteur masculin chez l'homme. D'après [1]*

- deux gonades mâles (les testicules), siège de la spermatogenèse et responsables de la sécrétion d'hormones sexuelles mâles,

- trois glandes annexes (les vésicules séminales, la prostate et les glandes de Cowper) qui secrètent le fluide nutritif et lubrifiant appelé liquide séminal et dans lequel sont transportés les spermatozoïdes,

- un système de canaux comprenant les canaux efférents, l'épididyme, le canal déférent et le canal éjaculateur débouchant dans l'urètre. Ce système récolte, stocke et assure le transport des spermatozoïdes à partir des testicules,

- un pénis

1- Aspect morphologique et histologique du testicule:

Le testicule est un organe de forme ovale situé en dehors de la cavité pelvienne. Au cours du développement, chaque testicule migre le long de la cavité péritonéale dans le scrotum en entrainant un repli du péritoine et constituant ainsi une tunique protectrice, la tunique vaginale.

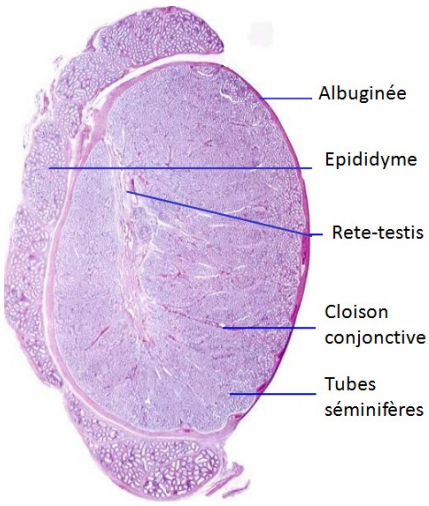


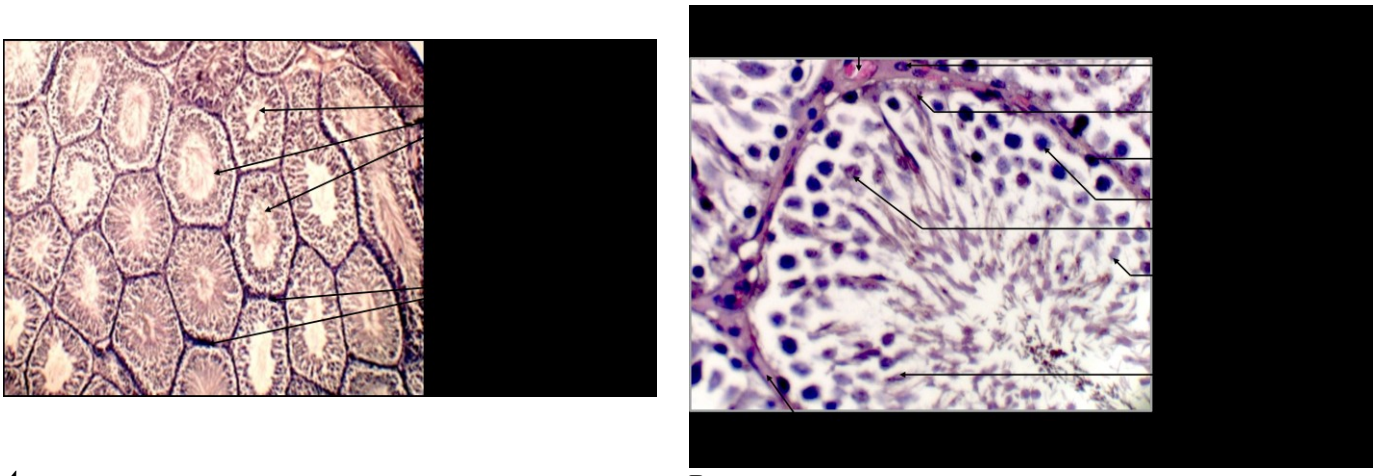
Figure 2: Histologie du testicule (coupe longitudinale)

Chaque testicule est entouré par une couche de tissu conjonctif et de fibres de collagènes appelée albuginée (fig.2). De sa face interne partent plusieurs cloisonnement divisant le testicule en plusieurs lobules testiculaires contenant chacun un à quatre tubes séminifères très contournés, lieu de la spermatogenèse. Chaque tube contient des cellules à différents stades de maturation constituant la lignée germinale et les cellules de Sertoli, cellules nourricières et de soutien de la lignée germinale.

Le tissu interstitiel, espace limitant chacun des tubes séminifères, est un tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi qu'en fibres nerveuses, cellules myoïdes, macrophages et cellules de Leydig. Les cellules de Leydig sont le siège de le stéroïdogenèse; elles contiennent tous les systèmes enzymatiques et cofacteurs nécessaires à la biosynthèse d'hormones stéroïdes à partir du cholestérol.

Les tubes séminifères sont de longues structures à l'intérieur des testicules, délimitées par une gaine tubulaire mince (lamina propria) formée de la membrane basale, de fibroblastes, de fibres de collagène et de cellules myoïdes [2].

A faible grossissement, (fig.3A.), il est possible de distinguer les tubes séminifères coupés en différents plans. Leurs lumières sont bordées par les cellules germinales à différents stades de maturation et les cellules de Sertoli.



A- ***B-***

Figure 3: *Structure des tubes séminifères (A) à faible grossissement et (B) à fort grossissement*

A fort grossissement (fig.3B.), les cellules de Sertoli s'étendent depuis la base (où est situé le noyau) jusqu'à la lumière du tube séminifère. Les cellules de la lignée germinale sont logées dans les invaginations des cellules de Sertoli, et sont organisées selon une maturation dite "centripète" vers la lumière du tube [2]. Les cellules les moins différenciées sont situées du côté basal, en périphérie du tube séminifère tandis qu'au fur et à mesure de leur maturation les cellules les plus différenciées se dirigent vers le côté apical du tube.

De la base du tube vers sa lumière nous distinguons [3]:

- les cellules de Sertoli à noyau triangulaire et cytoplasme abondant,
- les spermatogonies indifférenciées ou spermatogonies A à noyau condensé ainsi que les spermatogonies différenciées ou dites spermatogonies B à noyau plus nucléolé,
- les spermatocytes ayant un gros noyau sphérique et une chromatine plus ou moins compacte,
- les spermatides à petit noyau dense qui se différencient en spermatozoïdes lors du processus de spermiogenèse.

2- Physiologie et fonction:

2-1- Compartiment interstitiel: Fonction endocrine du testicule:

Le compartiment interstitiel contient différents types de cellules:

2-1-1- Les cellules de Leydig:

Il s'agit de cellules polyédriques de 15 à 20 µm de diamètre à noyau arrondi. Ce sont des cellules majoritaires de l'interstitium chez le rat. Elles représentent moins de 5% des cellules du testicule et se regroupent généralement autours de capillaires sanguins. Elles sécrètent des androgènes essentiellement sous forme de testostérone, de dihydrotestostérone (DHT) ainsi que des oestrogènes. En effet, 95% de la testostérone plasmatique est produite au niveau des cellules de Leydig. L'activité de ces cellules est sous le contrôle de la LH antéhypophysaire [4]. La présence dans leur cytoplasme d'un abondant réticulum endoplasmique lisse, de nombreuses mitochondries à crêtes lamellaires ou tubulaires, d'un appareil de Golgi développé et d'inclusions lipidiques sont caractéristiques d'une activité de stéroïdogenèse [5, 6]. Ces cellules sont aussi capables de secréter l'oestradiol en quantité variable, ainsi qu'un grand nombre de facteurs bioactifs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines du testicules (inhibine, activine...).

2-1-2- Les cellules péritubulaires myoïdes:

Ces cellules entourent le tube séminifère et sont retrouvées chez toutes les espèces de mammifères même si leur organisation au sein du tissu interstitiel varie selon les espèces. Chez le rat par exemple, une seule couche de cellules myoïdes riches en filaments d'actine et de myosine est observée. Ces cellules ont un rôle de barrière partiellement perméable ; elles relayent dans l'épithélium germinal quelques effets de la testostérone et autres facteurs de croissance [7]. Elles ont aussi une fonction contractile permettant la progression des spermatozoïdes matures dans le fluide de la lumière des tubes séminifères.

2-1-3- Les macrophages et les artérioles:

Les macrophages jouent un rôle paracrine primordial dans la régulation de la fonction endocrine des cellules de Leydig via la sécrétion de cytokines (telles que IL-1ou TNF-α), la synthèse de prostaglandines ou de facteurs de croissance. Ils peuvent ainsi inhiber la synthèse des stéroïdes et intervenir dans le contrôle de la prolifération des cellules de Leydig. Les macrophages ont aussi un rôle dans la phagocytose et le remodelage tissulaire [8].

Les artérioles et les capillaires quant à eux, délivrent les facteurs de régulations endocrines, en particulier la FSH et la LH, aux cellules cibles du testicule [9].

2-2- Compartiment tubulaire: Fonction exocrine du testicule:

2-2-1- Les cellules de Sertoli:

Ces cellules ont été découvertes pour la première fois en 1865 par Enrico Sertoli qui les a décrite comme des cellules somatiques ayant un rôle de soutient pour les cellules germinales. Il s'agit de cellules étalées à contours irréguliers d'environ 70µm qui reposent sur la lame basale et qui occupent toute la hauteur de l'épithélium séminifère (fig. 4). Elles envoient des prolongements cytoplasmiques autour des cellules germinales. Elles occupent approximativement 17 à 19 % du volume de l'épithélium séminifère. Chez le rat adulte, il en existe environ 40 à 106 par testicule [10]. Les cellules de Sertoli ont plusieurs fonctions essentielles au sein du testicule, Mruk & Cheng ont décrit au moins six rôles essentiels[11]:

A- Un rôle structural:

Les cellules de Sertoli sont indispensables au bon déroulement de la spermatogenèse. Chaque cellule supporte un nombre constant de cellules germinales dont elles dépendent pour la maturation et la survie. En effet, la régulation endocrine de la spermatogenèse (notamment par la FSH et la testostérone) est essentiellement médiée par ce type cellulaire [12]. La protection des cellules germinales est elle aussi contrôlée par les cellules de Sertoli qui participent directement au dépôt des composés de la matrice extra-cellulaire et permettent la formation de jonctions cellulaires spécifiques et [11].

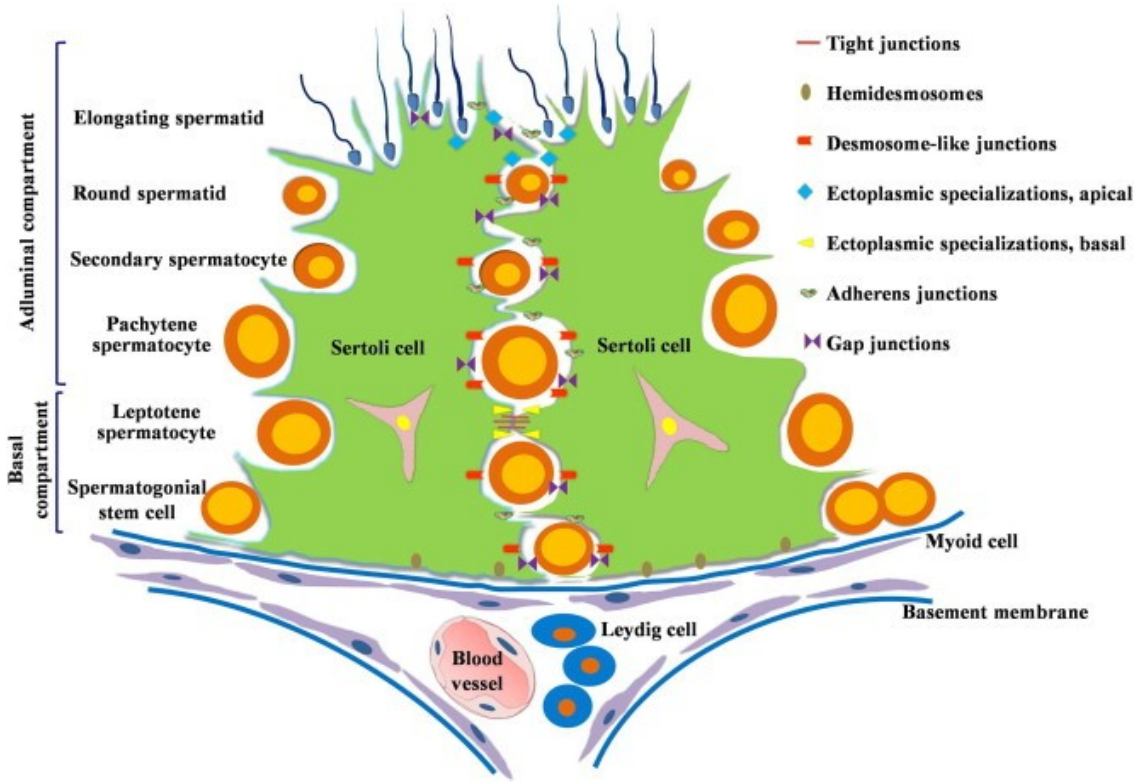


Figure 4: *Représentation schématique de la structure du tube séminifère avec les différents types de jonctions selon [13]*

B- Création de la barrière hémato-testiculaire:

Comme indiqué dans la figure 4, des jonctions serrées au pôle basal relient les cellules de Sertoli entre elles et délimitent le compartiment basal (contenant les spermatogonies et les spermatocytes préleptotènes) et le compartiment adluminal (contenant les autres éléments de la lignée germinale). Les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont reliées par des liaisons type desmosomes et des jonctions communicantes de type gap. Des jonctions rectilignes tubulo-bulbaires relient quant à elles les cellules de Sertoli aux spermatides matures [13]. Les jonctions serrées qu'elles forment participent à la barrière hémato-testiculaire dont les principales fonction sont, de créer un environnement spécialisé, réguler le passage de molécules et enfin, empêcher la reconnaissance, par les cellules immunitaires, de sites antigéniques exprimés sur les éléments de la lignée germinale à partir des stades méiotiques [11]. Il a été décrit qu'une rupture de cette barrière (traumatique, post infectieuse ou post biopsique) serait à l'origine d'un processus d'auto-immunisation pouvant évoluer dans les cas sévères vers une azoospermie [14].

C- Mouvement des cellules germinales:

Les cellules de Sertoli exercent des fonctions mécaniques permettant aux cellules germinales de migrer au fur et à mesure de leur maturation vers la lumière du tube séminifère. Cette action se fait par leur cytosquelette riche en protéines de structure et autres facteurs tels que des cytokines, des protéases, des inhibiteurs de protéases, des protéines kinases, les protéines phosphatases, des protéines de la matrice extracellulaire ou encore des GTPases [11] (fig.5).

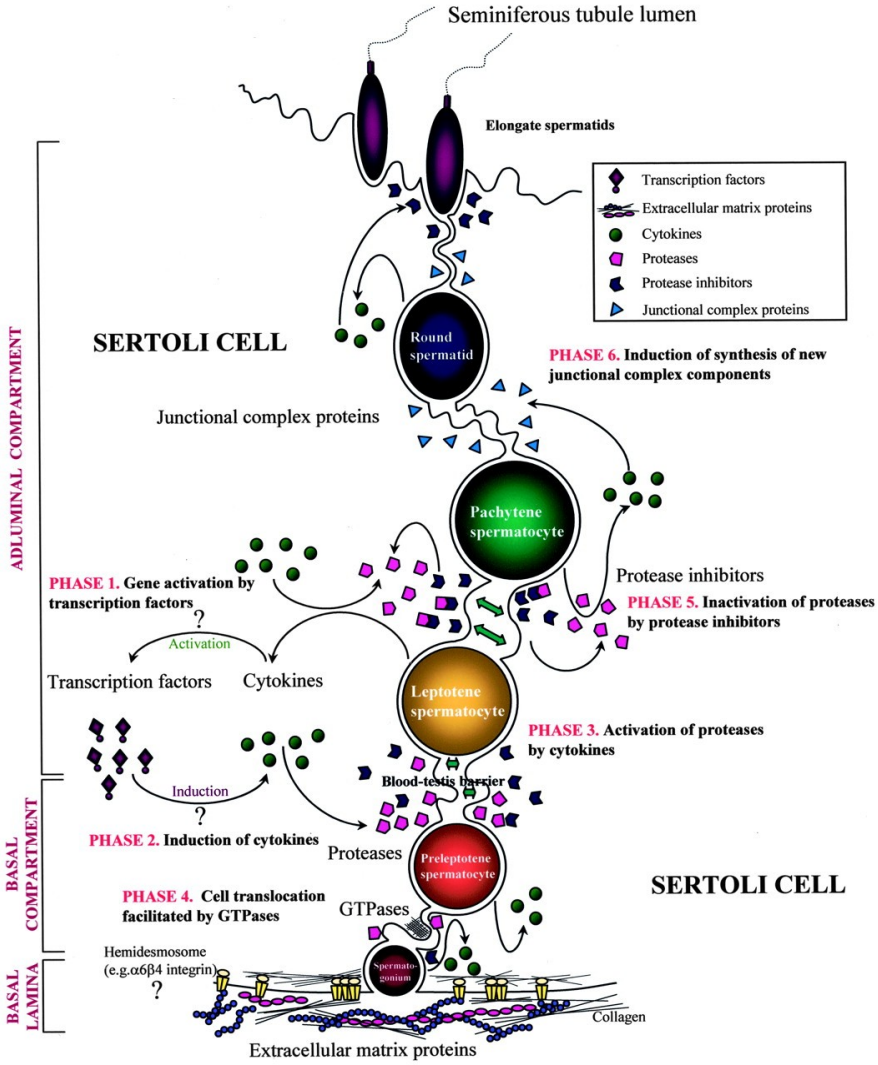


Figure 5: *Représentation schématique illustrant la théorie du mouvement des cellules germinales de la base vers le compartiment adluminal de l'épithélium séminifère et de la restructuration des jonctions de l'épithélium séminifère d'après [11]*

De plus, des études ont montré que la translocation des spermatides allongées le long du tube séminifère est largement conférée par la spécialisation ectopique apicale des cellules de Sertoli (de part la richesse de cette région notamment en réticulums endo- et ectoplasmiques, microtubules et autres protéines motrices telles que les dynéines, myosines, ATPases et GTPases) [11, 15].

D- Spermiation:

Les cellules de Sertoli sont indispensables au processus de spermiation en permettant (1) l'encapsidation des spermatides par un processus cytoplasmique, (2) l'expulsion des spermatides allongées des cryptes Sertoliennes vers la lumière du tube séminifère et (3) le relargage des têtes de spermatides dans la région apicale des cellules de Sertoli ainsi que le détachement du cytoplasme résiduel des spermatozoïdes [11].

E- Phagocytose et pinocytose:

Ces cellules de Sertoli jouent un rôle important dans la phagocytose et l'élimination des cellules germinales en dégénérescence au cours de la spermatogenèse et des corps résiduels issus des spermatides lors de la spermiation. Elles agissent ainsi comme des macrophages afin de maintenir l'intégrité du tube séminifère. Elles sont aussi capables de pinocytose dans le compartiment adluminal et d'endocytose dans le compartiment basal [11].

F- Fonction sécrétrice:

Les cellules de Sertoli sont des cellules sécrétant nombreuses substances au niveau du tube séminifère dont des protéases, des inhibiteurs de protéases, des hormones, des substrats énergétiques, des facteurs de croissance, facteurs paracrines ainsi que des composés de la matrice extracellulaire. Elles synthétisent environ soixante protéines différentes nécessaires à la spermatogenèse [16] dont près de 15% sont des glycoprotéines [11]. Citons par exemple:

- Les protéases (tels que les cathepsine-D, -L et -S, et les métalloprotéases) et leurs inhibiteurs (telle que la cystatin C) qui participent aux différents processus de maintien, réparation, développement et croissance des cellules germinales [12, 17].

- Les protéines de transport et de liaison responsables de l'acheminement de nutriments, de vitamines et d'hormones vers les cellules germinales. Parmi elles, les protéines se liant aux métaux (transferrine, céruloplasmine), aux lipides (clusterine, saposine) ou à des hormones (protéines de liaison aux androgènes ou à l'acide rétinoïque telle que CRBP1) [11].

- Les facteurs de croissance et autres facteurs de régulation cellulaires (facteurs de croissance transformant, les interleukines, la Müllerian Inhibiting Substance et l'inhibine). Ils contrôlent la prolifération des spermatogonies ainsi que les productions hormonales notamment de la FSH par l'inhibine, l'activine et la follistatine [18, 19].

Un dérèglement de l'expression de l'un de ces facteurs peut avoir des conséquences à long terme sur le testicule adulte. En effet, une expression insuffisante d'activine durant le développement testiculaire entraine des testicules de taille plus réduite et une hypofertilité chez l'adulte. Ceci serait la conséquence d'un retard de développement des cellules de Sertoli, entrainant une prolifération réduite des cellules germinales chez l'adulte [20].

- Les composants de la membrane basale, tels que le collagène et la laminine, contribuent à l'intégrité de la structure de l'épithélium séminifère [11, 21].

- des nutriments (tels que des acides aminés, glucides, lipides, vitamines ou encore ions métalliques) sont apportés par les prolongements cytoplasmiques des cellules de Sertoli aux cellules germinales en développement [11].

- Les cellules de Sertoli sécrètent aussi des composants essentiels du fluide testiculaire [11]. Ce fluide joue un rôle important dans la distribution des éléments nutritifs aux cellules germinales en maturation, le relargage des spermatozoïdes et le transport des facteurs de régulation impliqués dans la communication entre les deux parties du tube séminifère. Il permet ensuite l'acheminement des spermatozoïdes du tube séminifère vers le *rete testis*, les canaux efférents puis l'épididyme.

2-2-2- La spermatogenèse:

La spermatogenèse est le processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la transformation des cellules germinales diploïdes en spermatozoïdes haploïdes. Elle se déroule de façon centripète dans la paroi des tubes séminifères. Il s'agit d'un processus très complexe et hautement régulé comprenant trois phases essentielles comme indiqué dans la figure 6 [22].

Les cellules subissent une première **phase prolifération et de différenciation** où les spermatogonies se divisent par simple mitose pour le maintien de la population de cellules

souches et pour donner une spermatogonie qui évolue en spermatogonie différenciée puis en spermatocyte primaire. Les spermatocytes primaires subissent ensuite la deuxième phase, **phase méiotique,** entrainant une réduction du nombre de chromosomes pour aboutir à une spermatide ronde haploïde.

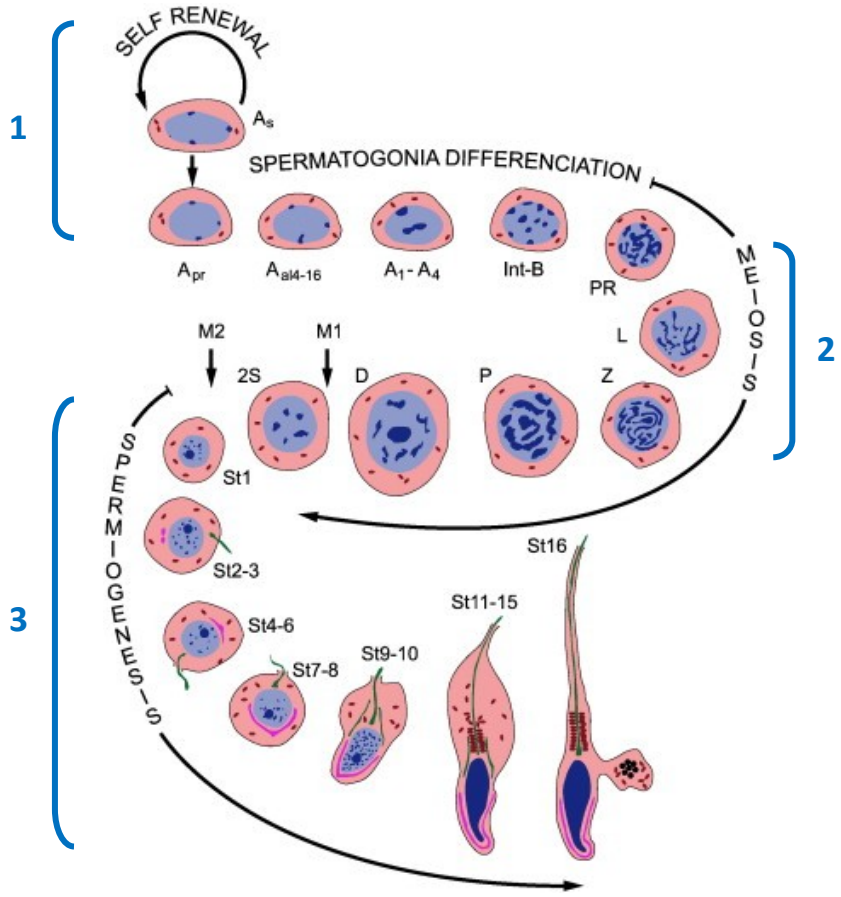


Figure 6: *Représentation schématique de la spermatogenèse chez les rongeurs. D'après [22]*

Enfin, durant la phase post-méïotique, les spermatides rondes se transforment pour aboutir aux spermatozoïdes. C'est la phase d'élongation dite de **spermiogenèse**.

Chez l'homme, la spermatogenèse dure 74 jours et le départ d'une nouvelle lignée est déclenché tous les 16 jours, constituant ainsi le cycle de l'épithélium séminal. Plusieurs cycles spermatogénétiques sont présents afin de permettre une production journalière de spermatozoïdes.

A- Phase proliférative et de différenciation des spermatogonies:

Cette première phase de la spermatogenèse repose sur les cellules germinales souches, les spermatogonies, cellules diploïdes disposées à la périphérie du tube séminifère qui se divisent par mitoses. Il s'agit de cellules arrondies, de 10 à 15µm au cytoplasme clair et noyau ovoïde [23]. Les spermatogonies dérivent des cellules souches spermatogoniales (CSS) et sont essentielles pour le maintien de la spermatogenèse tout au long de la reproduction des mammifères. Leur nombre et leurs stades de différenciation varient d'une espèce à l'autre de mammifères (fig.7).

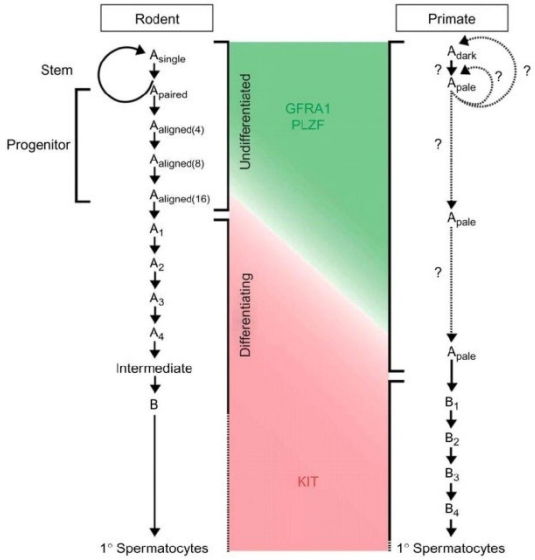


Figure 7: *Modèle comparatif des spermatogonies chez les rongeurs et les primate. D'après [24]*

Chez l'homme et les primates de façon générale, trois principaux types de spermatogonies ont été décrits: (1) les spermatogonies indifférenciées A_{dark} (A_d) qui ont un aspect sombre et une chromatine dense, (2) les spermatogonies A_{pale} (A_p) plus claires et à chromatine poussiéreuse qui commencent à se différencier et enfin (3) les spermatogonies B différenciées à noyau plus irrégulier et à chromatine mottée. Chez les primates, la spermatogenèse débute à partir des spermatogonies A_d ou A_p qui représentent respectivement les CSS de réserve et actives (c'est à dire qui vont entrer dans le processus de différenciation) [23].

Chez les rongeurs, les CSS sont rares (approximativement 1/3000 cellules testiculaires chez l'adulte)[25, 26] et les catégories de spermatogonies sont différentes. Les spermatogonies dites A_{single} (A_s) sont considérées comme les vraies CSS. Par une simple mitose, les A_s donnent deux cellules, une autre A_s et une spermatogonie dite A_{paired} (A_{pr}) qui formera au fur et à mesure de la différenciation une chaine de quatre à seize spermatogonies alignées (A_{al}) interconnectées par des ponts cytoplasmiques. Toutes ces spermatogonies (A_s, A_{pr} et A_{al}) sont dites indifférenciées et ont encore des propriétés d'auto-renouvellement. Les A_{al} se différencient ensuite en spermatogonies A_1 qui subissent des divisions mitotiques en cascade pour générer les spermatogonies A_2, A_3, A_4, $A_{intermédiaire}$ (A_{Int}), puis enfin la spermatogonie différenciée dite B [22]. Une mitose finale des spermatogonies de type B donne naissance aux spermatocytes primaires (spermatocytes I) dits préleptotènes [27, 28]. Ces divisions mitotiques des spermatogonies ont lieu de façon continue permettant ainsi le maintien et le renouvellement de l'épithélium séminifère [2].

B- Phase méiotique des spermatocytes:

Les spermatocytes forment de grandes cellules à noyau arrondi contenant plusieurs nucléoles. Les spermatocytes préleptotènes (premier stade de spermatocytes) traversent les jonctions serrées pour atteindre le compartiment adluminal où ces cellules subissent une courte **interphase**, pendant laquelle s'effectue une réplication d'ADN (les spermatocytes primaires étant des cellules à 2n chromosomes). Il s'en suit une première division cellulaire, **méiose I** ou **division réductionnelle**, comportant une prophase I longue au cours de laquelle le spermatocyte I passe par cinq stades successifs : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse et durant laquelle a lieu le brassage génétique qui assure la diversité génétique des gamètes[29]. Puis a lieu la métaphase I, où les chromosomes homologues se disposent de part et d'autres de la plaque équatoriale. L'anaphase I verra les chromosomes homologues se séparer et s'orienter vers chacun des pôles cellulaires de façon aléatoire et une télophase I terminera cette première méiose [30]. Ainsi, les spermatocytes primaires (2n chromosomes, 4 chromatides) donnent des spermatocytes secondaires (n chromosomes, 2 chromatides). Ces spermatocytes secondaires présentent un noyau arrondi à chromatine homogène mais sont difficilement visualisables en histologie de part leur brève durée de vie d'environ un jour.

Après une courte interphase où les chromosomes se décondensent partiellement, les spermatocytes subissent la seconde division méiotique (**méiose II**) ou **division équationnelle**

sans réplication préalable d'ADN. Lors de l'anaphase de la seconde méiose, les centromères se séparent, entraînant la répartition des chromatides sœurs de chaque chromosome vers chacun des pôles cellulaires de façon aléatoire. Les chromatides sœurs se répartissent entre les deux cellules filles pour donner les spermatides rondes (n chromosomes, 1 chromatide) [30].

C- Spermiogenèse des spermatides:

Les spermatides, petites cellules de 6 à 7µm, sont localisées près du centre du tube séminifère et sont subdivisées en trois classes: (1) les spermatides rondes ayant un noyau rond à chromatine pâle et homogène, (2) les spermatides en élongation dont le noyau s'allonge et à chromatine plus sombre et (3) les spermatides en condensation dont le noyau est très allongé avec une partie caudale globulaire et une partie antérieure saillante, et dont la chromatine est sombre et condensée (fig.8). Au cours de la spermiogenèse, les spermatides rondes et immatures se différencient en spermatozoïdes après plusieurs modifications morphologiques.

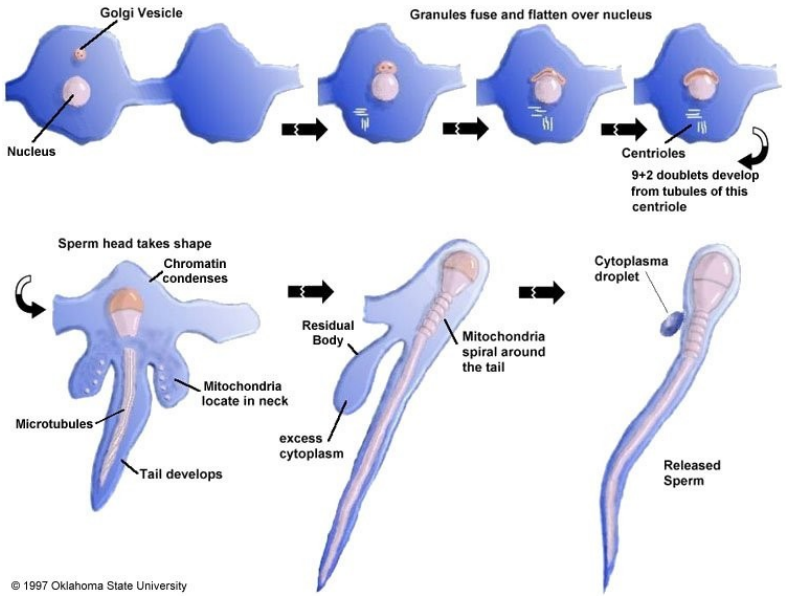


Figure 8: *Spermiogenèse*

D'après animalsciences.missouri.edu

La spermiogenèse repose sur la différenciation des spermatides via cinq étapes clés:

a- La formation de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi. L'appareil de Golgi fournit des petites vésicules qui fusionnent pour donner une vésicule unique: la vésicule acrosomiale qui se dispose sur un pôle du noyau (constituant le futur pôle antérieur du futur spermatozoïde); elle s'étale progressivement sur la surface du noyau et couvre les deux tiers antérieurs; son contenu devient dense par accumulation d'enzymes protéolytiques indispensables à la fécondation [31]. On assiste également au remplacement des histones par des protéines nucléaires plus basiques, les protamines.

b- La formation de flagelle à partir du centre cellulaire. Un des centrioles loge au pôle opposé de l'acrosome alors que l'autre centriole subit de profondes modifications aboutissant à la mise en place d'une structure complexe en forme d'entonnoir, la pièce connective qui se prolongera par un axonème.

c- La formation du manchon mitochondrial. Les mitochondries initialement dispersées dans le cytoplasme se regroupent en spirale autour de la partie proximale de l'axonème pour constituer la pièce intermédiaire du flagelle [3]. Le flagelle se développe à partir du centriole distal.

d- L'isolement des restes cytoplasmiques. Des microtubules se développement en arrière de l'acrosome et les corps résiduels (fragments de cytoplasme non utilisés) seront phagocytés par les cellules de Sertoli. Il ne persistera qu'une fine couche autour du manchon mitochondrial.

e- La condensation du noyau. Via le remplacement des histones par d'autres les protamines, la chromatine se condense progressivement pour donner un noyau très compact de forme allongée.

f- Une dernière étape complète cette spermiogenèse. Il s'agit de la translocation des spermatozoïdes matures de la partie adluminale du tube séminifère vers la lumière par un détachement des cellules de Sertoli. Il s'agit de la spermiation [2].

2-3- Contrôle neuro-endocrinien de la fonction testiculaire:

D'une manière générale, les deux fonctions testiculaires endocrine (production d'androgènes) et exocrine (spermatogenèse) sont sous le contrôle d'hormones synthétisées par le système hypothalamo-hypophysaire et par le testicule lui même [32-37]. L'hypothalamus

secrète de façon pulsatile la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) stimulant l'ante-hypophyse qui secrète à son tour l'Hormone Folliculo-Stimulante (FSH) et la l'Hormone Lutéinisante (LH) [38].

Il a longtemps été admis que chez toutes les espèces, un seul modèle de régulation hormonale existait en faisant intervenir en tête la GnRH contrôlant deux boucles de rétro-contrôle indépendantes responsables de (1) la spermatogenèse via l'axe FSH-inhibine et (2) la stéroïdogenèse via l'axe LH-testostérone [39]. Comme indiqué par la figure 9, ce modèle est un peu plus complexe et peut varier d'une espèce à l'autre. Comme le décrivent Schlatt & Ehmcke dans leur revue de 2014 à partir de plusieurs études effectuées sur différentes espèces (le hamster, le primate, la souris et le rat), il a été démontré que ces deux principaux axes (FSH-inhibine et LH-testostérone) ne sont pas vraiment indépendants. La testostérone pouvant par exemple stimuler les cellules de Sertoli par une action paracrine.

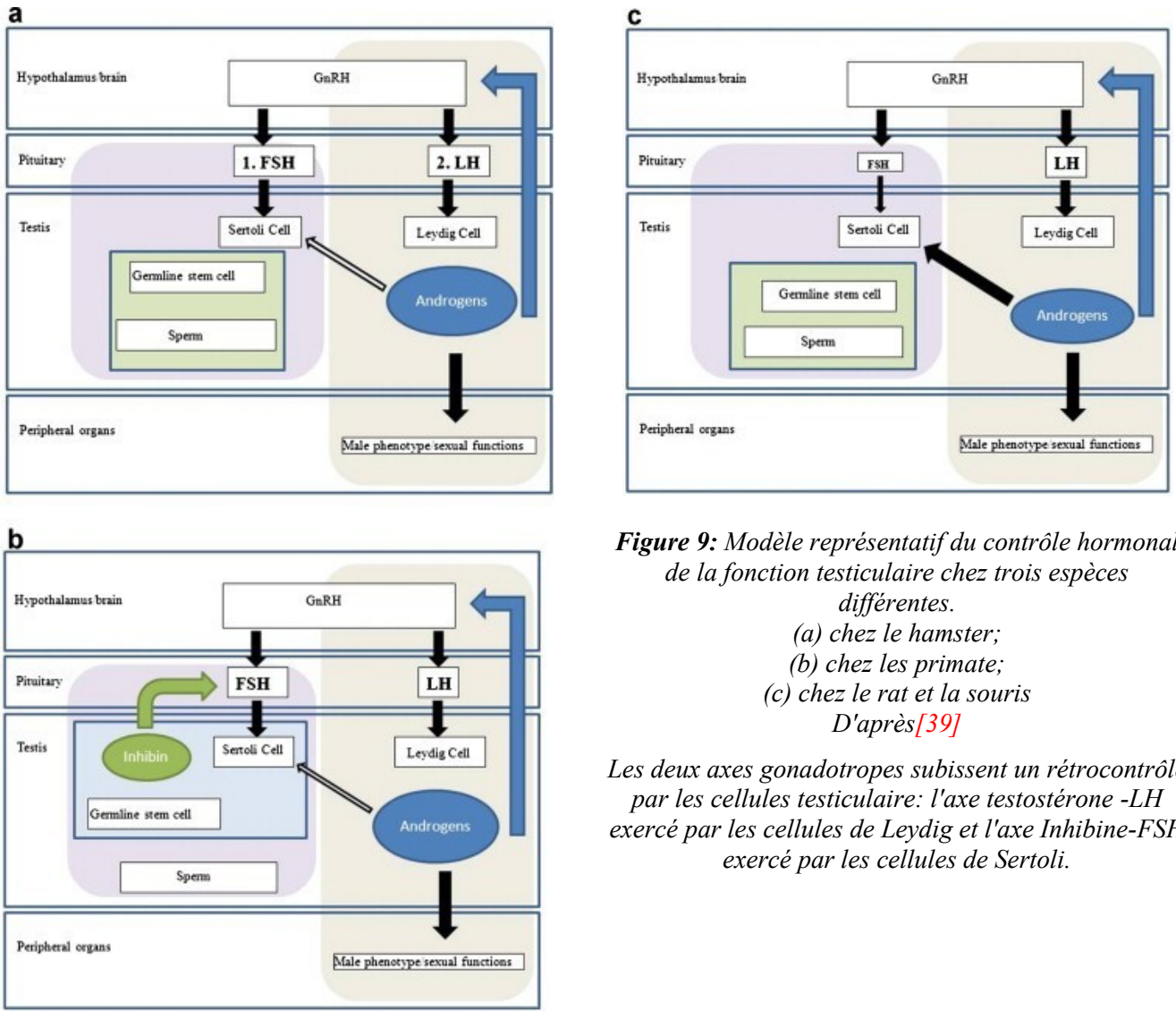


Figure 9: *Modèle représentatif du contrôle hormonal de la fonction testiculaire chez trois espèces différentes.*
(a) chez le hamster;
(b) chez les primate;
(c) chez le rat et la souris
D'après[39]

Les deux axes gonadotropes subissent un rétrocontrôle par les cellules testiculaire: l'axe testostérone -LH exercé par les cellules de Leydig et l'axe Inhibine-FSH exercé par les cellules de Sertoli.

Chez le hamster (fig.9a), contrairement à d'autres espèces de rongeurs, l'axe FSH dépendant est fortement prépondérant et l'inhibine ß n'exerce pas de rôle majeur. Dans un premier temps, quand l'animal est sexuellement inactif, la FSH est fortement secrétée pour initier le processus de la spermatogenèse. Quelques semaines plus tard, la LH sera à son tour secrétée afin de stimuler les fonctions sexuelles et les caractères sexuels secondaires [40]*in*[39].

Chez le rat ou la souris (Fig.9c), la FSH n'est pas indispensable au maintien de la fertilité. En effet, elle ne stimule à elle seule que la maturation de 5% des spermatides rondes et ceci uniquement sous l'action qu'exercent les androgènes sur les cellules de Sertoli [41, 42]. L'axe le plus prépondérant est celui de la LH-testostérone. Chez ces espèces, l'épithélium séminifère est toujours actif ce qui ne rend pas nécessaire la présence d'un système de régulation.

Chez les primates en revanche, (Fig.9b) les récepteurs de la FSH sont exclusivement exprimés au niveau des cellules de Sertoli et cette hormone semble indispensable à une spermatogenèse normale [43]. La FSH cible indirectement les cellules germinales pré-méiotiques, via les cellules de Sertoli et contrôle leur prolifération et différenciation. Une inhibition de FSH chez les singes macaques empêche la prolifération des spermatogonies et leur passage en spermatocytes [44] mais ce blocage est réversible après injection de FSH aux singes pré-pubères. Chez l'homme, des mutations de la sous-unité FSHß entraine une azoospermie associée à des testicules de petite taille ce qui prouve encore l'importance de cet axe FSH-inhibine chez les primates [45]. Chez les primates, le taux d'inhibine ß dépend de la taille testiculaire, en effet une hémi-castration réduit de moitié le taux sérique d'inhibine ß [46]. Cette diminution serait proportionnelle au nombre de spermatogonies de type A présentes dans le testicule [47, 48] ce qui rend cette hormone un bon marqueur de l'intégrité et de l'activité des cellules germinales testiculaires. Chez les primates, l'inhibine ß exerce un rétrocontrôle négatif sur la FSH et c'est cet axe qui sera l'effecteur clé de la spermatogenèse. L'axe LH-testostérone interviendra dans le contrôle de la stéroïdogenèse et le contrôle des caractères sexuels secondaires, mais l'action des androgènes sur les cellules de Sertoli est moins importante que chez les rongeurs. Il a néanmoins été démontré que les récepteurs aux androgènes situés sur les cellules de Sertoli jouent un rôle clé au cours des étapes méiotiques et post-méiotiques de la spermatogenèse et qu'ils sont indispensables au bon déroulement de la stéroïdogenèse [49-51].

Une autre revue établie par Ruwanpura en 2010 établit un schéma comparatif entre ces régulations endocriniennes chez l'homme et les rongeurs (fig.10).

Ainsi, si la régulation de la spermatogenèse dépend en premier lieu de l'axe hypothalamo-hypophysaire, elle implique aussi un système de régulation local qui module les effets du système endocrine. Cette régulation locale fait intervenir des contacts cellulaires (cellules de Leydig/cellules de Sertoli, cellules de Sertoli/cellules germinales ou encore cellules germinales/cellules germinales) [52] mais aussi des facteurs de régulation à action paracrine ou autocrine autres que l'inhibine ß.

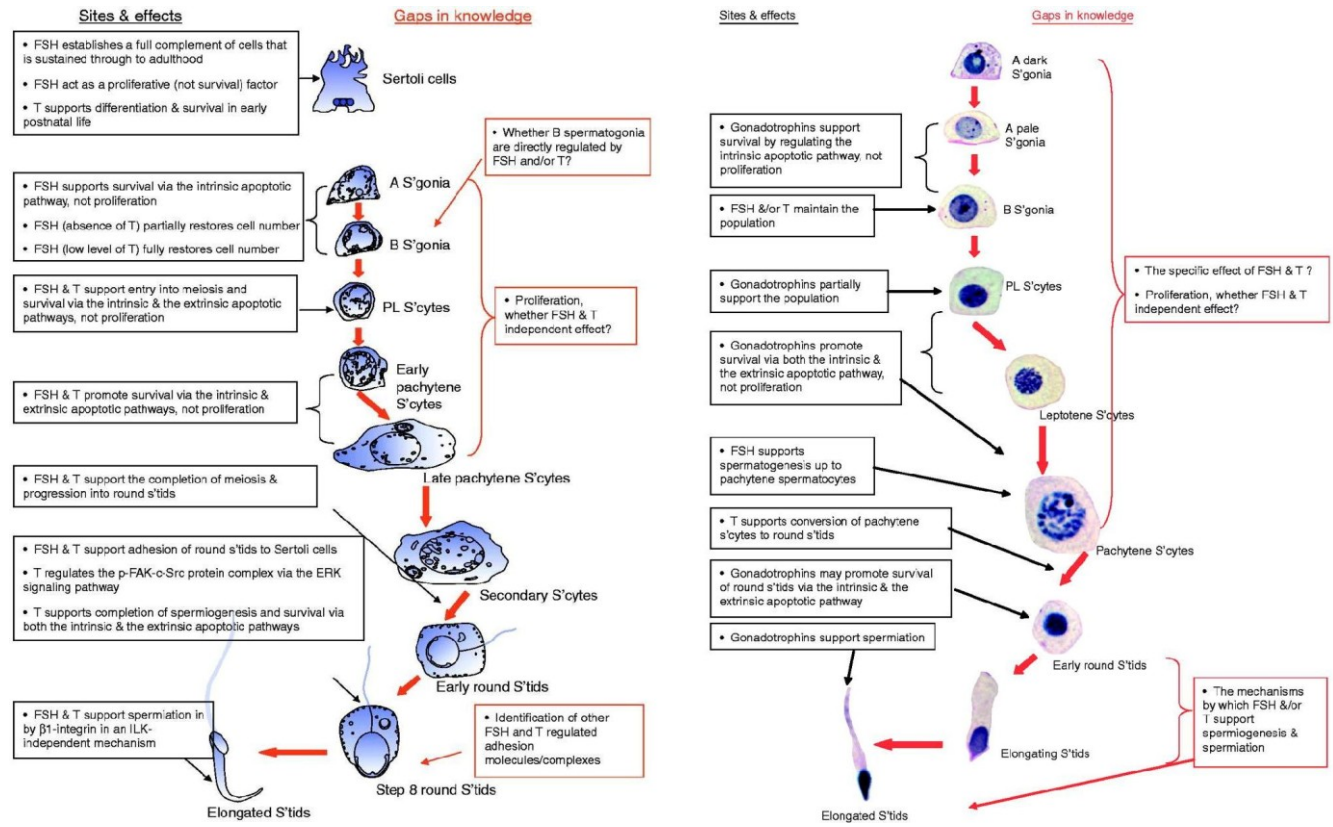


Figure 10: *Les modes d'action de FSH et la testostérone (T) sur la spermatogenèse du rat(a) et de l'homme(b)*

basée sur des conclusions de la littérature (en noir) et les questions encore posées (en rouge). D'après[53]

Le grand nombre de cascades de signalisation et de voies intracellulaires de transduction de signaux décrites dans le contrôle de la fonction testiculaire et faisant intervenir un nombre très important de facteurs endocrines, paracrines, intracrines ou

juxtacrines rendrait une description détaillée de ce mécanisme quasi-impossible comme indiqué par le schéma réalisé par Weinbauer et *al.* en 1997 (fig. 11).

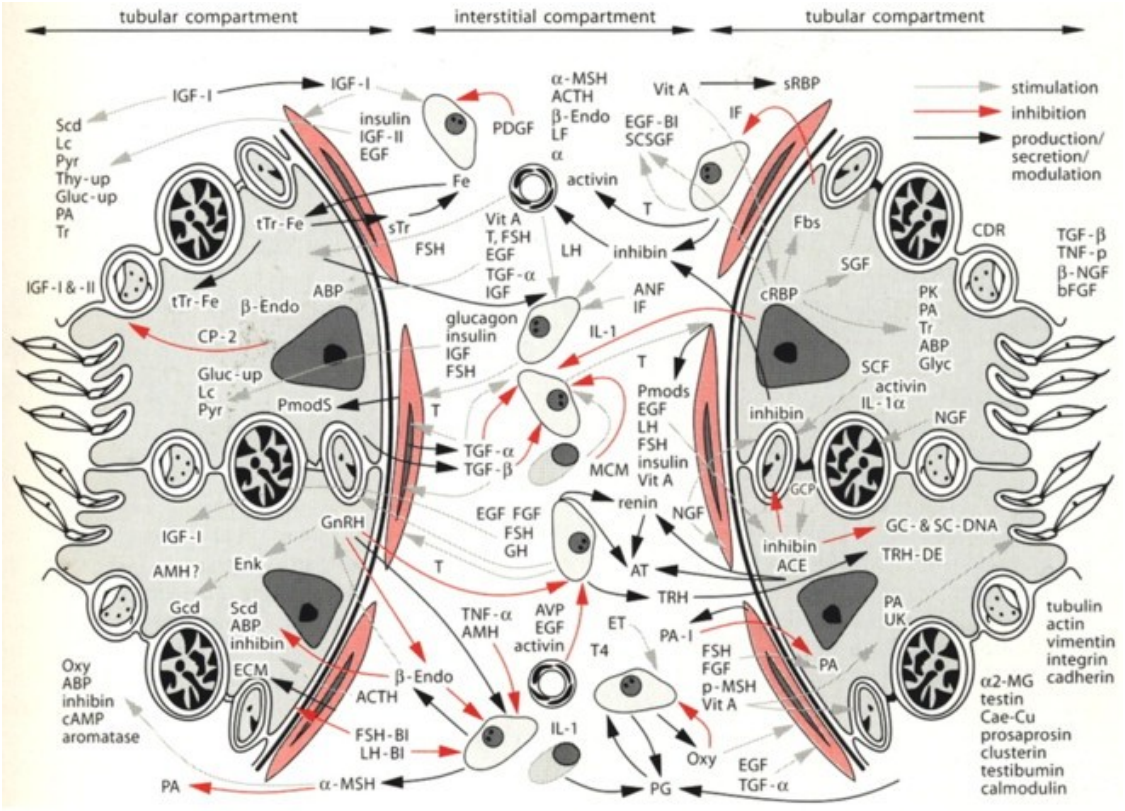


Figure 11: *Complexité des facteurs impliqués dans la régulation endocrine et paracrine du testicule.*

D'après ***[54] in [39]***

Nous pouvons néanmoins citer certains facteurs intervenant dans la régulation paracrine et autocrine du testicule tels que:

- l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) produit dans les cellules de Leydig et de Sertoli. Ce facteur a une action mitogène aussi bien sur les cellules somatiques que germinales. Il augmente le nombre de récepteurs à LH et la capacité de stéroïdogenèse de la cellule de Leydig. Dans la cellule de Sertoli, il stimule la production de lactate et de l'activateur tissulaire du plasminogène t-PA, facteurs importants d'interaction avec les cellules germinales [52, 55].

- les Transforming Growth Factor α et ß (TGF-α et TGF-ß) produits au niveau des cellules somatiques. TGF-α agirait sur la spermiogenèse en modulant l'action des cellules de Sertoli . TGF-ß agit aussi sur les cellules somatiques testiculaires en inhibant par exemple la

production de lactate au niveau des cellules de Sertoli, certaines enzymes intervenant dans la stéroïdogenèse au niveau des cellules de Leydig ou encore en inhibant la prolifération des cellules péritubulaires myoïdes et en stimulant leur différenciation [52, 55].

- les interleukines 1 et 6 (IL-1 et IL-6) exprimées préférentiellement par les cellules de Sertoli. IL-1 stimule la prolifération des cellules de Sertoli immatures et exerce un pouvoir mitogénique important sur les cellules péritubulaires et les cellules germinales. IL-1α stimule aussi la production basale de testostérone dans les cellules de Leydig immatures sous l'effet de la protéine StAR [56]. IL-6 est aussi secrétée par les cellules de Sertoli mais sous le contrôle de corps résiduels et de facteurs hormonaux; elle intervient comme régulatrice des stades précoces de la spermatogenèse [57].

- la vitamine A essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse. En effet, une carence en vit A conduit à un arrêt de la spermatogenèse, l'épithélium séminifère est alors uniquement constitué de cellules de Sertoli et de spermatogonies A ou contenant quelques spermatocytes préleptotènes [58, 59]. La vitamine A joue également un rôle lors de la maturation des spermatozoïdes en contrôlant la production de facteurs intervenant dans la capacité des spermatozoïdes de féconder l'ovule tels que l'acrosine ou l'activateur du plasminogène. Suite à une carence en vitamine A, l'activité de ces enzymes est rapidement et fortement réduite pouvant entraîner une stérilité due à une maturation inachevée des spermatozoïdes qui perdent leur pouvoir fécondants [60].

L'injection de doses physiologiques d'acide rétinoïque à des des rats dont les testicules sont dégénérés suite à une carence en vitamine A, ne restaure pas la spermatogenèse, mais une injection intrapéritonéale puis l'administration *per os* de rétinol [61, 62] ou une injection intrapéritonéale répétée bihebdomadaire de fortes doses d'acide rétinoïque permet de réinitier la spermatogenèse [63].

3- Pathologies du testicule:

3-1- Généralités:

Ces deux dernières décennies ont été marquées par un constat alarmant quant à la fonction reproductive masculine [64, 65] avec une recrudescence des anomalies de la différentiation de l'appareil génital mâle comme la cryptorchidie (absence d'un ou des deux

testicules dans le scrotum) ou l'hypospadias (fusion incomplète des canaux urétraux qui forment le pénis entraînant un abouchement anormal du méat urétral à la surface du pénis), du cancer testiculaire et des troubles de la spermatogenèse entrainant une diminution quantitative et qualitative de la production spermatique [66-69]. Ces altérations sont très souvent liées entre elles, en effet, la cryptorchidie est un facteur de risque des trois autres altérations testiculaires; l'hypospadias et l'oligospermie sont des facteurs de risque du cancer testiculaire[67]. De même, les hommes hypofertiles développeront plus un cancer testiculaire que les hommes normaux [70]. Ces quatre altérations correspondraient en fait à différents symptômes d'un même syndrome que Skakkebaek a nommé en 2001 "syndrome de dysgénésie testiculaire" (SDT) [70]. D'autres signes peuvent aussi être associé à ces quatre symptômes initialement décrits, comme des microcalcifications intra-testiculaires, le syndrome des cellules de Sertoli isolées, ou la présence de tubes séminifères comportant des cellules de Sertoli non différenciées [71, 72].

3-2- Syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT):

Le SDT est un concept élaboré par Skakkebaek et *al.* [70] qui tente d'apporter une explication à la constante augmentation, ces dernières années, des différentes pathologies du système reproducteur masculin.

Il est intéressant de noter que ces altérations sont **interconnectées** entre elles, un patient atteint de l'un des symptômes ayant plus de risque d'en développer un autre. La cryptorchidie étant un facteur de risque pour l'oligospermie et le cancer testiculaire, un patient ayant une cryptorchidie bilatérale a en effet 10% de risque de développer un cancer testiculaire contre 1% seulement chez un patient non atteint [73-75]. De même, l'hypospadias et l'oligospermie sont des facteurs à risque pour le cancer testiculaire

Le SDT résulterait d'une anomalie de différentiation testiculaire **peri-natale** via une perturbation du développement testiculaire durant la vie fœtale ou néo-natale [67, 70, 76, 77] (fig. 12).

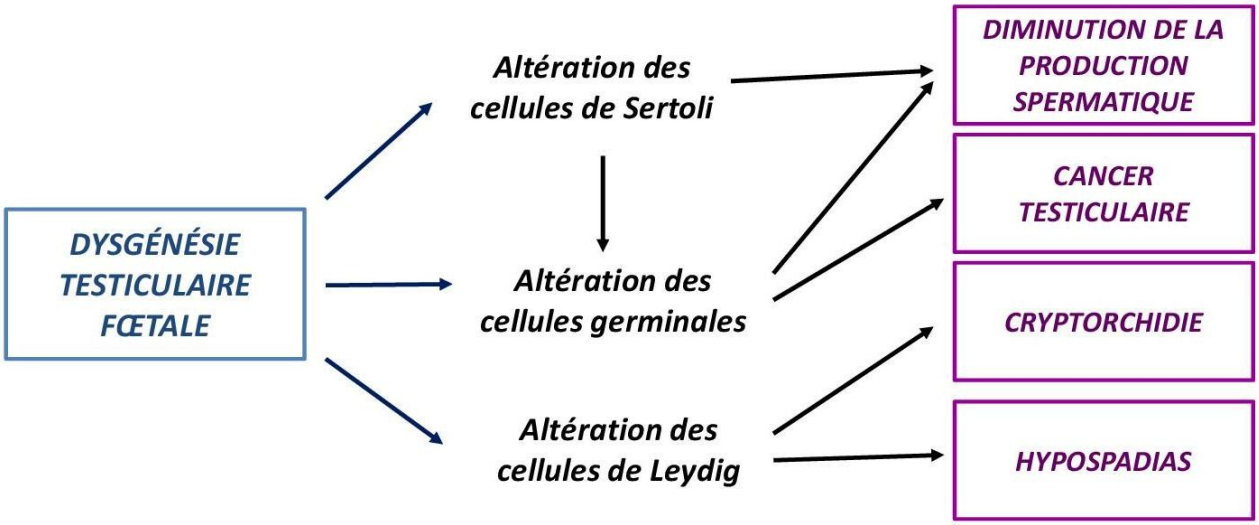


Figure 12: *Origine fœtale de l'altération des fonctions de reproduction masculine aboutissant au SDT d'après [70]*

Parmi les éléments argant cette origine fœtale citons les études montrant que (1) l'hypospadias résulte d'un défaut de production ou d'action des androgènes pendant la vie fœtale [70], (2) la cryptorchidie résulte d'anomalies de la production ou de l'action, pendant la vie fœtale et néo-natale, de l'Insl3 (qui régule la descente transabdominale des testicules) ou des androgènes (qui régulent la descente transinguinale des testicules) [70] et (3) les cellules tumorales testiculaires proviendraient de gonocytes ne s'étant pas différenciés normalement en spermatogonies [78].

3-2-1-L'hypospadias:

L'hypospadias est une anomalie de la fermeture de la gouttière urogénitale à la face inférieure du pénis, dans le sillon balanique ou sur le périnée; elle implique un développement incomplet du pénis entre la huitième et la quatorzième semaine de gestation chez l'homme [79-81] et est souvent associées à d'autres malformations testiculaires comme l'hernie inguinale ou la cryptorchidie [81].

Elle constitue l'une des malformations congénitales les plus communes avec environ 1/200 à 1/300 nouveau né touché et sa fréquence ne cesse d'augmenter ces dernières décennies [82]. En France, son incidence a augmenté de 400% en 20 ans depuis la fin des années 70 (fig.13).

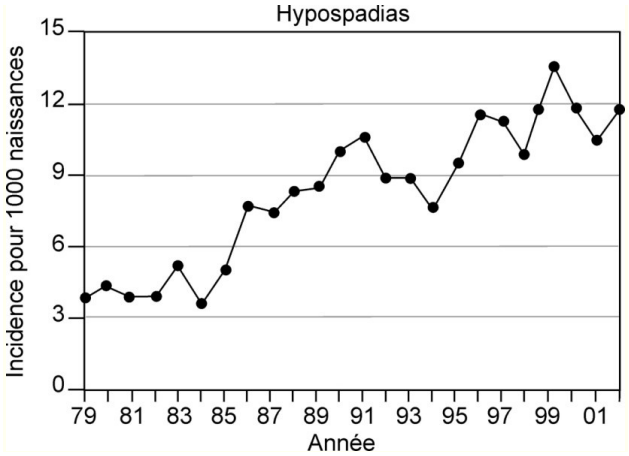


Figure 13: *Evolution de l'incidence annuelle de l'hypospadias en France de 1979 à 2001*
D'après les données du registre des malformations/ institut Européen des Génomutations

.

L'hypospadias peut avoir diverses origines génétiques ou environnementales. Une augmentation de l'incidence des cas d'hypospadias et des cas de cryptorchidie a en effet été observée dans les pays industrialisés [70, 83, 84]. Quelques éléments pouvant la favoriser sont listés dans le tableau suivant.

Facteur		**Référence**	**Conséquence**
Grossesse	naissance prématurée	[85]	augmentation de la prévalence
	faible poids à la naissance	[85]	
	insuffisance placentaire	[86]	
Etat de santé de la mère lors de la gestation	obésité morbide de la mère	[87]	augmentation de la prévalence
	âge de la mère	[88]	
Génétique	mutation du récepteur aux androgènes	[89, 90] [91]	augmentation de la prévalence
	mutation du récepteur à la LH	[92]	
Exposition environnementale fœtale	exposition *in utero* à la cocaïne	[93]	augmentation de la prévalence
	exposition *in utero* aux phytoestrogènes	[94]	
	exposition *in utero* au DES	[95]	
	exposition *in utero* à des analgésiques	[96]	diminution de la distance uro-génitale
	exposition *in utero* au phtalates	[97, 98] [99]	

Tableau 1: *Quelques éléments pouvant favoriser les risques d'hypospadias selon la bibliographie*

3-2-2- La cryptorchidie:

La cryptorchidie vient de l'étymologie grecque: kruptos: caché et orkhis: testicule. Il s'agit d'un défaut de descente testiculaire pouvant être uni ou bilatéral dans 20 à 40% des cas. Les testicules restent ainsi en position abdominale ou inguinale. Son incidence varie de 1 à 8% chez les nouveaux nés et chute à une incidence de 1 à 2% chez les nourrissons de trois mois car une descente spontanée peut avoir lieu durant les trois premiers mois de la vie [100].

La migration testiculaire est régulée par les androgênes (T+ DHT) via l'insulin-like 3 (INSL3). Cette dernière régule la migration transabdominale du testicule alors que la testostérone régule la migration inguino-scrotale [101]. Ainsi, une altération de la biosynthèse ou de l'action des androgènes peut être à l'origine de la cryptorchidie [102, 103]. Un traitement hormonal à la hCG ou la GnRH peut en effet initier la décente testiculaire en stimulant la production de testostérone par les cellules de Leydig [86] mais cette technique de traitement hormonal de la cryptorchidie reste discutée car il semblerait qu'elle puisse altérer des cellules germinales du jeune garçon [104].

La cryptorchidie peut être également liée à d'autres payhologies testiculaires comme l'hypospadias, le cancer des cellules germinales et l'hypofertilité. Une orchiopexie précoce peut corriger les effets de la cryptorchidie sur la spermatogenèse, mais le dépistage du cancer testiculaire doit être maintenu [105, 106].

L'environnement peut jouer un rôle primordial dans le développement de cette pathologie. En effet, des demi-frères maternels ont quasiment la même prédisposition à développer une cryptorchidie par rapport aux demi-frères paternels suggérant ainsi l'importance de l'environnement utérin lors du développement fœtal [105, 107]. Le tableau 2 résume quelques éléments pouvant être à l'origine de la cryptorchidie selon les données de la bibliographie.

Facteur		Référence	Conséquence
Grossesse	naissance prématurée	[85]	augmentation de la prévalence
	faible poids à la naissance	[85]	
	insémination artificielle	[108]	
Etat de santé de la mère lors de la gestation	hypertension maternelle	[108]	augmentation de la prévalence
	diabète gestationnel	[109]	
	consommation importante de caféine durant la grossesse	[108]	
	utilisation de patches de nicotine durant la grossesse	[108]	
Exposition environnementale fœtale à des composés chimiques	consommation d'alcool durant la grossesse	[110]	augmentation de la prévalence
	exposition à un cocktail de pesticides	[111]	
	exposition prénatale aux composés organochlorés	[112]	
	exposition *in utero* aux analgésiques durant le second trimestre de la grossesse	[96]	
	exposition fœtale aux perturbateurs endocriniens environnementaux oestrogéniques ou antiandrogénique	[113]	altération de le production d'INSL3 entrainant la cryptorchidie

Tableau 2: *Quelques éléments pouvant favoriser les risques de cryptorchidie selon la bibliographie*

3-2-3- Le cancer testiculaire:

Le cancer testiculaire est une forme assez rare de cancer avec 1 à 2% des cas de cancers observé chez l'Homme [114]. Il présente en revanche une étiologie caractéristique puisque il s'agit de la forme de cancer la plus fréquente chez l'individu jeune avec une incidence maximale située entre 18 et 30 ans, un développement très rare au-delà de 50 ans, mais une fréquence qui augmente régulièrement de 2 à 4% par an chez l'homme adulte âgé de 25 à 40 ans [68]. Le cancer testiculaire représente à l'heure actuelle la deuxième cause de mortalité chez l'Homme jeune après les leucémies.

Comme indiqué dans la figure 14, son incidence augmente continuellement (environ 3% par an) depuis une cinquantaine d'années; cette incidence est d'autant plus importante dans les pays industrialisés par rapport aux autres pays (fig.15) suggérant un effet potentiel de l'exposition environnementale sur le développement de cette pathologie.

98% des cancers testiculaires sont des **tumeurs des cellules germinales** (Testicular Germ Cell Tumor ou TGCT). Ces tumeurs se développent à partir des cellules germinales primitives (PGC). Elles peuvent être réparties histologiquement en trois catégories: les tumeurs non séminomateuses (60-70% des cas), les tumeurs séminomateuses (30-40%) et les séminomes spermatocystique qui se manifestent chez les hommes plus âgés [115]. Les TGCT dériveraient d'un même précurseur, le carcinome *in situ* (CIS) dont les cellules sont histologiquement et structurellement identiques aux gonocytes fœtaux normaux [116, 117]. Des cas de CIS ont été décrits dans les testicules de nouveaux nés et d'un point de vue immunohistologique, les cellules composant les CIS expriment des marqueurs moléculaires caractéristiques des gonocytes fœtaux alors qu'ils sont absents des cellules germinales de adultes (tels que OCT3/4, LIN28 ou SOX2) [118-121]. De plus, les CIS et les gonocytes présentent un très faible taux de modifications épigénétiques associées à la répression transcriptionnelle, ce qui est totalement différent du profil observé chez les cellules germinales adultes [122]. Toutes ces observations suggèrent que la formation des CIS (et par conséquent des TGCT) se fait plutôt durant la vie fœtale [78].

Des formes de tumeurs plus rares, les **tumeurs testiculaires non germinales** existent et peuvent toucher les cellules de Leydig (essentiellement chez l'homme adulte), les cellules de Sertoli (le plus souvent bénignes), les cellules stromales (tumeurs de la granulosa), les annexes testiculaires et les tissus de soutien (rhabdomyocarcinome, sarcomes, lipomes, fibromes). Il peut aussi s'agir de métastases testiculaires de cancers venant d'autres organes (poumon, prostate...)

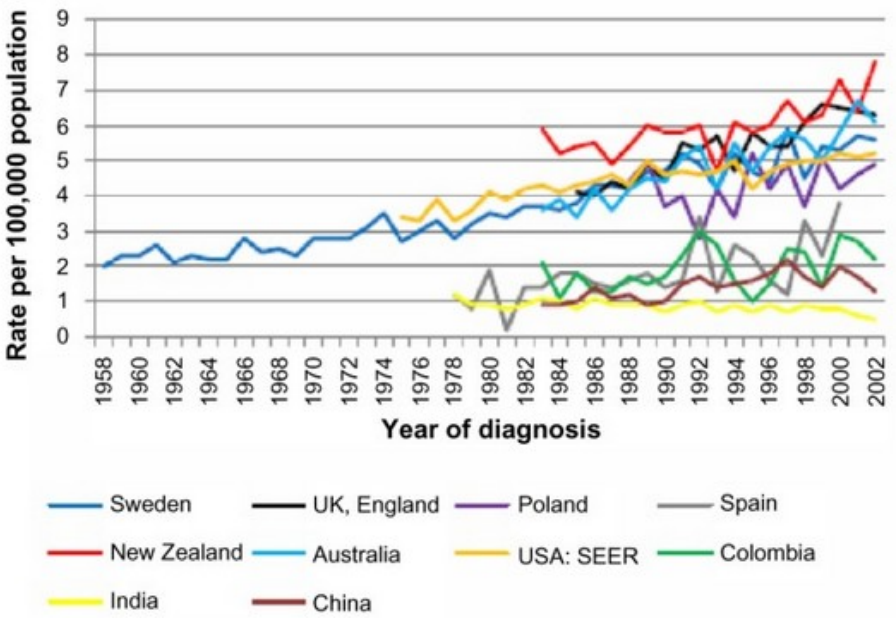


Figure 14:*Evolution de l'incidence annuelle du cancer testiculaire dans dix pays. D'après* ***[123]***

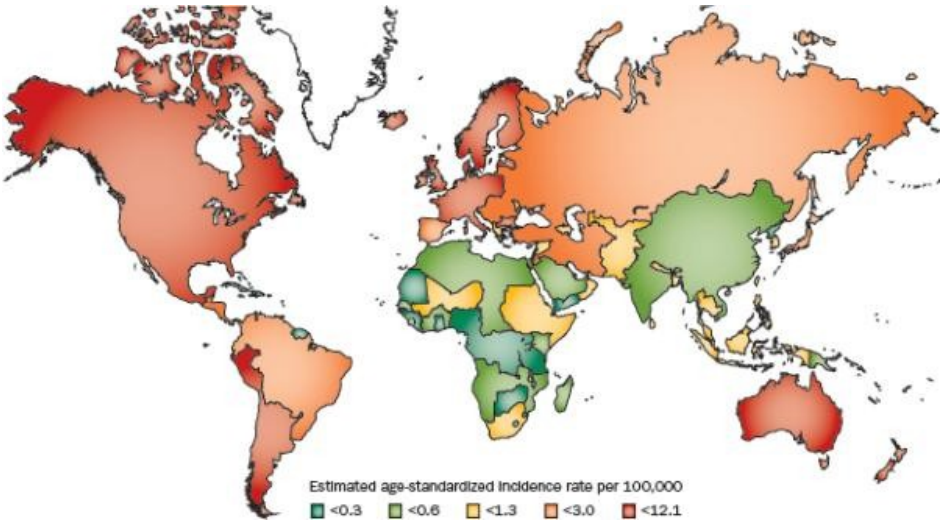


Figure 15: *Evolution de l'incidence annuelle du cancer testiculaire dans dix pays.D'après* ***[124]***

Le tableau 3 résume quelques éléments pouvant être à l'origine du cancer testiculaire selon les données de la bibliographie. Certains éléments sont d'origine endogène tels que les facteurs génétiques et épigénétiques; ils jouent un rôle important dans la prédisposition à développer un cancer testiculaire (le fait d'avoir un père ou un frère ayant développé la maladie peut ainsi augmenter la prévalence); d'autres éléments sont d'origine exogènes telle qu'une exposition fœtale ou néo-natale à des substances environnementales pouvant altérer le système endocrinien augmente aussi les risques de développer ces tumeurs.

Facteur		**Référence**	**conséquence**
Hérédité	antécédent familiaux	[125] [126] [127]	augmentation de la prévalence
Génétique	délétion *gr/gr* sur le chromosome Y	[128]	augmentation de la prévalence des séminomes
	mutation somatique de KIT	[129]	augmentation de la prévalence
	mutation de DND1	[130]	
	mutations de KIT et KITLG	[129] [131]	altération de la survie de PGC --> augmentation du risque de développer un TGCT
Epigénétique	SNP polymorphisme de BAK1, DMRT1	[132]	prédisposition au TGCT
Exposition environnementale fœtale	exposition des travailleurs au PVC (polyvinyl chloride)	[133]	augmentation des risques de séminomes
	exposition fœtale au PCB	[134]	augmentation de la prévalence
	forte concentration de pesticides organochlorés chez les mères	[135]	augmentation des risques

Tableau 3: *Quelques éléments pouvant favoriser les risques de cancer testiculaire selon la bibliographie*

3-2-4- L'infertilité:

L'infertilité est définie par l'incapacité pour un couple sexuellement actif et n'utilisant pas de contraception d'obtenir une grossesse sur une année [136]. De nos jours, 15 à 25% des couples déclarent une incapacité à concevoir après un an de tentatives [137]. En France, un couple sur sept consulte pour des difficultés à concevoir. Un facteur masculin, presque toujours marqué par des anomalies du spermogramme contribue à l'infertilité dans près de la moitié des cas [138]. Il a été observé dans les pays d'Europe du Nord et aux USA que le nombre de spermatozoïdes par éjaculat baisse d'environ 1% par an depuis les années 1940 [139]. Parmi les causes d'infertilité masculine, il existe des causes dites "*excrétoires*" où la production des spermatozoïdes est conservée mais une anomalie d'excrétion existe (40% des cas) et d'autres dites "*sécrétoires*" où la production de spermatozoïdes est altérée au niveau testiculaire (60% des cas). Ces anomalies de la gamétogenèse se traduisent par des anomalies au spermogramme. Il s'agit de:

- l'azoospermie sécrétoire : absence de production de spermatozoïdes mâtures, associée parfois à une desquamation des cellules germinales immatures.

- l'oligospermie : production d'un faible nombre de spermatozoïdes.

- l'asthénospermie : anomalie de la mobilité touchant plus de 50% des spermatozoïdes.

- la tératospermie : perturbation de la morphologie touchant plus de 70% des spermatozoïdes.

- la nécrospermie : production d'un taux élevé (>25%) de spermatozoïdes morts.

Ces anomalies du spermogramme peuvent exister de manière isolée ou associée. Elles peuvent avoir des étiologies diverses (troubles endocriniens, anomalies du caryotype ou encore anomalies génétiques).

Il existe différents types d'infertilité masculine:

- Les **infertilité obstructives**, qu'elles soient **congénitales** (défaut de développement des canaux de Wolff ou agénésie des canaux déférents ou des vésicules séminales) ou **acquises** (lésions obstruant le passage des spermatozoïdes au niveau l'épididyme et/ou des canaux différents, troubles éjaculatoires...)

- **Les infertilités non obstructives testiculaire** (52 % des cas d'infertilité masculine) faisant suite à une atteinte fonctionnelle du testicule soit par une anomalie congénitale (syndrome de Klinefelter par exemple due à des anomalies génétiques de type 47chr, XXY), acquise (suite à un varicocèle ou à une cryptorchidie par exemple) ou encore idiopathique.

- **Les infertilités non obstructives centrales** *(*1 à 5 % des cas d'infertilité masculine) faisant suite à un déficit de stimulation des testicules par les gonadotrophines (FSH, LH) entrainant un hypoandrisme plus ou moins marqué et une hypotestostéronémie [140].

Selon les recommandations du comité d'andrologie de l'association Française d'urologie en 2007, il faudrait utiliser différents outils diagnostics afin de proposer le meilleur traitement [136]. En plus d'un examen clinique du patient (évaluation des antécédents cliniques et familiaux, expertise urologique ou andrologique...), la réalisation d'un spermogramme est systématique. Elle permet l'identification de potentielles altérations quantitatives ou qualitatives des spermatozoïdes. La tableau 4 résume les normes établies par l'OMS en 2010 pour l'analyse d'un spermogramme.

Paramètres	Valeurs normales	Différentes anomalies observées (en dessous des valeurs normales)
Volume	> 1.5 ml	Hypospermie
Numération	> 15. 10^6/ml	- Oligospermie modérée (1< N < 15.10^6/ml) - Oligospermie sévère (0< N < 1.10^6/ml) - Cryptozoospermie (présence de spermatozoïdes uniquement sur culot de centrifugation) - Azoospermie (absence de spermatozoïdes sur culot de centrifugation). N = 0.10^6/ml.
Mobilité progressive	> 32%	Asthénospermie
Vitalité	> 58%	Nécrospermie
Formes normales	> 4%	Tératospermie

Tableau 4: *Valeurs normales du spermogramme selon les normes de l'OMS 2011*

Une évaluation endocrinienne est aussi être pratiquée et doit comprendre au moins un dosage de la testostérone totale et de la FSH. Elle s'impose en cas de spermogramme anormal avec oligo/azoospermie, un dysfonctionnement sexuel et/ou des symptômes suggérant une endocrinopathie [141, 142]. Un examen radiologique par échographie de l'appareil urogénital ou IRM pelvienne est indiqué pour diagnostiquer une hypotrophie ou toute autre anomalie du testicule [142, 143] ou des canaux déférents [144].

D'autres examens non systématiques existent tels que (1) l'analyse post-éjaculatoire des urines (en cas d'éjaculation rétrograde), (2) le bilan génétique, effectué en deuxième intention dans un but étiologique (les anomalies génétiques pouvant être cause d'infertilité masculine en affectant la spermatogenèse ou le transport du sperme) et (3) la biopsie testiculaire diagnostique qui est une exploration invasive et n'est indiquée que chez l'homme azoospermique. Elle peut s'accompagner d'un prélèvement de spermatozoïdes épididymaires, déférentiels et/ou testiculaires [145].

Le tableau 5 résume quelques éléments pouvant être à l'origine de l'infertilité selon les données de la bibliographie. Diverses études ont montré que l'infertilité masculine, contrairement aux autres pathologies testiculaires qui entrent dans le cadre du SDT, peut non seulement être acquise pendant la période foetale ou néo-natale, mais elle peut aussi être acquise à l'âge adulte. Cette dernière peut, contrairement à l'infertilité acquise *in utero*, être réversible.

Facteur		Référence	conséquence
Mode de vie de l'homme adulte	exposition constante du scrotum à des températures élevées	[146]	altération de la spermatogenèse (phénomène pouvant être réversible)
	obésité	[146]	augmentation des risques
	consommation de drogue	[146]	
Génétique	délétion de la région AZFC du chromosome Y	[147, 148]	arrêt de la prolifération des cellules germinales
	délétion *gr/gr* sur le chromosome Y	[149]	
	mutation du gène PDE11A (régulateur de la voie AMPc)	[150]	diminution de la spermatogenèse et de la spermiation. Diminution du compte spermatique
Exposition environnementale à des composés chimiques	expositions aux phtalates	[151, 152]	changement hormonaux (comme une altération de la production de testostérone) qui augmente la prédisposition
	exposition au DES	[153]	altération de l'entrée des cellules germinales en méiose et de la synthèse de la testostérone
	exposition neo-natale à l'EB	[154]	altération des DNMT entrainant une apoptose des cellules germinales
	exposition à de faibles doses de BPA	[155]	altération de la progression méiotique (plus de spermatocytes leptotènes et moins de diplotènes)

Tableau 5: *Quelques éléments pouvant favoriser les risques d'infertilité selon la littérature*

3-3- Etiologie du SDT:

Comme nous l'indiquions dans les tableaux précédents il existe deux origines de facteurs qui peuvent favoriser le SDT, une origine génétique via des mutations et une origine environnementale via des facteurs exogènes. Ainsi, l'action conjointe de molécules exogènes perturbant le système endocrinien et la présence d'un terrain génétique favorable (polymorphismes, mutations...) rendrait certains sujets particulièrement sensibles à ces facteurs environnementaux.

3-3-1- Origine génétique:

Plusieurs cas pathologiques associées à des mutations génétiques argumentent l'origine génétique du SDT, notamment le cas de patients présentant un caryotype 45X/46XY qui développent une forme très sévère de SDT (cryptorchidie, hypospadias et TGCT) [156]. Les mutations génétiques interviennent particulièrement en ce qui concerne l'étiologie du cancer testiculaire [117] et de l'infertilité [147].

Ces altérations génétiques peuvent toucher directement **le chromosome** comme dans l'amplification de certaines régions chromosomiques du bras court du chromosome 12, contenant les gènes *STELLAR* , *NANOG* et *GDF3*, qui a fréquemment été mise en évidence dans des cas de cancers testiculaires [157, 158] ou la délétion *gr/gr* sur le chromosome Y qui a elle aussi, été corrélée aux tumeurs testiculaires et à des cas d'infertilité [128, 149]. La délétion de la région AZFC sur ce même chromosome Y, peut être la cause par aneuploïdie, d'azoospermie [147, 148]. Des mutations de certains **gènes** peuvent aussi favoriser le SDT. L'*INSL3* et de son récepteur (*LGR8*) contrôlent la descente testiculaire; des mutations ou certains polymorphismes de ce gène ou de son récepteur sont associés à des cas de cryptorchidie chez l'homme [159]. De même que des mutations de DND1 [130], de KIT [129] ou de son ligand KITL [131] ont été liées aux tumeurs testiculaires. Parallèlement, le **polymorphisme de certains gènes** impliqués dans le développement de la fonction de reproduction a également été évoqué. Plusieurs études ont rapporté une corrélation inverse entre le nombre de répétition CAG de la séquence codante du récepteur des androgènes et une diminution du compte et de la qualité spermatique [160-162]. Tout comme le polymorphisme

BAK1 et DMRT1 a été corrélé à une augmentation des risques de développer un cancer testiculaire [132].

La prédisposition génétique ne fait pas de doute quant à l'origine des symptômes du SDT. Toutefois, il semble que le facteur environnemental, et plus précisément l'impact des polluants environnementaux, soit également une cause importante de l'apparition du SDT, s'il n'est pas le facteur le plus important. En effet, l'augmentation continue du SDT n'est pas compatible avec un taux de mutation spontanée, mais plus compatible avec une modification de l'environnement et du mode de vie.

3-3-2- Origine environnementale:

Des études épidémiologiques et des observations comportementales de la faune sauvage ont permis de mettre en évidence l'impact délétère des perturbateurs endocriniens environnementaux (PEEs) sur la fonction de reproduction. Un premier exemple de l'effet des PEEs sur la fonction reproductrice des animaux concerne la contamination au Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane (DDT) du lac Apopka en Floride. Les alligators mâles y vivant présentaient un taux diminué de testostérone, des cas de micropénis ainsi que d'autres altérations testiculaires. Alors que les animaux du lac voisin, non contaminé, ne présentaient aucune de ces anomalies [163, 164]. Chez l'Homme, des études épidémiologiques ont été réalisées et ont permis de faire état d'un lien potentiel entre l'augmentation de la fréquence des anomalies du développement de la fonction de reproduction et l'accroissement de l'utilisation des produits chimiques en tous genres [165-168]. La première observation concerne l'incidence plus élevée dans les régions industrialisés des cas d'hypospadias [169, 170] ou de cryptorchidie [171]. L'exposition par exemple aux phtalates, (composé toxique issu de la fabrication de matières plastiques) a été corrélée à des altérations du développement du tractus génital du nouveau-né [98, 172].

Une seconde observation concerne la fenêtre d'exposition aux contaminants environnementaux, plus précisément l'exposition périnatale à ces composés. En effet, la grande majorité des anomalies du développement du tractus génital mâle (cryptorchidie et hypospadias) a été enregistrée chez les enfants dont les mères ont été exposées à différents polluants ou composés pharmaceutiques [173]. Ainsi, l'infertilité augmenterait après une exposition fœtale aux phtalates [150, 151] ou au DES [152]; la prévalence d'hypospadias augmenterait après une exposition fœtale aux phtalates [96-98] ou aux analgésiques [168] et

après une exposition périnatale au DES [94]; l'exposition *in utero* aux analgésiques augmenterait aussi la prévalence de cryptorchidie [95] enfin, la prévalence de développer un cancer testiculaire augmenterait après une exposition fœtale au PCB [133].

3-3-3- Conclusion:

En conclusion, le SDT est une pathologie qui augmente exponentiellement depuis les dernières décennies parallèlement à l'exposition de plus en plus importante à divers PEEs. La prévalence de développer des malformations irréversibles de la sphère uro-génitale est d'autant plus importante que l'exposition à ces PEEs se fait durant la vie périnatale. Un schémas complet de l'étiologie, mécanisme d'action et pathologies associées au SDT est résumé dans la figure 16

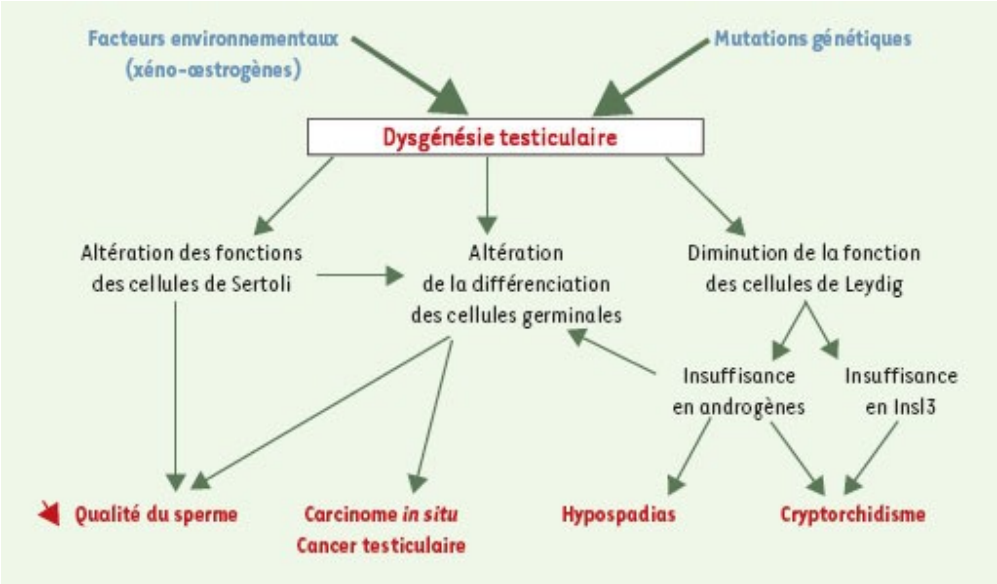


Figure 16: *Le syndrome de dysgénésie testiculaire (SDS) D'après [77]*

Sont indiqués en rouge: les symptômes; en noir: les mécanismes; en bleu: l'étiologie

La spermatogenèse représente en fait un équilibre entre prolifération et mort cellulaire. Dans le cas de l'infertilité, l'apoptose des cellules germinales est un symptôme très fréquent. Dans ce contexte, nous consacrerons le chapitre suivant aux mécanismes de l'apoptose dans les cellules germinales.

4- Apoptose des cellules germinales:

4-1- Généralités:

L'apoptose est l'une des voies conventionnelles de la mort cellulaire avec l'autophagie et la nécrose. Le mot "apoptose" provient des mots grecs *apo* et *ptosis* en comparaison avec la chute des feuilles d'un arbre et définissant ainsi un processus de mort cellulaire diffèrent de la nécrose. En 1999, Horvitz et *al.* ont mis en évidence que ce processus apoptotique se définissait comme une mort cellulaire programmée génétiquement active [174, 175]. Les processus d'apoptose et de nécrose ont longtemps été séparés, mais des études récentes ont montré qu'un même stimulus peut induire à faibles doses l'apoptose et à fortes doses la nécrose [176]. La progression vers l'un ou l'autre processus dépend aussi des facteurs cellulaires intrinsèques tels que la concentration cellulaire en ATP [177].

L'apoptose a pour rôle essentiel d'assurer l'homéostasie tissulaire que ce soit dans les tissus embryonnaires (pour réguler par exemple le nombre de cellules en développement [178]) ou dans les tissus adultes où elle confère à la cellule l'équilibre entre prolifération et mort cellulaire au sein d'un tissu et agit aussi comme mécanisme de défense lors d'une réaction immunologique ou lorsque la cellule est altérée par une pathologie [179, 180].

4-2- Processus apoptotique:

Schématiquement, l'apoptose se déroule selon trois phases fonctionnelles distinctes: une phase d'initiation, une phase effectrice ou d'exécution et une phase irréversible de dégradation des structures cellulaires (fig.17).

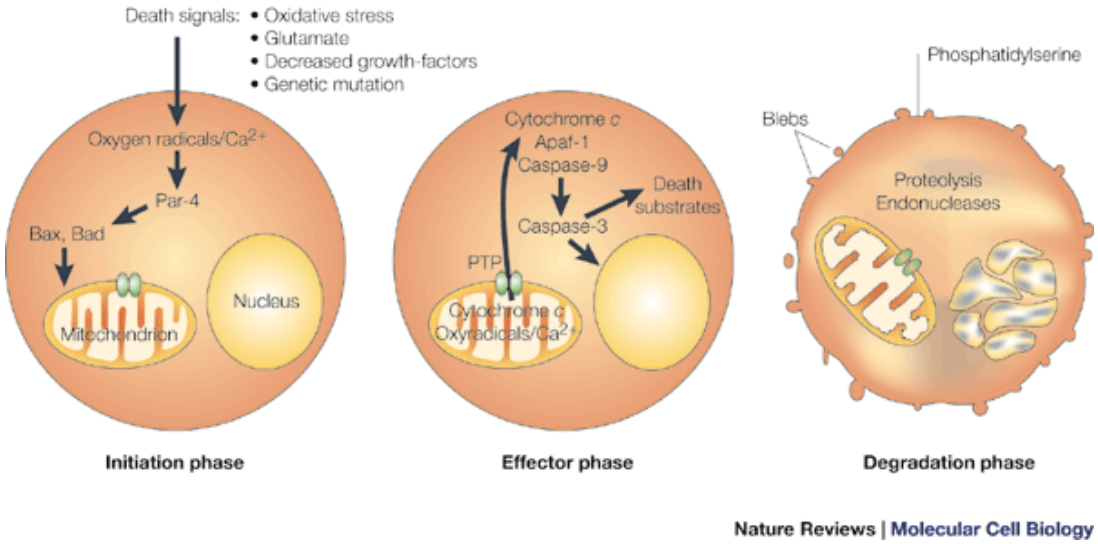


Figure 17: *Représentation morphologique et biochimique des trois phases de l'apoptose: phases d'initiation, effectrice et de dégradation. D'après [181]*

4-2-1- Phase d'initiation:

Il s'agit d'une phase très complexe de part la diversité des signaux inducteurs d'apoptose que reçoit la cellule. Ces signaux spécifiques du type cellulaire et des voies de signalisation qui lui sont associées, peuvent être physiologiques (hormones) ou pathologiques (stress physique ou chimique) et intra ou extracellulaires. Néanmoins, en dépit de la diversité des signaux inducteurs, toutes les cellules engagées dans un processus apoptotique montrent des modifications biochimiques et morphologiques similaires, suggérant l'existence d'une phase effectrice commune [182]. L'initiation de l'apoptose est un processus complexe énergie-dépendant qui s'effectue selon deux voies majeures la voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (voie intrinsèque) [183-185]. Une troisième voie mineure a été décrite impliquant la cytotoxicité des lymphocytes T et la voie de signalisation des perforines/granzymes (fig.18) [180].

A- Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de la mort:

La voie extrinsèque implique des interactions entre les différents membres de la superfamille du Tumor Necrosis Factor (TNF), Fas, TNF et TRAIL (TNFα related apoptosis-inducing ligand), et des récepteurs transmembranaires appelés récepteurs de la mort cellulaire [186]. Une fois le Ligand fixé à son récepteur, une protéine adaptatrice cytoplasmique Fas-

associated death domain (FADD) va venir assurer le recrutement, via son domaine effecteur, d'une procaspase initiatrice (CASP8 ou CASP10). Ce complexe protéique constitué par le ligand, les récepteurs, les protéines adaptatrices et les procaspases initiatrices constitue le complexe d'induction du signal de la mort cellulaire DISC (Death Inducing Signaling Complex) (fig.18).

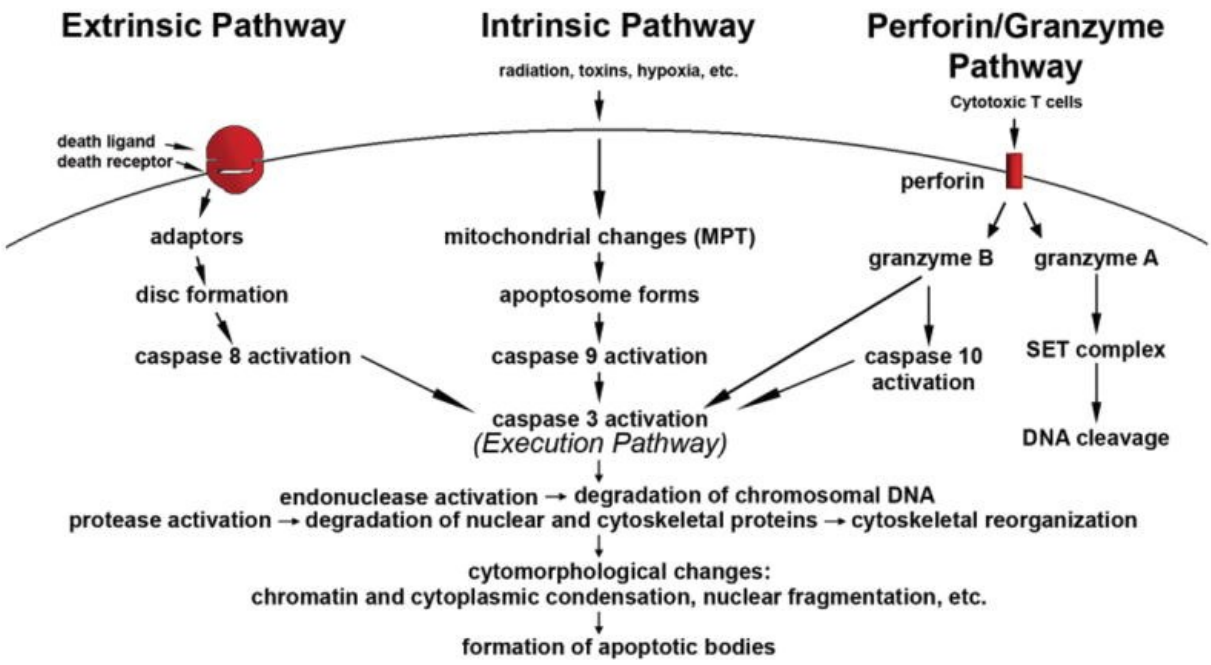


Figure 18: *Représentation schématique des processus apoptotiques: Avec les deux principales voies intrinsèque et extrinsèque ainsi que la voie des perforines/granzymes. D'après[180]*

B- Voie intrinsèque ou voie mitochondriale:

La voie intrinsèque ne fait pas intervenir de récepteurs mais des signaux agissant directement sur leurs cibles à l'intérieur de la cellule via des évènements initiés par des modifications mitochondriales. La famille Bcl-2 comporte à la fois des éléments pro-apoptotiques (Bax, Bcl-xS, Bak, Bad) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1). La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, sous la dépendance de membres de la famille Bcl-2, est à l'origine d'une libération de protéines apoptogènes [187] En effet, l'activation de cette voie par la mitochondrie induit la translocation de facteur pro-apoptotique

comme Bax qui, par compétition avec les protéines anti-apoptotiques insérées dans la membrane mitochondriale externe, provoque la libération du cytochrome C et de la protéine Smac/diablo par la mitochondrie. Le cytochrome C assure le recrutement d'une procaspase initiatrice (CASP9) (fig.18).

C- Voie perforines/granzymes dépendante:

Cette voie initiatrice de l'apoptose fait intervenir les lymphocytes T cytotoxiques capables d'induire la mort des cellules cibles via essentiellement une voie intrinsèque faisant intervenir des interactions FasL/FasR ou impliquant la sécrétion de perforines à travers les pores de la cellule cible (fig.18). Les serine protéases granzyme A et granzyme B sont les principaux effecteurs de cette voie [180, 188, 189].

4-2-2- Phase effectrice:

Après la formation du complexe protéique "cytochrome C-Apaf-1-procaspase 9" (pour la voie intrinsèque) ou "FADD-procapsase 8" (pour la voie extrinsèque), la procaspase initiatrice (procaspases 8 ou 9) est transactivée par clivage et libérée. Elle va ainsi pouvoir à son tour activer les caspases effectrices (caspases 3, 6 ou 7). La phase effectrice est essentiellement médiée par l'activité des caspases effectrices. Ces enzymes sont négativement régulées par les anti-apoptotiques de la famille des inhibitors of apoptosis proteins (IAP). L'activité des IAP peut elle même être inhibée par des protéines mitochondriales (telles que Smac/DIABLO ou HTRA2) restaurant ainsi l'activité de la caspase effectrice.

4-2-3- Phase de dégradation:

Les caspases effectrices possèdent une cystéine au niveau de leur site actif et clivent leurs substrats spécifiquement après une séquence tétrapeptidique se terminant par un résidu aspartame. Elles possèdent nombreux substrats parmi lesquels des composants du cytosquelette et du noyau, diverses protéases et DNases ainsi que des protéines de signalisation majeures comme la PKC, Raf1 ou MEKK [190]. L'activation des substrats des

caspases effectrices aboutit à la dégradation de l'ADN et de la cellule en corps apoptotiques par les cellules avoisinantes ayant des fonctions phagocytaires.

4-3- Apoptose des cellules germinales:

L'apoptose est un processus de signalisation cellulaire complexe qui met en jeu une balance des effecteurs moléculaires pro et anti-apoptotiques. Une dérégulation de ce processus et de cette balance peut être à l'origine de diverses pathologies. Dans le testicule, une altération de l'apoptose au cours de la spermatogenèse, peut avoir de graves conséquences sur la fertilité masculine.

4-3-1- Apoptose des cellules germinales chez le mâle prépubère:

Dans le testicule prépubère, l'apoptose peut toucher différents types cellulaires au sein de la lignée germinale, de la spermatogonie souche au spermatozoïde, et ce, dans le but de maintenir un nombre défini de cellules à l'intérieur du tube séminifère [191].

Lors de l'initiation de la spermatogenèse, chez le mâle prépubère, l'apoptose semble nécessaire dans le testicule pour la mise en place et le développement fonctionnel de la spermatogenèse [192-194]. Chez les rongeurs, par exemple, une importante vague d'apoptose a lieu dès les premières semaines de vie (correspondant au stade prépubère) afin de limiter l'efficacité des premiers cycles spermatogénètiques et de permettre la formation de spermatozoïdes matures et fonctionnels [195, 196]. Les spermatogonies et les spermatocytes précoces sont alors les cibles privilégiées de cette apoptose physiologique [197].

4-3-2- Apoptose des cellules germinales chez le mâle adulte:

Un phénomène apoptotique est également observé dans les testicules adultes durant la spermatogenèse normale. Les principales fonctions de cette apoptose seraient:

- de contrôler l'expansion clonale excessive des cellules germinales [198] et d'assurer le maintien d'un ratio optimal entre le nombre de cellules germinales et le nombre de cellules de

Sertoli afin de permettre une spermatogenèse efficace en touchant préférentiellement certains stades de l'épithélium séminifère [192, 199, 200];

- de former la barrière hématotesticulaire en éliminant les cellules germinales surnuméraires pour permettre la formation des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli [201];

- d'éliminer des cellules germinales présentant des anomalies de réarrangement durant la méiose, ou ayant subi des cassures de leur ADN [194, 202]

- et d'éliminer des corps résiduels, correspondant à l'excès de cytoplasme émis lors de la spermiogenèse [203-205].

4-3-3- Effecteurs de l'apoptose des cellules germinales:

Le processus apoptotique des cellules germinales fait intervenir plusieurs effecteurs pro ou anti-apoptotiques qui s'éxpriment préférentiellement dans un ou plusieurs types cellulaires (fig.19). Nous allons décrire quelques uns des facteurs les plus importants dans ce chapitre.

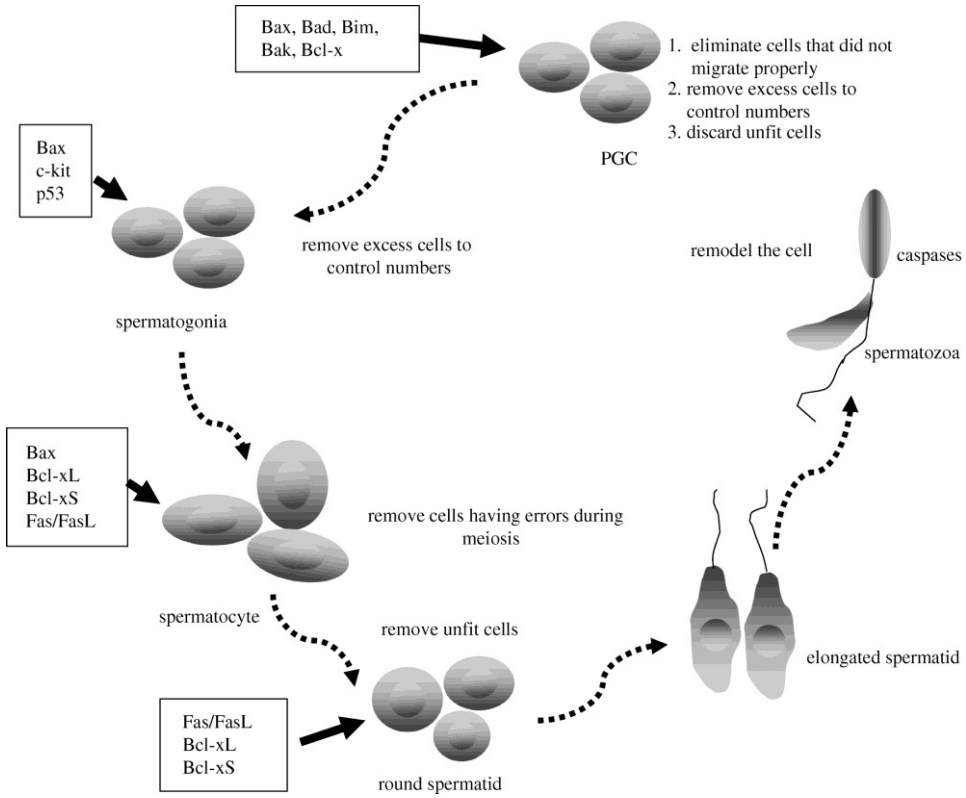


Figure 19: *représentation schématique de l'apoptose des cellules germinales avec les différents effecteurs pro et anti-apoptotiques impliqués. D'après [183]*

A- Protéines de la famille de Bcl2 et p53:

L'apoptose qui a lieu lors du premier cycle de la spermatogenèse dans le testicule prépubère fait intervenir les protéines de la famile Bcl-2 [206]. Il s'agit de protéines contenant au moins un des quatre domaines d'homologie de Bcl-2 (Bcl-2 Homology domain) appelés BH1, BH2, BH3 et BH4. C'est la nature des domaines BH détermine la fonction pro ou anti-apoptotique des protéines de la famille Bcl-2 comme indiqué dans la figure 20.

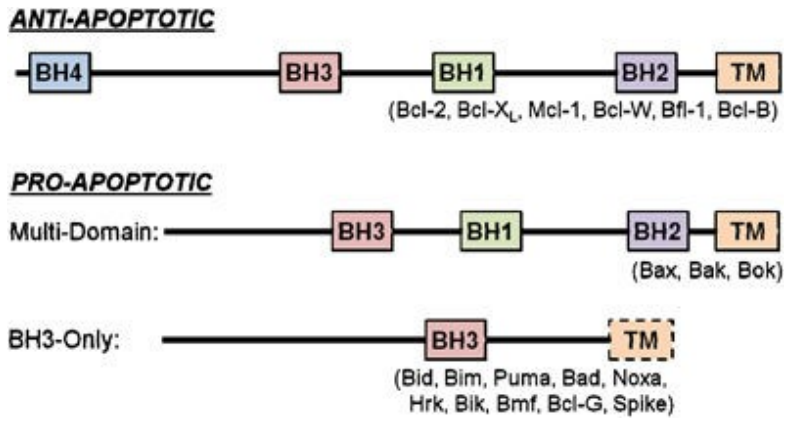


Figure 20 : *Comparaison de la structure des protéines de la famille Bcl-2 d'après [207].*

Les protéines Bcl-2 a activité anti-apoptotique ont 4 domaines BH et un domaine transmembranaire (TM). Les protéines Bcl-2 à activité pro-apoptotique quant à elles peuvent êtres classées en "multi-domaine" ou "BH3-only"avec ou sans domaine TM.

L'initiation de première vague d'apoptose des cellules germinales pendant le premier cycle de la spermatogenèse se traduit par une augmentation de l'expression des protéines Bax et Bad d'une manière dépendante de p53, entrainant le déplacement du rapport des membres pro et anti- apoptotiques et engagent la cellule vers la mort cellulaire [208]. Un dérèglement de la balance pro/anti-apoptotique ou de l'expression de l'un de ces effecteurs dans le testicule est à l'origine d'altérations plus ou moins importantes. En effet, chez la souris, la **surexpression de Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W ou** une **diminution de l'expression de Bax** entraine l'augmentation du nombre des spermatogonies due à l'absence de la première vague d'apoptose ayant pour rôle de réguler leur nombre [194, 209, 210] ce qui entraine une altération des stades ultérieurs de la spermatogenèse [191, 194]. A contrario, des souris

présentant une invalidation du gène Bcl-X_L et surexprimant Bax présentent une apoptose accrue des cellules germinales [191].

B- Protéines de la famille des Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAP):

L'action anti-apoptotique de ces protéines résulte de l'interaction entre les IAP et le site catalytique des caspases à l'origine d'une inhibition de l'activité des caspases effectrices. Chez l'homme, XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), cIAP-1, cIAP-2 et la survivine sont capables de se lier aux caspases effectrices activées 3 et 7, inhibant leur activité protéolytique [184]. Les IAP peuvent également être à l'origine d'une fonction anti-apoptotique en stimulant les voies de survie, notamment en activant le facteur de transcription NF-κB par des mécanismes non élucidés [211]. Toutefois, l'action anti-apoptotique des IAP peut être inhibée par différents facteurs pro-apoptotiques présents dans la mitochondrie, comme Second mitochondria-derivated activator of caspase/Direct Inhibitor of Apoptotsis Binding protein with Low pI (Smac/DIABLO ou HTRA2), ou dans le cytosol, comme XIAP Associated Factor 1(XAF-1) [212].

Des anomalies de l'expression des effecteurs de l'apoptose de la famille IAP peuvent suggérer des états pathologiques. Ainsi, la survivine est surexprimée dans les tumeurs testiculaires des cellules germinales (TGCTs) [213].

C- La protéine Fas et son ligand FasL:

Des études suggèrent que le récepteur de la mort Fas soit impliqué dans l'apoptose des cellules germinales [214]. Dans un testicule adulte normal, les cellules de Sertoli expriment faiblement FasL, qui en se fixant sur le récepteur Fas des cellules germinales permet l'induction de l'apoptose de celles-ci, mais dans une faible proportion [215, 216]. Lors d'une diminution pathologique du nombre de cellules de Sertoli, celles-ci, au contraire, surexpriment FasL pour faciliter l'élimination des cellules germinales porteuses de Fas [214], assurant ainsi le maintien d'un ratio optimal cellules de Sertoli-germinales. La production testiculaire de FasL peut-être induite suite à une inflammation chronique et entrainer l'apoptose des cellules germinales, principalement les spermatocytes pachytènes [217, 218].

De plus, il a été décrit que des patients présentant une altération de la spermatogenèse présentent une expression plus importante de Fas/FasL [219].

D- La familles des caspases:

Dans la mitochondrie des cellules non apoptotiques, le cytochrome c a une fonction de transporteur d'électrons dans le processus de phosphorylation oxydative mais une fois libéré dans le cytoplasme, il s'associe aux facteurs cytoplasmiques l'Apoptotic Protease Activating Factor-1(Apaf-1) et la procaspase-9. Ce complexe trimoléculaire, dénommé apoptosome, est à l'origine de l'activation de la caspase-9, puis de l'activation de la principale caspase effectrice : la caspase-3 [220].

Un dérèglement de l'expression des caspases peut survenir suite à l'impact de facteurs environnementeaux. Les testicules de rat ayant par exemple, longuement été exposés à la chaleur, présentent une apoptose des cellules germinales avec activation de la voie intrinsèque par une redistribution de Bax et une activation de la caspase-9, puis des caspases effectrices 3, 6 et 7 [221, 222]. Ce dérèglement altère la fonction reproductrice. En effet, des jeunes souris traités au bortezomib (un inhibiteur du protéasome qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose) présentent à l'âge adulte une grave hypospermatogenèse, avec un arrêt aux stades spermatogonies, spermatocytes ou spermatides rondes. Cette hypospermatogenèse est due à une augmentation de l'apoptose via une activation de la p53 et de l'activité des caspases [223].

E Autres effecteurs:

- Les protéines BRCA1 Associated Ring Domain 1 (BARD1) sont exprimées dans le testicule humain au niveau des cellules germinales et des cellules de Leydig. En réponse à un stress, ces protéines sont activées et induisent l'apoptose [224]. Cette protéine est capable de se lier à NF-κB (qui régule l'expression des gènes de l'apoptose) [225].

- l'Apoptosis Inducing Factor (AIF) présente une activité pro-apoptotique indépendante de l'activation des caspases. Il constituerait une voie mitochondriale parrallèle à l'apoptosome ou agirait comme une molécule de signalisation en provoquant la libération du cytochrome c et l'activation de l'apoptosome [226]. Des testicules de rats exposés au

cadmium présentent une apoptose au niveau des cellules germinales qui est médiée par la translocation de AIF de la mitochondrie vers le noyaux des cellules germinales [227].

- Les protéines de choc thermique Heat Shock Proteins (HSP) ont un rôle protecteur au cours de la réponse cellulaire au stress. Elles semblent avoir un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose pendant la spermatogénèse en régulant l'activation de l'apoptose par le contrôle de l'activation des caspases [228] (voir chapitre suivant).

CHAPITRE 2: CHOC THERMIQUE ET PROTÉINES DE RÉPONSE AU CHOC THERMIQUE

1- La réponse au choc thermique:

La réponse cellulaire au choc thermique a été découverte dans les années soixante chez la drosophile lorsqu'une élévation de la température de quelques degrés a induit l'apparition de renflements appelés "puffing" sur certains chromosomes des glandes salivaires [229-231]. La réponse au choc thermique est universelle et conduit à l'expression des protéines de choc thermique (HSPs) en réponse à différents stimuli environnementaux, comme des modifications du milieu extérieur (choc thermique, stress oxydant, hypoxie), des expositions à des agents chimiques exogènes ou encore des modifications physiopathologiques (différenciation, réponses immunitaire ou inflammatoire...) [232, 233].

L'effet de cette réponse est rapide, transitoire, dépendant du type de cellules et de l'espèce étudiée, de la sévérité du stress et est associée à une expression rapide d'ARN [230, 234]. En plus d'induire l'expression des HSPs [235], la réponse au choc thermique induit un arrêt global de la production de la majorité des protéines exprimées constitutivement et empêche l'accumulation des protéines mal repliées limitant la formation d'agrégats toxiques à l'intérieur de la cellule [236-239].

L'exposition d'une cellule à un choc thermique induit trois phases successives:

1- la phase d'altération qui conduit à la dénaturation des protéines ayant pour conséquence la perte de leur fonction et la formation d'agrégats protéiques insolubles [240].

2- la phase de réponse au choc thermique, lors de laquelle l'activation transcriptionnelle des gènes *hsp* a lieu aboutissant à la synthèse des HSPs.

3- la phase de récupération durant laquelle les altérations morphologiques sont corrigées. Les protéines retrouvent alors des activités similaires à leurs valeurs initiales. L'activation des gènes *hsp* est alors interrompue et les HSPs retrouvent leur niveau basal d'expression.

2- Les facteurs de transcription de choc thermique ou Heat Shock Factors (HSFs):

La réponse au choc thermique correspond à l'activation de facteurs de transcription appelés Heat Shock Factors (HSFs). Ces protéines se lient à l'ADN au niveau de séquences spécifiques, les HSE (Heat Shock Elements), situées dans le promoteur des gènes *hsp* et induisent l'expression des différentes HSPs.

2-1- Classification et rôles des HSFs:

Plusieurs HSFs ont été décrits et sont différents chez les vertébrés et les plantes [241-243]. Les HSFs sont relativement bien conservés au cours de l'évolution [244]. Chez l'Homme, trois HSFs ont jusqu'à présent été identifiés (HSF1, HSF2 et HSF4) chacun présentant différentes isoformes issues de l'épissage alternatif [245]. HSF3 n'est quant à lui présent que chez la souris et les oiseaux [246, 247].

De manière générale, les HSFs ont une structure très proche. Cette homologie de structure pourrait suggérer une certaine redondance dans la réponse au stress entre les différents HSFs, mais leur diversité indique une spécialisation de la réponse et un étroit contrôle de la transcription des différentes HSPs. Ceci est d'autant plus vrai, qu'un grand nombre de stimuli différents sont capables d'induire la réponse au choc thermique.

Comme schématisé dans la figure 21, les HSFs possèdent quatre domaines principaux:

- le domaine de liaison à l'ADN (DBD) en N-terminal constitué d'une structure hélice-boucle-hélice [248, 249]. En plus de se lier à l'ADN, le DBD est également responsable de l'oligomérisation [250, 251] et de l'activité transcriptionnelle [252].
- un domaine adjacent formant des répétitions hydrophobes (HR-A/B) et responsable de la trimérisation indispensable à l'activation [253].
- une autre région de répétitions (HR-C), absente de HSF4 et des HSFs de levure, impliquée dans l'inhibition de la trimérisation en interagissant avec les autres répétitions H-RA/B [254-257].
- un domaine de transactivation et de régulation (RD et AD1/2) en C-terminal.

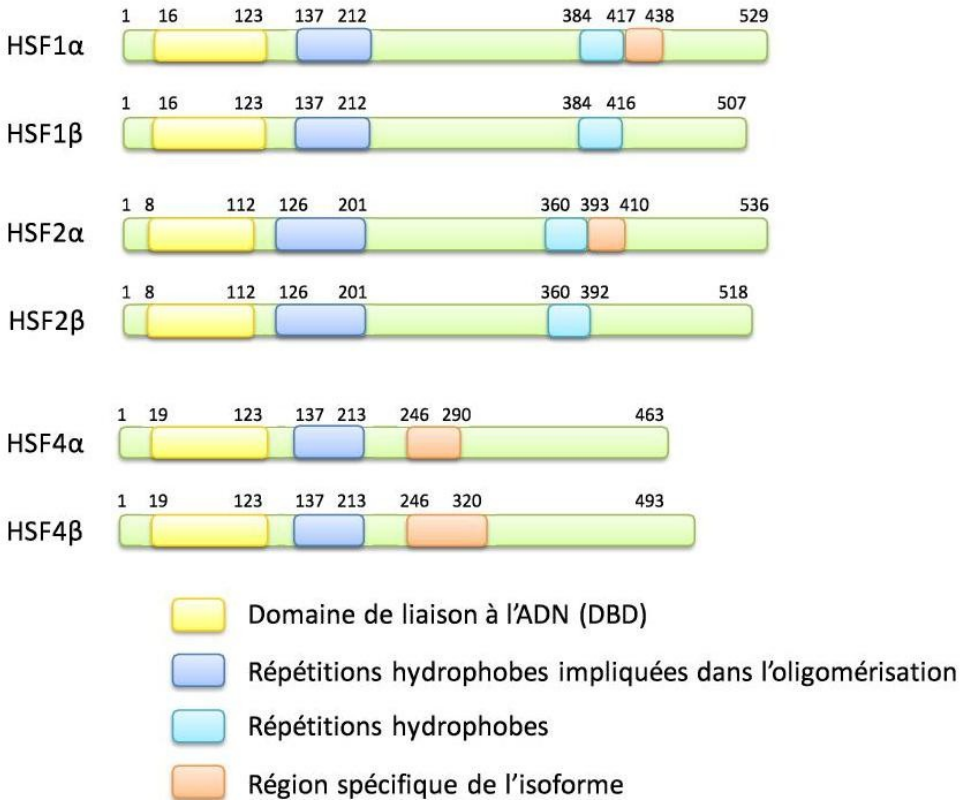


Figure 21 : *Structure des differents HSFs humains adapté de [244]*

2-2- Activation des HSFs:

L'activation des HSFs est un processus se déroulant en trois étapes (1) la trimérisation du facteur; (2) la translocation dans le noyau et (3) la liaison à l'ADN (fig.22).

Pour être actifs, les HSFs doivent se trimériser. En effet, en absence de stress, ils sont principalement localisés dans le cytoplasme sous forme monomèrique inactive grâce à l'action du domaine HR-C situé en c-terminal inhibant la trimérisation par des interactions intramoléculaires [258, 259] mais aussi grâce à plusieurs protéines telles que certaines HSPs et autres co-chaperones.

Suite à un stress, les protéines empêchant l'activation du HSF (tels que les HSPs) se détachent de celui ci le libérant. Le HSF se transloque alors dans le noyau où il se trimérise et se lie à l'ADN au niveau des éléments de réponse spécifiques, les HSE, situés dans le promoteur des gènes *hsps*. Le HSF se phosphoryle et induit l'expression des différentes HSPs

favorisant ainsi la renaturation des protéines dénaturées. Les HSPs retournent alors dans le noyau, détachent le HSF du HSE permettant ainsi le retour à une situation normale.

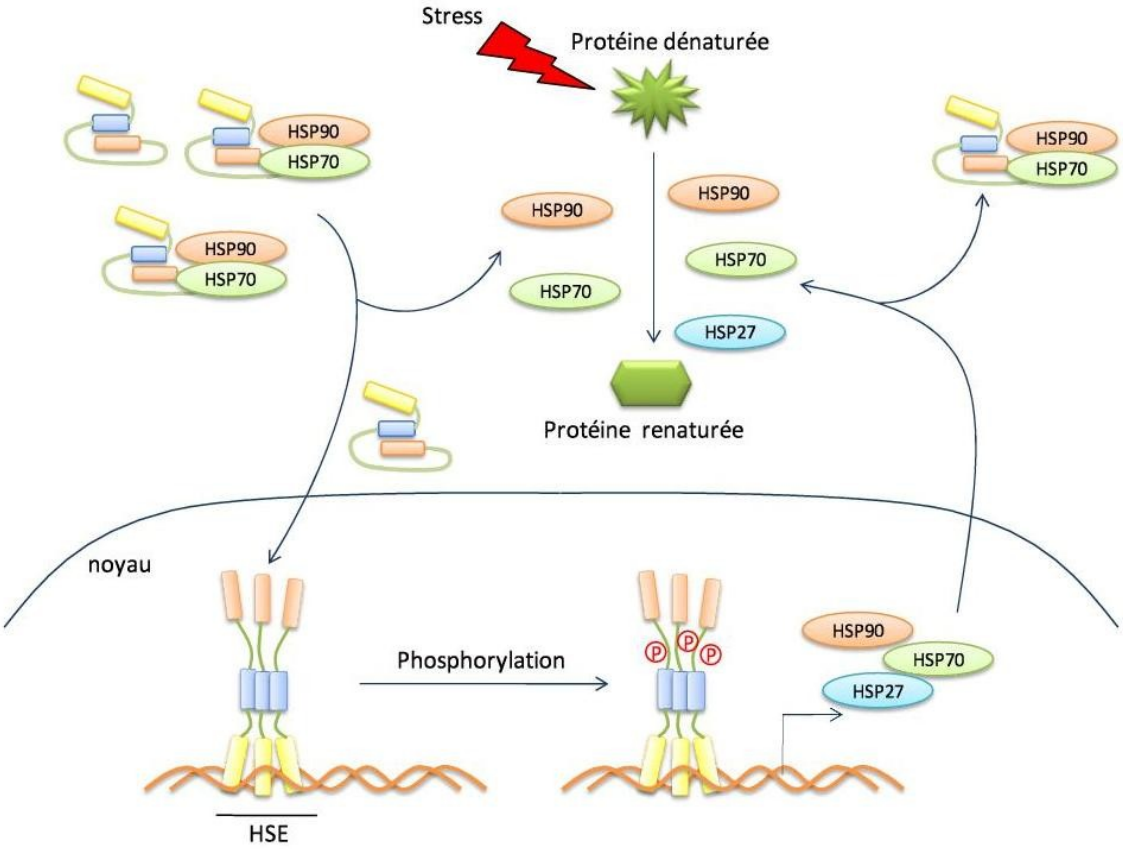


Figure 22: *Activation des HSFs (exemple de HSF1) D'aprés [260]*

2-3- HSF1:

HSF1 est un facteur de transcription constitutivement exprimé dans la majorité des cellules de l'organisme. Il est majoritairement régulé par des modifications post-traductionnelles et des interactions intra et intermoléculaires [261, 262]. Il joue aussi un rôle essentiel dans de multiples processus biologiques tels que le maintien de l'homéostasie cellulaire, notamment via le processus de thermotolérance, la réponse immunitaire et inflammatoire, la prolifération, la gamétogénèse, la mise en place des organes sensoriels, … [263-266]. HSF1 est directement activé par la chaleur ou le stress oxydatif néanmoins,

l'environnement biochimique de ce HSF peut aussi modifier sa conformation et l'activer [267].

Chez les vertébrés, HSF1 est le facteur de transcription qui médie l'expression des gènes de choc thermique induits par le stress [247]. Chez les rongeurs, plus particulièrement, HSF1 est aussi responsable de l'induction de l'expression de HSP70 après un stress (même physiologique) [244, 257].

Sur la base d'interactions protéine/protéine, un rétrocontrôle négatif sur HSF1 a été mis en évidence. Il implique des HSPs (le complexe HSP70/HSP40 mais aussi HSP90) ainsi que certaines HSF binding protein (HSFBP1) [268, 269]. D'autre part, HSF1 subit des modifications post traductionnelles très importantes. Il peut être phosphorylé par diverses kinases (ERK1/2, CaMk II...) au niveau des résidus serine de son domaine de régulation. Les phosphorylations des résidus S303 et S307 seraient impliquées dans répression transcriptionnelle de HSF1 en absence de stress. Lors d'un stress, HSF1 devient hyperphosphorylé notamment sur le résidu S230 ce qui augmente l'activité transcriptionnelle de HSF1 [268, 270-273]. HSF1 interagit aussi avec des histones déacétylases (HDAC 1 et 2) et peut ainsi induire une répression globale de la transcription en modulant les marques épigénétiques [274]. Il peut aussi subir une sumoylation qui inhibe son activité transcriptionnelle [275].

HSF1 est exprimé dans le testicule au niveau des cellules germinales où il a un rôle dans la régulation de l'apoptose. En effet, la surexpression de HSF1 dans les cellules germinales entraine leur entrée en apoptose et par conséquent un phénotype d'infertilité.

Plus précisément, HSF1 induit la mort des cellules germinales méiotiques et post-méiotiques testiculaires en modifiant directement l'expression protéique des effecteurs de l'apoptose tels que BAX, BAD, les caspases 3 ou 8... [265, 276, 277]. HSF1 peut aussi induire cette apoptose indirectement en altérant l'expression de protéines essentielles au bon déroulement de la spermatogenèse telles que certaines HSPs, kinases, histones, cyclines...[278, 279].

2-4- HSF2:

HSF2 joue un rôle important dans divers processus physiologiques tels que l'embryogenèse, la différenciation cellulaire, la spermatogenèse ou l'inhibition du protéasome dépendant de l'ubiquitine [257]. Contrairement à HSF1, HSF2 existe sous forme de dimères inactifs à l'état basal. L'activation et le rôle de HSF2 dans la réponse au choc thermique restent encore mal connus, mais il est décrit qu'il se trimérise par exemple lors de la différenciation des cellules K562 [280, 281] et des études d'invalidation de gènes ont révélé que lors d'un choc thermique, HSF2 interagit avec HSF1 au niveau du promoteur des HSPs (essentiellement HSP70) pour former des hétérodimères [282] qui modulent alors l'expression des HSPs [282, 283].

L'interaction entre HSF1 et HSF2 semble également jouer sur l'activité transcriptionnelle de ces deux facteurs de transcription [284, 285].

De point de vue régulations post-traductionnelles, il a été montré que l'expression de HSF2 est sous le contrôle de régulations épigénétiques, par le miARN-18, au niveau du testicule [262].

Au niveau testiculaire, HSF2 est exprimé dans les spermatocytes pachytènes et dans les spermatides rondes post-méiotiques[262]. Une interaction du dimère HSF1-HSF2 avec avec hspa1b a été décrite au niveau des spermatozoïdes epididymaires de la souris [285].

HSF2 semble indispensable au bon déroulement de la spermatogenèse et à la maturation des spermatozoïdes. Des défauts d'expression de ce facteur ont des conséquences drastiques sur la fertilité. En effet, l'invalidation d'HSF2 chez la souris n'entraine pas la létalité embryonnaire, mais les souris mâles HSF2 (-/-) souffrent d'une hypofertilité caractérisée par une apoptose des spermatocytes en développement et une diminution de la taille des testicules [286, 287]. De même qu'il a été montré chez des patients azoospermes, une diminution d'expression de HSPA2 due à une mutation (R502H) dans la séquence de HSF2 à l'origine d'une perte totale de sa fonction [288].

3- Les protéines de choc thermique ou Heat Shock Proteins (HSPs):

3-1- Généralités:

Les HSPs représentent l'un des systèmes génétiques les plus hautement conservés entres les organismes, elles ont été détectées chez quasiment toutes les espèces de la bactérie à l'Homme [289]. Le gène HSP70, par exemple, présente un pourcentage d'identité de 72% entre l'homme et la drosophile et de 50% entre l'homme et *Escherichia coli* [290].

Les protéines de choc thermique sont des protéines "chaperons moléculaires". Les inducteurs de stress peuvent altérer les structures des protéines perturbant ainsi le métabolisme cellulaire et entrainant une toxicité. Les HSPs sont alors capables de s'associer avec ces protéines et d'empêcher leur agrégation et peuvent également redonner aux protéines nouvellement formées ou anormales une conformation tridimensionnelle adéquate [238][233]. Cette fonction de chaperon confère aux HSPs un rôle essentiel dans la protection lors d'un stress mais aussi dans le métabolisme cellulaire en dehors de tout stress (fig. 23).

Ces HSPs peuvent aussi jouer sur la survie cellulaire en interagissant avec divers composés de la machinerie cellulaire apoptotique [291, 292]. En effet, les HSPs sont constituées de protéines pro et anti-apoptotiques. HSP70 et 90 par exemple, préviennent l'activation des caspases [293] alors que HSP27 inhibe la formation de l'apoptosome en s'associant au cytochrome c libéré par la mitochondrie [294, 295]. HSP10 et 60 quant à elles, s'associent à la procaspase-3 et favorisent son activation [296].

En fonction de leur masse moléculaire, les HSPs sont regroupées en six familles (HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP47 et HSP25-30 kDa ou small HSPs). Ces familles présentent des propriétés communes et des particularités liées à leur mécanisme d'action, leur localisation intracellulaire, leur expression basale ou bien encore la nature inductible de leur expression. Chez les mammifères par exemple, HSP60 et HSF70 (un homologue de HSP70) sont constitutivement exprimées. HSP27 ou HSP70 sont quant à elles fortement induites lors de stress cellulaires.

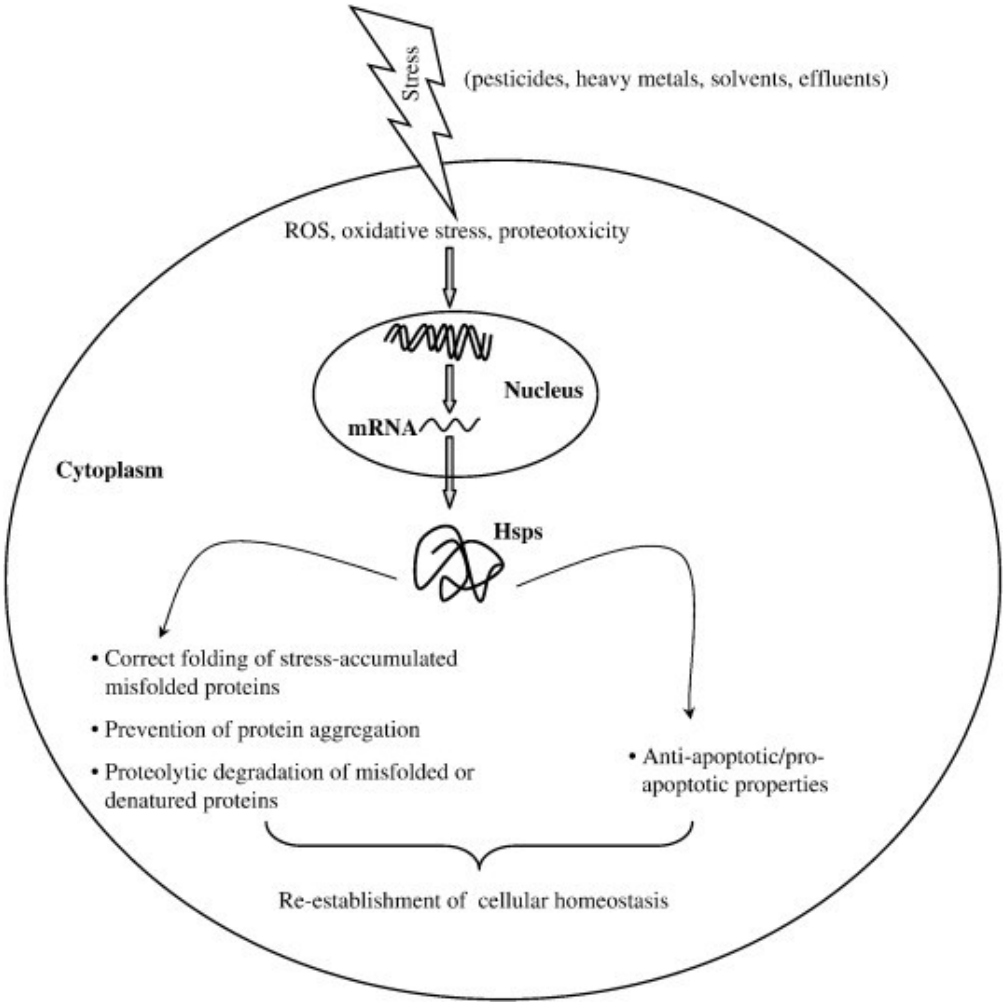


Figure 23: *Représentation schématique de l'induction des HSPs après un stress environnemental. D'après [233]*

3-2- Nouvelle nomenclature et caractéristiques des HSPs:

Kampinga a proposé en 2009 une nouvelle ligne directrice pour la nomenclature des HSPs humaines où HSPB désignera la famille des petites HSPs, DNAJ la famille des HSPs40, HSPA la famille des HSPs70, HSPC la famille des HSPs90 et enfin, HSPH celle des HSPs110 [297].

3-2-1- La famille des petites HSPs ou HSPBs:

Les petites HSPs sont abondantes et ubiquitaires. Elles sont essentiellement cytosoliques mais peuvent être transportées dans le noyau en cas de stress [298]. Les HSPs de cette famille présentent une grande hétérogénéité de structure et une faible homologie de séquence mais ont néanmoins une séquence commune conservée, le domaine α-cristallin [299].

Outre leur rôle de chaperon moléculaire, elles jouent un rôle dans la résistance au choc thermique, la survie cellulaire [300, 301].

Les noms des gènes, des protéines (ancienne et nouvelle nomenclature) ainsi que l'ID équivalent au gène humain sont rapportés dans le tableau suivant.

Nom du gène	Nom de la protéine	Anciens noms	ID du gène humain
hspb1	HSPB1	HSP28, HSP27, HSP25, HMN2B, CMT2F, HS.76067, DKFZp586P1322	3315
hspb2	HSPB2	HSP27, Hs.78846, Hs378846, MKBP, LOH11CR1K	3316
hspb3	HSPB3	HSPL27	8988
*hspb4**	HSPB4	α-A cristalline , CRYAA, CRYA1	1409
*hspb5**	HSPB5	α-B cristalline , CRYAB, CRYA2	1410
hspb6	HSPB6	HSP20, FLJ32389	126393
hspb7	HSPB7	cvHSP, FLJ323733, DKFZp779D0968	27129
hspb8	HSPB8	HSP22, H11, HMN2, HMN2A, DHMN2, CMT2L, E2IG1	26353
hspb9	HSPB9	FLJ27437	94086
*hspb10**	HSPB10	ODF, ODF1, ODF2, ODFP, SODF, RT7	4956
hspb11	HSPB11	HSP16.2, PP25, C10rf41	51668

Tableau 6 *: Nomenclature des petites HSPs d'après [297].*

*Les gènes avec * ne font pas encore consensus au sein de la communauté scientifique.*

3-2-2- La famille des HSP40 ou DNAJs:

Les HSP40 sont essentiellement cytosoliques. Leur partie N-terminale est très conservée entre espèces et elles interagissent avec les HSP70s. En plus de leur rôle de protéines chaperones, ces HSPs peuvent intervenir lors d'un processus inflammatoire, dans la prolifération cellulaire ou encore lors des réactions immunitaires [297, 302].

Les noms des gènes, des protéines (ancienne et nouvelle nomenclature) ainsi que l'ID équivalent au gène humain sont rapportés dans le tableau 7 suivant.

du gène	Nom de la protéine	Anciens noms	ID du gène humain
dnaja1	DNAJA1	DJ-2, DjA1, HDJ2, HSDJ, HSJ2, HSPF4, hDJ-2	3301
dnaja2	DNAJA2	DNJ3; mDj3; Dnaj3; HIRIP4	10294
dnaja3	DNAJA3	Tid-1; Tid1l	9093
dnaja4	DNAJA4	Dj4; Hsj4	55466
dnajb1	DNAJB1	HSPF1; HSP40	3337
dnajb2	DNAJB2	HSJ1; HSPF3; Dnajb10; MDJ8	3300
dnajb3	DNAJB3	Hsj3, Msj1, MSJ-1, Hcg3*	414061*
dnajb4	DNAJB4	Hsc40	11080
dnajb5	DNAJB5	Hsc40; HSP40-3	25822
dnajc1	DNAJC1	MTJ1; ERdj1; ERj1p; Dnajl1	64215
*dnajc2**	DNAJC2	Zrf1; Zrf2; MIDA1;M-phase phosphatase protein 11; MPP11; zuotin; ZUO1	27000
dnajc3	DNAJC3	p58; mp58; Prkri; Dnajc3; p58IPK; Dnajc3b	5611
dnajc4	DNAJC4	HSPf2; Mcg18	3338
dnajc26	DNAJC26	GAK; cyclin G associated kinase; auxilin-2	2580

Tableau 7: *Nomenclature de quelques HSP40s d'après [297].*

*Les gènes avec * ne font pas encore consensus au sein de la communauté scientifique*

3-2-3- La famille des HSP70 ou HSPAs:

Les protéines de la famille des HSPs70 sont très abondantes et présentent une structure très conservée entre espèces. (Un chapitre sur cette famille de protéines sera plus détaillé un peu plus bas). Le tableau 8 regroupe l'ancienne et la nouvelle nomenclature des HSP70.

Nom du gène	Nom de la protéine	Anciens noms	ID du gène humain
hspa1a	HSPA1A	HSP70-1, HSP72, HSPA1,	3303
hspa1b	HSPA1B	HSP70-2	3304
hspa1l	HSPA1L	HSC70t, hum70t, HSP-hom	3305
hspa2	HSPA2	Heat-shock protein-2 (HSP70.2)	3306
hspa5	HSPA5	BIP, GRP78, MIF2	3309
hspa6	HSPA6	Heat-shock protein-6 (HSP70B')	3310
hspa7	HSPA7	Heat-shock protein-7	3311
hspa8	HSPA8	HSC70, HSP71, HSC71,HSP73	3312
hspa9	HSPA9	GRP75, HSPA9B, mortaline	3313
hspa12a	HSPA12A	FLJ13874, KIAA0417	259217
hspa12b	HSPA12B	RP23-32L15.1, 2700081N1No6Rik	116835
*hspa13**	HSPA13	Stch	6782
hspa14	HSPA14	HSP70-4, HSP70L1, MGC131990	51182

Tableau 8: *Nomenclature des HSP70 d'après [297].*

*Les gènes avec * ne font pas encore consensus au sein de la communauté scientifique*

Il est à noter que HSPA1A et HSPA1B ne diffèrent que par deux acides aminés et sont ainsi quasiment interchangeables entre elles. Avec HSPA6 ils forment les membres les plus exprimés. HSPA1B et HSPA2 avaient des noms très proches dans l'ancienne nomenclature (HSP70-2 et HSP70.2). Or HSP70.2 se référait à la forme spécifiquement testiculaire de HSPA2 [297].

3-2-4- La famille des HSP90 ou HSPCs:

Les HSP90 sont majoritairement exprimées dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et le noyau des cellules. Elle ont pour rôle essentiel la translocation des protéines et la régulation des récepteurs des hormones stéroïdes [303]. Leur nomenclature est résumée dans le tableau suivant.

Nom du gène	Nom de la protéine	Anciens noms	ID du gène humain
*hspc1**	HSPC1	HSP90AA1,HSP90α, HSPN, HSP86, HSP90, HSP90A, HSP90N	3320
*hspc2**	HSPC2	HSP90AA2, HSP90α	3324
*hspc3**	HSPC3	HSP90AB1, HSPC2, HSP90B, HSP90β	3326
*hspc4**	HSPC4	HSP90B1, GP96, GP94, endoplasmine	7184
*hspc5**	HSPC5	TRAP1, HSP75, HSP90L	101310

Tableau 9: *Nomenclature des HSP90 d'après [297].*

*Les gènes avec * ne font pas encore consensus au sein de la communauté scientifique*

3-2-5- La famille HSP110 ou HSPHs:

Les HSP110 sont majoritairement exprimées dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et le noyau des cellules. Elles interviennent dans la réponse cellulaire au stress où elles interviennent dans l'agrégation et la dénaturation des protéines selon un processus ATP-dépendant. Elles inhibent aussi l'activité chaperone de HSC70 [304].

Les noms des gènes, des protéines (ancienne et nouvelle nomenclature) ainsi que l'ID équivalent au gène humain sont rapportés dans le tableau 10.

Nom du gène	Nom de la protéine	Anciens noms	ID du gène humain
hsph1	HSPH1	HSP105	10808
*hsph2**	HSPH2	HSPA4, APG-2, HSP110	3308
*hsph3**	HSPH3	HSPA4L, APG-1	22824
*hsph4**	HSPH4	HYOU/Grp170, ORP150, HSP12A	10525

Tableau 10: *Nomenclature des HSP110 d'après [297].*

*Les gènes avec * ne font pas encore consensus au sein de la communauté scientifique.*

3-3- HSP70:

3-3-1- Généralités:

Les HSP70 sont les HSPs dont la structure est la plus conservée entre elles et entre espèces [290]. Il s'agit de protéines très abondantes qui sont majoritairement exprimés dans le cytosol mais sont aussi recrutées dans le noyau des cellules après un stress; certaines sont constitutivement exprimées dans la cellule (comme HSP70-2) et d'autres ne sont exprimées que suite à un stress cellulaire (comme HSP72, HSP70-6) [305]. Il a été décrit, qu'en fonction du type cellulaire ou de la phase du cycle cellulaire, HSP70 peut être différentiellement exprimée [306].

3-3-2- HSP70 constitutivement exprimées: cas de HSP70-2 ou HSPA2:

HSP70-2 ou HSPA2 est codée, chez l'homme, par un gène porté par le chromosome 14 au niveau du locus 14q24.1. Elle est faiblement exprimée et de manière constitutive dans la plupart des tissus mais elle est plus particulièrement abondante dans le cerveau et les testicules où elle se localise plus précisément au niveau des spermatides [307-309].

Au niveau testiculaire, HSPA2 joue un rôle fondamental dans la spermatogenèse et le processus de maturation des spermatozoïdes [310, 311]. La régulation de HSPA2 est très active durant la phase méiotique de la spermatogenèse.

Chez les animaux de laboratoire, il a été décrit qu'un choc thermique entraine une augmentation de l'expression de HSPA2 dans le testicule, l'épididyme et le canal déférent des souris [310]. L'augmentation de son expression est corrélée à des cassures à l'ADN dans ces cellules [312]. Et l'invalidation de HSPA2 chez des souris mâles induit leur stérilité en raison d'une apoptose massive des spermatocytes [313]; au niveau de ces cellules, HSPA2 est aussi impliquée dans le phénomène de méiose [314].

Chez l'homme, des études cliniques confirment le rôle potentiel de HSPA2 dans l'infertilité masculine humaine, en effet, son expression est fréquemment diminuée chez les hommes dont la spermatogenèse est anormale en comparaison aux hommes fertiles [308, 315, 316].

HSPA2, en plus d'être régulée par les facteurs de transcription HSF1 et HSF2 (chapitres précédents) est sous le contrôle de **BCL2-Associated Athanogene 6 (BAG6)** aussi appelée BAT3 (pour HLA-B-associated transcript3) [317-319] (fig. 24). En absence de BAG6, HSPA2 est polyubiquitinylé et par conséquent dégradée par le protéasome ce qui entraine une apoptose généralisée des cellules germinales méiotiques et post-méiotiques chez la souris [318].

HSPA2 est aussi régulé post-traductionnellement, par **ELAV Like RNA Binding Protein 1 (ELAVL1)** aussi nommée HuR (Human antigen R) [320]. ELAVL1 contrôle le stockage, la stabilité et la traduction de l'ARNm de HSPA2. Son invalidation dans les cellules germinales testiculaires entraine une diminution de l'expression de HSPA2 ayant pour conséquence un phénotype d'azoospermie en raison d'une apoptose massive des spermatocytes [321] (fig25).

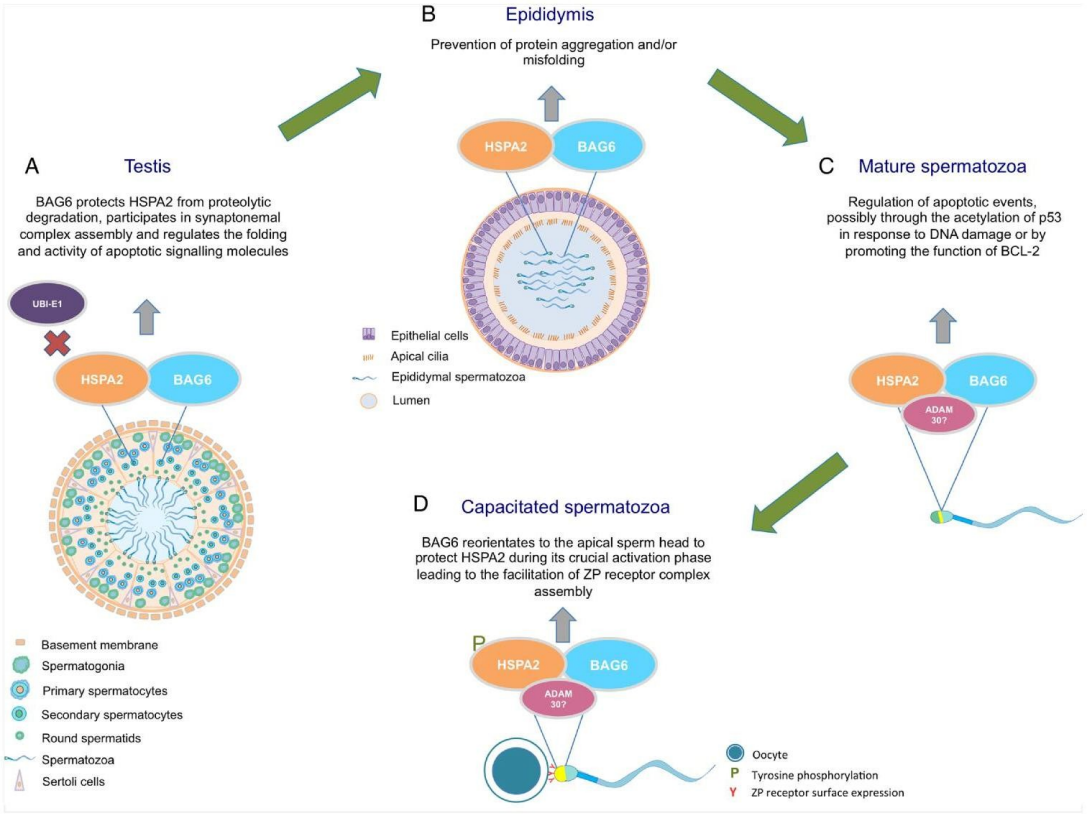


Figure 24: *Fonctions de BAG6 durant le processus de maturation spermatique. D'après[322].*

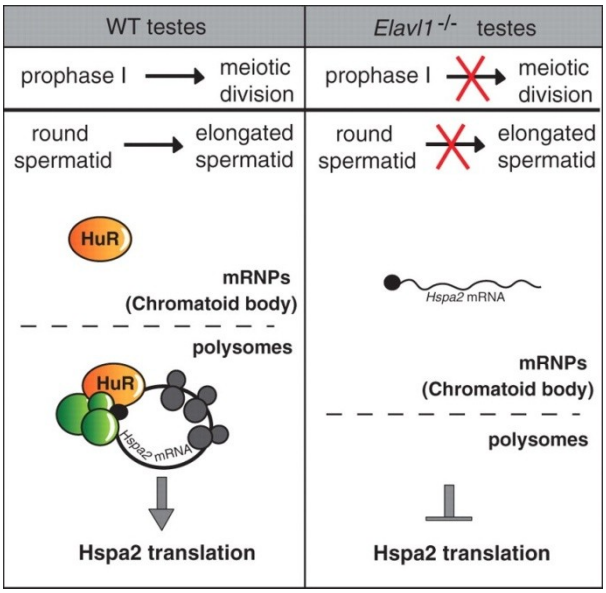


Figure 25: *Contrôle post transcriptionnel de HSPA2 par ELAVL1 et son implication dans la progression de la spermatogenèse. D'après [321] .*

3-3-3- HSP70 induites par le stress: exemple de HSP70 ou HSPA1:

HSP70 ou HSPA1 est codée par deux gènes voisins situés sur le chromosome 6 et dont les loci sont très proches 6p21.γ : *hsp70.1* (*hspa1a*) et *hsp70.3* (*hspa1b*) [323, 324]. Ces deux gènes encodent les protéines HSPA1A et HSPA1B regroupées indifféremment sous le nom de HSP70 car elles sont très proches.

HSPA1 joue un rôle important dans le transport des protéines, la cyto-protection, la différenciation cellulaire [325] et comme protéine chaperone à activité ATP-dépendante. La transcription de ces gènes est fortement induite en cas de stress dans tous les types cellulaires [323]. Le facteur de transcription HSF1 se lie alors au niveau du promoteur des gènes *hsp70.1* et *hsp70.3* pour induire une forte et rapide expression de HSPA1. Lors d'un stress cellulaire, de nombreuses protéines peuvent s'accumuler et former des agrégats insolubles que HSP70 recrute pour les diriger vers le protéasome en vue de leur dégradation [303].

HSPA1 a aussi un rôle fondamental dans l'apoptose [326] en empêchant le recrutement de la procaspase 9 par l'apoptosome, prévenant ainsi l'activation de la caspase initiatrice 9 [293] et en agissant aussi sur le facteur pro-apoptotique BAX en inhibant son transfert et sa fixation sur la membrane mitochondriale. Elle peut encore protéger le facteur anti-apoptotique Mcl-1 de la protéolyse [327].

Les HSPA1 joueraient un rôle essentiel dans plusieurs pathologies telles que les maladies neuro-dégénératives, les maladies auto-immunes ou le cancer [328]. En effet, elles sont souvent surexprimées dans les cellules cancéreuses les protégeant de l'apoptose [329] ce qui en fait un bon marqueur de malignité [330].

CHAPITRE 3: RÉGULATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES

1- Généralités:

C. Waddington a introduit le terme "**épigénétique**" au début des années quarante [331]. De nos jours, il représente l'ensemble des mécanismes permettant à une cellule de faire face à différents facteurs (prolifération, différenciation, stress,…) en modifiant son programme d'expression génétique [332] ce qui entraine des changements héritables et stables sur le long terme du programme transcriptionnel d'une cellule, sans pour autant modifier la séquence nucléotidique [333-335].

Plusieurs études, ont évoqué l'existence par exemple d'effets transgénérationnels en mettant en évidence que l'exposition fœtale ou néo-natale à des PEs induisent, à long terme, un processus apoptotique des cellules germinales, transmissible pendant au moins trois générations [336-338] via des modifications non pas "génétiques" mais plutôt "épigénétiques" [339, 340]. Ces modifications épigénétiques peuvent à tout moment être perturbées par l'environnement, elles sont réversibles (en fonction du phénomène biologique ou de la fenêtre d'exposition) mais leurs conséquences peuvent être, elles, irréversibles. Elles peuvent aussi avoir des conséquences pour la santé qui ne se déclarent que des années plus tard et exercer des effets transgénérationnels, transmis aussi bien par la mère que par le père [341][342][343].

Les modifications épigénétiques ont peuvent se faire via trois mécanismes: (1) la méthylation de l'ADN, (2) les modifications de la chromatine via les histones et (3) les ARNs non codants. Les deux premiers mécanismes agissent directement sur la structure de la chromatine alors que le troisième mécanisme agit sur les transcrits (fig.26).

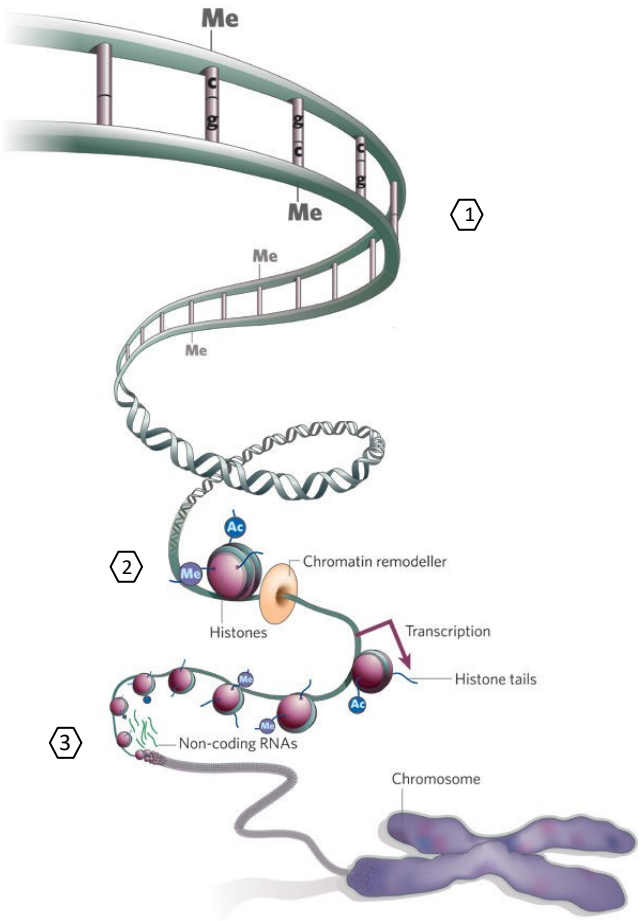


Figure 26: *Mécanismes épigénétiques.*

L'épigénome peut agir au niveau de la séquence de l'ADN via la méthylation, la chromatine peut être méthylée et acétylée au niveau des queues des histones et les petits ARNs non codants peuvent aussi agir sur les régulations post-traductionnelles. Adapté d'après [344].

2- La méthylation de l'ADN:

La méthylation de l'ADN est retrouvée dans le génome de toutes les espèces animales et végétales [345]. Chez les mammifères, 70 à 80% du génome est méthylé, le reste forme des "îlots CpG" en région 5' régulatrice des gènes.

La méthylation de l'ADN est impliquée dans les phénomènes d'empreintes parentales [346, 347] mais constitue également un point clé de la régulation de l'expression des gènes du

fait que 76% des promoteurs des gènes humains contiennent des îlots CpG et leur méthylation est une marque forte de répression de la transcription [348].

Cette réaction est catalysée par les enzymes DNA cytosine-5 methyltransferase (DNMTs) dont l'invalidation est létale [349-351] de part leur rôle essentiel dans le maintien de la stabilité génomique. De même qu'une expression aberrante des DNMTs est associée à plusieurs formes de cancer par induction de dommages à l'ADN et par altération du système de réparation à l'ADN [352-355].

Au niveau testiculaire, les DNMT jouent un rôle essentiel que ce soit au niveau du maintien de la quiescence des spermatogonies progénitrices [356] ou au niveau de la régulation de l'expression de certains gènes essentiels à la fonction testiculaire (PCNA, DMRT1, cyp19a1a...). Le profil de méthylation de l'ADN testiculaire peut être altéré suite à l'exposition à un composé exogène tels que le BPA, les phtalates, le bromopropane ou l'oestradiol benzoate [154, 357-359]. Ce dérèglement du profil de méthylation de l'ADN altère la spermatogenèse en induisant une apoptose massive des cellules germinales [154] ou encore en augmentant la prévalence des carcinomes testiculaires *in situ* [360].

3- Le remodelage de la chromatine par modification des histones:

Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont le siège de nombreuses modifications post traductionnelles, principalement au niveau de leurs extrémintés N-terminales. Ces modifications sont multiples (acétylation, méthylation, ubiquitination, sumoylation, phosphorylation ou encore biotinylation) [361]. Les combinaisons de modifications de la chromatine constituent "le code des histones" qui est lu par une machinerie cellulaire spécifique [362].

Les modifications adéquates des histones chromatiniennes sont essentielles à une transcription correcte [363]. Leur rôle semble être fondamental au cours du développement embryonnaire, de la prolifération et de la différenciation cellulaire et certaines marques sont fortement corrélées à une transcription active d'un gène (H3K4me3, H3K79me3) ou à une transcription répressive (H3K27me3 ou H3K20me3).

Au niveau testiculaire, la régulation des histones est essentielle au bon fonctionnement de la fonction testiculaire que ce soit lors de son développement [364] ou lors de la

spermatogenèse [365, 366]. A titre d'exemple, le profil de modification des histones H3K4me2 et H3K4me3 au niveau des cellules germinales est altéré chez les rats cryptorchides par rapport à des rats contrôles [367] de même qu'une exposition à des PEs de type herbicides entraine une altération de la maturation des spermatozoïdes en modifiant l'expression des histones H1t à leur niveau [368].

4- Les miARNs:

Les miARNs forment, avec les ARNs intérférants (siARNs) et les petits ARNs piwi-associés associés aux cellules germinales (piARNs), la famille des petits ARNs non codants (sncARNs). Malgré quelques exceptions chez certaines bactéries, les miARNs ne sont exprimés que chez les eucaryotes où ils jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. Ils agissent principalement sur deux niveaux de régulation (1) au niveau traductionnel en inhibant l'efficacité de la machinerie traductionnelle et (2) au niveau post- transcriptionnel en déstabilisant l'ARNm cible et en induisant sa dégradation [369-371].

4-1- Mécanismes d'action:

Pour agir sur l'ARNm cible, le miARN se fixe sur la partie 3'UTR de l'ARNs, notamment au niveau des résidus 13 à 16 de la partie 3' et au niveau de la séquence noyaux du miARN appelée miRNA Recognition Elements (MRE) [372, 373].

Le complexe ***RISC*** (RNA-induced silencing complex) est un complexe multiprotéique ayant un rôle central dans l'extinction de l'expression de gènes cibles soit en dégradant l'ARNm, soit en réprimant sa traduction. Il est composé des protéines ***Argonaute (Ago)*** et des ***GW182 (TNRC6A, B et C)*** [374]. Il existe chez les mammifères, quatre protéines Ago, les Ago1, 3 et 4 ont un rôle spécifique dans la voie des miARNs, alors que Ago2 peut aussi interagir avec les siARNs. Ce complexe protéique s'associe aux miARNs pour former le complexe ribonucléoprotéique ***miRISC*** qui s'apparie de façon imparfaite avec la région 3' UTR non codante du messager cible. Cette interaction réduit l'expression de celui-ci soit par (1) une répression directe de l'initiation de la traduction, (2) par une dégradation

exonucléolytique 3'→5' d'abord du polyA puis du corps du messager ou (3) une dégradation de la protéine en cours de synthèse suite au recrutement de protéases par le complexe miRISC, mais ce dernier mécanisme hypothétique n'a pas encore été prouvé (fig.27).

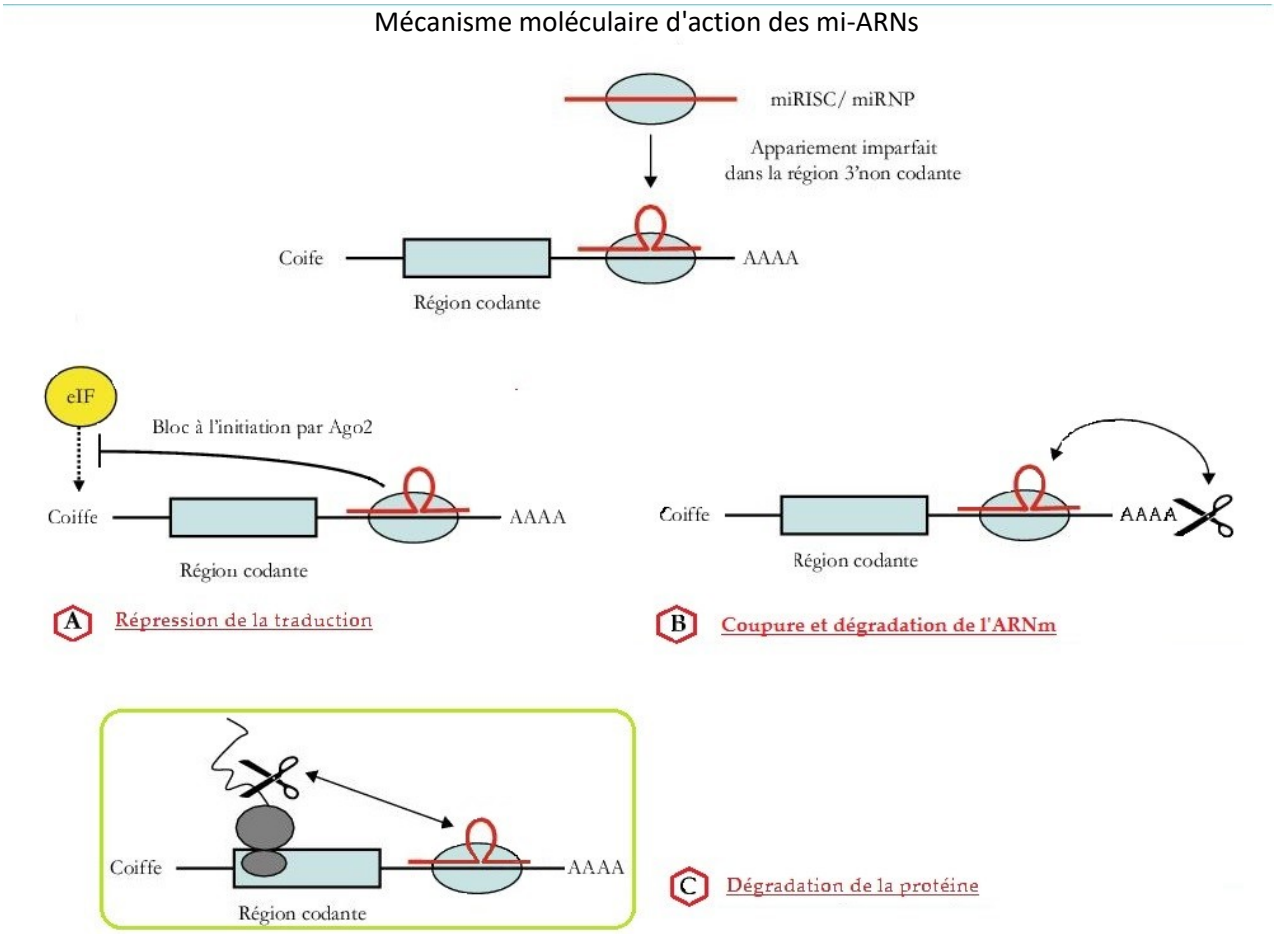


Figure 27: *Mécanisme moléculaire de l'action des miARNs via le complexe miRISC . Modifié d'après [375] .*

Le mécanisme de dégradation de la protéine présenté dans le cadre vert n'est encore qu'au stade d'hypothèse.

4-1-1- Inhibition de la traduction:

Le complexe miRISC peut inhiber la traduction via deux mécanismes, soit en inhibant l'initiation de la traduction soit en bloquant l'élongation.

- Inhibition de l'initiation de la traduction (fig.30-A): Pour une initiation correcte de la traduction, l'extrémité 5' de l'ARNm doit être "coiffée" par le complexe d'initiation de la traduction eukaryotic Initiation Factor ***eIF***. Or cette coiffe peut être le siège de l'inhibition effectuée par le miRISC. La protéine Ago2 pourrait jouer un rôle clé dans cette inhibition soit en se fixant à la coiffe empêchant ainsi l'initiation de la traduction [375, 376] (mais cette hypothèse est controversée [377]), soit en interagissant avec le complexe CBP80/20 de la coiffe [378]. L'initiation de la traduction nécessite aussi que la région 3' de l'ARNm présente une queue poly-A sur laquelle se lie la poly A binding protein (***PABP***) qui interagit avec eIF et permet ainsi le rapprochement des deux extrémités de l'ARNm [379]. Le miRISC se fixe sur la queue poly-A empêchant ainsi le recrutement des polysomes[380-384].

- Inhibition de l'élongation de la traduction: le complexe RISC bloque la progression des ribosomes sur le messager et favorise leur détachement induisant ainsi une terminaison prématurée avec production d'une protéine tronquée [375, 385]. Il a aussi été décrit que le complexe miRISC pouvait recruter des enzymes à activité protéolytique et ainsi dégrader le polypeptide en cours de synthèse [386-388].

4-1-2- Déstabilisation de l'ARNm cible:

Les miARN peuvent aussi déstabiliser l'ARNm cible et induire sa dégradation (fig.30-B) [374, 389, 390]. En effet, en cas de parfaite complémentarité entre l'ARNm cible et le miARN, un clivage entre les nucléotides 10 et 11 du miARN a lieu induisant la dégradation de l'ARNm [375, 391]. L'ARNm est d'abord déadénylé puis il subit une dégradation exonucléotidique 3' --> 5'. La structure du duplex miARN-ARNm conditionnerait l'avenir de l'ARNm: un duplex contenant une boucle sortante conduit à une inhibition de la traduction mais ne déstabilise pas l'ARNm cible, alors qu'un duplex contenant deux boucles opposées, conduit à une dégradation de l'ARNm cible [376]. Récemment, le profilage des ribosomes a permis de quantifier les transcrits en cours de traduction et a montré que la déstabilisation des ARNm représente le mécanisme majoritaire associé à la diminution d'expression d'une protéine par un miARN [392].

4-1-3- Autre mécanisme:

D'autres mécanismes peuvent aussi être impliqués dans la dégradation de l'ARNm par les miARNs. Le premier concerne les Processing-Bodies (***P-Bodies***), petites structures de stockage cytoplasmiques contenant des exoribonucléases, des enzymes de décoiffage et des protéines associées au complexe RISC [393-396]. Les P-Bodies pourraient constituer un lieu de stockage, réversible, des ARNm réprimés [397].

Il a aussi été suggéré que la protéine en cours de synthèse pouvait être dégradée suite au recrutement de protéases par le complexe miRISC (fig.30-C) [375].

D'autres études encore, suggèrent que les miARNs pourraient avoir non pas une activité inhibitrice, mais activatrice sur la traduction en fonction du cycle cellulaire. C'est le cas des miARNs-369-3 et Let-7 qui activent respectivement la traduction des ARNm de TNFα et de HMGA2 lors de l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 [398, 399].

4-2- Rôles:

Les miRNAs sont impliqués dans la régulation de quasiment tous les processus biologiques [400-402]. Ils peuvent réprimer ou activer de voies de signalisation impliquées dans le programme transcriptionnel lors du développement ou de phénomènes de différenciation [403, 404]; réprimer les transcrits inadaptés lors des phases de transition ou encore cibler des transcrits aberrants ayant été activés suite à un stress et pouvant activer des voies de signalisation inappropriées [405].

Il existe une boucle de contrôle entre le miARNs et sa cible. Un miARN peut agir sur plusieurs cibles, et un ARNm peut lui même être ciblé par plusieurs miARNs; il existe donc un nombre infini d'interactions miARNs-cibles assurant le maintien de l'équilibre cellulaire spatio-temporel.

Au niveau testiculaire, plusieurs études ont été effectuées sur le testicule entier ou sur des cellules germinales purifiées ce qui a permis d'établir un profil d'expression de miARNs spécifique de chaque type cellulaire. Les miARNs sont plus particulièrement exprimés dans les cellules germinales par rapport aux cellules somatiques [406] et selon un profil d'expression dépendant du stade de développement des cellules germinales [407][408] (fig.28).

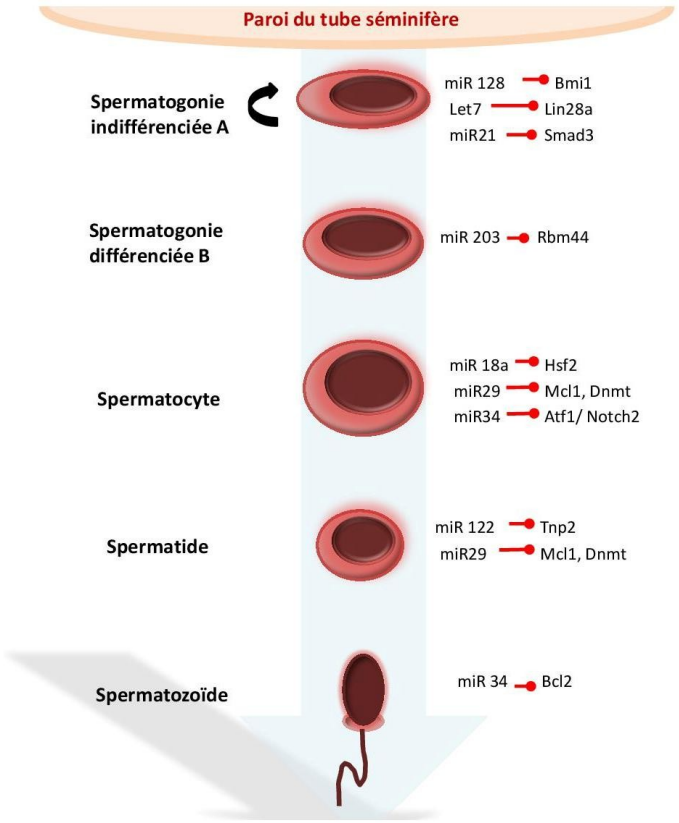


Figure 28: *Expression de certains miARNs et leur principales cibles pendant la spermatogenèse et dans chaque type cellulaire d'après* [409]

Durant la spermatogenèse les miARNs régulent l'expression des gènes impliqués dans la différenciation spatio-temporelle des cellules germinales mâles [410-413].

- Dans les cellules germinales primordiales et les spermatogonies, les miARNs contrôlent l'expression des gènes de la pluripotence afin d'assurer le maintien de la niche de cellules souches testiculaires [414-420], la régulation du cycle cellulaire [407, 421, 422] ou la différenciation [423-426].

- Dans les spermatocytes et les spermatides rondes, ils vont contrôler essentiellement des gène à activité méiotique ou apoptotique [427-430] mais peuvent aussi interférer sur la spermiation [431].

- Au niveau du spermatozoïde, les miARNs sont très faiblement exprimés de part la compaction de la chromatine et l'arrêt de l'activité transcriptionnelle. Néanmoins, le miARN-

34c est présent dans le spermatozoïde mature et dans le zygote où il intervient dans la première division cellulaire du zygote via la modulation de l'expression de Bcl-2 [432].

- Dans les cellules de Sertoli, les miARNs joueraient un rôle primordial dans la régulation du processus de différenciation sexuelle en interagissant notamment avec SOX9 [433], de l'expression de gènes de la spermatogenèse [434] et du processus de spermiation [435].

- Dans les cellules de Leydig immatures les miARNs ***régulent le nombre de cellules de Leydig*** dans le testicule en développement [436, 437] et dans les cellules matures, ils exercent une action inhibitrice sur la ***stéroïdogenèse*** [438, 439].

4-3- Implication des miARNs dans l'infertilité masculine:

De part leur implication dans plusieurs processus de la spermatogenèse, de la stéroïdogenèse ou du processus de fertilisation, un dérèglement de l'expression des miARNs pourrait contribuer à un phénotype d'infertilité.

Peu d'études ont comparé les profils d'expression de miARNs entre hommes sains et infertiles. Deux études ont néanmoins montré des profils d'expression différents entre patients présentant une azoospermie non obstructive (NOA) et patients fertiles. Cent cinquante quatre miARNs sont sous-exprimés (dont les miARN-34, -146 et -122) et dix neuf surexprimés dans le cas de NOA par rapport aux contrôles (dont les miARNs-371, -372, -373 et le cluster 17-92). D'autres miARNs tels que miARN-34c, -122, -146b-5p, -181a, -374b, -509-5p et -513a-5p sont sous-exprimés chez les patients présentant une NOA mais surexprimés chez les patients présentant une asthénospermie par rapport aux hommes sains [440, 441].

Les étapes post méiotique de la spermatogenèse sont des étapes "inertes" sur le plan transcriptionnel, mais qui subissent de grandes modifications post-transcriptionnelles par les miARNs. Des études récentes ont montré que Dicer, Dgcr8 et certains miARNs tels que la famille des miARNs-34 sont fortement exprimés lors de la méiose et spécifiquement dans les cellules germinales post-méiotiques. Leur sous expression ou leur délétion entraine un phénotype d'oligo-, térato- et azoospermie [442, 443]. La sous-expression de ces miARNs chez des hommes azoospermes [440] a été expliqué par une étude chez la souris qui a montré que ces miARNs sont essentiels au bon déroulement de la méiose et à la maturation des spermatozoïdes [442].

CHAPITRE 4: LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

1- Définition:

Le concept de perturbateurs endocriniens (PE) ne fait pas l'objet d'une définition complètement consensuelle. En effet, une première définition souvent utilisée est celle émise par Weybridge en 1996 qui définit un PE comme étant "***une substance exogène qui entraine des effets délétères sur un organisme intact ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction endocrine***" [444, 445].

En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) présente une définition quelque peu différente, étendant les principes des PEs aux populations, les définissant comme "***substances chimiques, d'origine naturelle ou artificielle, exogènes, et pouvant interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire des effets délétères sur cet organisme, sa descendance ou (sous-) populations***" [446]. Cette définition rejoint celles émises par l'Union Européenne en 2012 [447] et par l'Agence Européenne de Santé Alimentaire (EFSA) en 2013[448].

En 2012, l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (EPA) a quant à elle définit quant à elle le PE comme étant ***"un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la fixation, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie, de la reproduction et de la régulation du développement de l'organisme***" [449].

Ces définitions sont difficiles à appréhender concrètement et peuvent donner lieu à différentes interprétations. Néanmoins, elles partagent des éléments communs et reposent sur deux notions principales: **la modification de l'homéostasie endocrinienne** et l'induction **d'effet délétère** sur la santé. *In fine,* selon l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail (ANSES), en perturbant le système endocrinien, ces substances peuvent altérer différents processus tels que la production, l'utilisation et le stockage de l'énergie et plus largement la régulation du métabolisme et le développement. Certaines de ces substances peuvent par ailleurs avoir d'autres effets

notamment sur la **reproduction**, et nuire à la fertilité ou perturber le développement du foetus.

2- Origine:

Les perturbateurs endocriniens peuvent être d'origine naturelle (hormones et phytoestrogènes) ou être une conséquence des activités humaines (produits issus de l'industrie chimique contenus dans des objets de consommation courante, pesticides, médicaments, cosmétiques...). Ils peuvent ainsi être présents de manière naturelle ou du fait d'une contamination, dans différents milieux (eaux, aliments, produits de consommation...). Ils sont classés en deux groupes selon leur origine: naturels ou artificiels.

2-1- Origine naturelle:

Les PEs d'origine naturelle sont essentiellement des hormones naturellement produites par l'organisme, des phytohormones ou encore de myco-hormones. Il peut aussi s'agir de produits issus de la consommation journalière (comme la caféine ou la théine).

2-1-1- Les hormones mammifères naturelles, les œstrogènes:

Il s'agit essentiellement d'hormones stéroïdes lipophiles (progestérone, œstrogènes, testostérone ou hormones thyroïdiennes), produites par exemple par les animaux d'élevage, qui se retrouvent dans l'environnement sous forme d'hormones libres ou de métabolites [450].

2-1-2- Les phytohormones, les phyto-œstrogènes:

Comme leur nom l'indique, il s'agit d'hormones produites par les plantes. Elles sont capables de se fixer au récepteur aux œstrogènes de part une importante analogie de structure avec l'œstradiol (fig. 29) [451, 452].

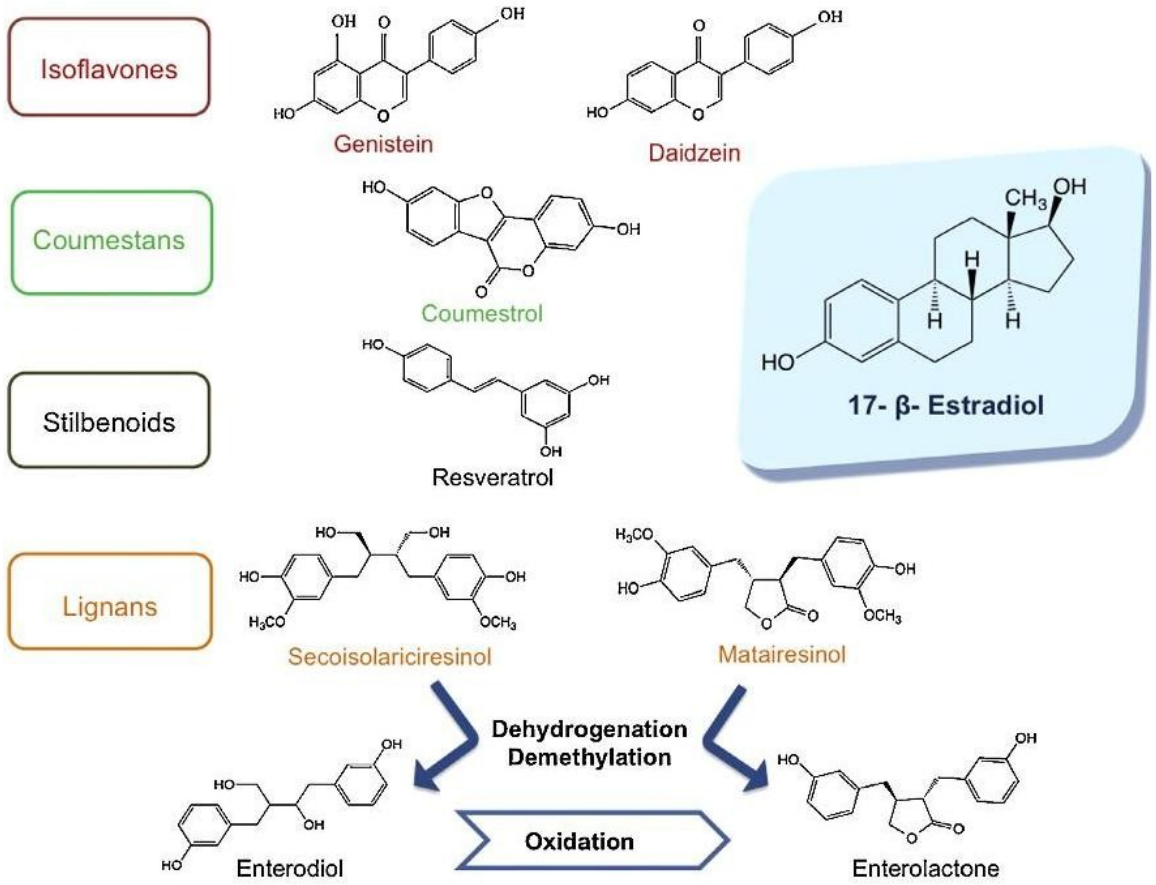


Figure 29: *Homologie de structure de certaines phyto-œstrogènes avec le 17-ß-oestradiol (E2). Différentes classes peuvent être citées: les isoflavones, les coumestans, les stilbenoïdes et les liganans. D'après [452]*

Les phyto-œstrogènes sont classés en quatre groupes selon leur homologie structurale avec l'E2. Les isoflavones (comme la genistéine et la daidzéine), les coumestanes et les stilbenoïdes (comme le resveratrol) constituent les composés naturellement actifs. Les lignanes quant à eux doivent d'abord être converti en métabolites actifs par la flore intestinale [452]. Il s'agit de composés souvent absorbés via l'alimentation. En effet, les isoflavones se retrouvent essentiellement dans les légumineuses (soja, lentilles, petits pois), les lignanes dans diverses céréales (graines de lin, son, seigle, sarrazin, millet, soja, avoine et orge, par ordre décroissant) et dans certains fruits et légumes et les coumestanes, sont présents dans les luzernes utilisées en alimentation animale. La caféine et la théine sont quant à elles utilisées dans la vie de tous les jours et se retrouvent parmi les composés les plus fréquemment détectés dans l'environnement [453, 454].

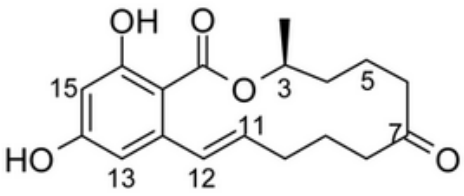
D'autre part, les phyto-œstrogènes, généralement lipophiles, sont plus stables et ont une demi-vie plus élevée que les œstrogènes car ils ne sont pas métabolisés aussi vite que les hormones humaines [455].

Plusieurs études confirment le potentiel PE de ces phyto-œstrogènes. *In vivo*, ces substances ont entrainé l'infertilité des animaux herbivores ovins, bovins, porcins... Adams a décrit en 1990 le cas de plus d'un million de brebis devenues infertiles après s'être nourries dans des pâturages riches en phyto-œstrogènes [456]. Des rats exposés *in utero* à la génistéine ont développé plus de cancers mammaires que des rats contrôles [457]. Des études épidémiologiques, notamment menée en Angleterre, ont montré un taux plus élevé d'enfants atteints d'hypospadias chez les mères végétariennes de part une exposition plus accrue aux phyto-oestrogènes [94]. *In vitro*, leur activité œstrogénique est fortement supérieure à des molécules synthétiques comme le DDT ou le BPA. En effet, des concentrations de 1 à 10nM de phyto-œstrogènes étaient capables de stimuler l'activité transcriptionelle des récepteurs aux œstrogènes alors que des concentrations cent fois supérieures l'étaient pour les composés chimiques [458].

2-1-3- Les myco-hormones: les myco-œstrogènes:

Elles sont présentes par des champignons se développant sur les plantes à la faveur de l'humidité, tels que *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*. Les myco-œstrogènes contaminent les céréales (maïs, avoine, blé, orge, riz ou soja) ainsi que l'huile végétale. Il existe plusieurs myco-œstrogènes telles que la patuline, le déoxynivalénol, le nivalenol, le HT-2, T-2 ou la zéaralénone. Une étude menée en 2013 a montré que sur près de 160 échantillons de céréales, plus de 65% étaient contaminés par au moins une mycotoxine et plus de 15% par plusieurs mycotoxines [459].

La zéaralénone (ZEA), dont la structure très proche de celle de l'oestradiol (fig. 30) présente une action agoniste d'ERα et une action mixte agoniste-antagoniste au niveau d'ERß [458]. De part son activité œstrogénique et ses propriétés anaboliques, elle a fait l'objet de nombreuses utilisations commerciales et études scientifiques.



Zearalenone

Figure 30: *Structure chimique de la zéaralénone (ZEA)*

Son métabolite, le zéranol (ou α-ZAL), est largement utilisé aux USA comme hormone de croissance afin d'améliorer le taux d'engraissement des bovins. La consommation de viande riche en zéranol à Puerto Rico a entrainé chez l'homme, une épidémie de naissances prématurée et puberté précoce dans les années 80 [460]. Ces mycotoxines peuvent fortement altérer la fonction de reproduction chez les animaux domestiques en altérant la viabilité et la mobilité spermatique [461, 462], la capacité des spermatozoïdes à se fixer à la *zona pelucida* et en affectant leur intégrité chromatique [463, 464].

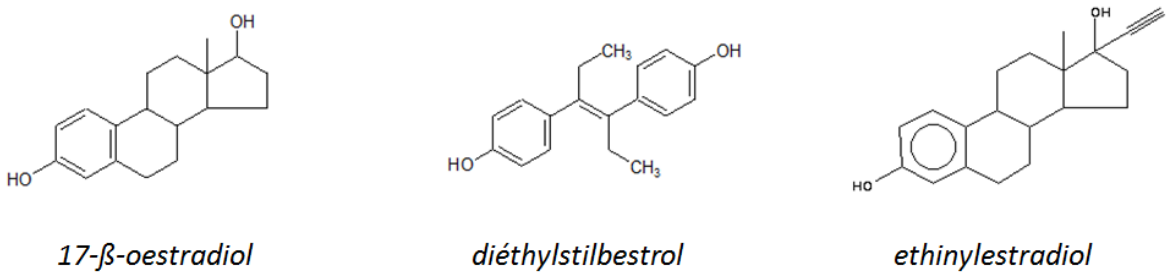
Chez les animaux de laboratoire, sa consommation pendant la vie fœtale ou néo-natale a été corrélée à une altération de l'expression de la famille des ABC transporteurs au niveau du foie des embryons [465] et dans le testicule du rat adulte [466]. Son injection post natale à des rats entraine aussi une diminution du poids du testicule, du diamètre et de la longueur des tubes séminifères ainsi qu'une chute du nombre de cellules de Sertoli et de spermatogonies [467]. Chez le rongeur adulte, l'exposition à la ZEA induit une diminution du poids testiculaire associée à une hypospermatogénèse par apoptose des cellules germinales [468-470].

2-2- Origine artificielle:

Les PEs d'origine artificielle, sont classés en plusieurs sous groupes en fonction qu'il s'agisse de composés destinés à une utilisation en tant qu'hormones de synthèse ou de composés destinés à une utilisation autre que leur effet hormonal.

2-2-1- Molécules produites pour leur effet hormonal:

Les hormones de synthèse sont des hormones spécialement conçues pour agir sur le système endocrinien et le moduler (comme les oestro-progestatifs des pilules contraceptives ou certains anti-cancéreux). Il s'agit, comme le diéthylstilbestrol (DES) de certains additifs utilisés pour l'alimentation animale ou jusqu'en 1970 pour traiter les grossesses à risques, de composés contraceptifs (tels que l'éthinylestradiol, le méstranol, le mifépristone ou RU 486) ou encore d'hormones utilisées pour les traitements de l'infertilité, de la ménopause, ou encore de certains cancers hormono-dépendants (tels que le 4-hydroxytamoxifène ou le raloxifène). La structure chimique de ces différents composés est très variable mais reste très proche de celle de l'oestradiol (fig.31).



17-ß-oestradiol *diéthylstilbestrol* *ethinylestradiol*

Figure 31: *Structure chimique de deux hormones de synthèse (diéthylstilbestrol et l'éthinylestradiol) comparées à celle du 17-ß-oestradiol*

Les xéno-œstrogènes se retrouvent facilement dans l'environnement car elles sont difficilement éliminées lors des traitements d'épuration des eaux usées. L'exposition à ces PEs est donc chronique. Leur potentiel de PE vient aussi du fait que leur dégradation est plus lente que les hormones naturelles.

Le DES est une des premières prises de consciences chez l'homme des effets à long terme sur la descendance de composés hormonaux résultant d'une exposition *in utero*. Le DES synthétisé en 1938 possède une puissante activité œstrogénique. Malgré la connaissance d'effet carcinogènes potentiels, il fut préféré au BPA mais aussi aux hormones purifiées pour une commercialisation. A partir de 1947, le DES est autorisé par la FDA (1950 en France) à être utilisé pour le traitement des fausses couches. Il sera utilisé pour cette indication jusqu'à la fin des années 1970 (1977 interdiction pour la France, 1978 par la FDA) bien que dès 1953,

une étude épidémiologique très solide démontrait son inefficacité [471]. A partir de 1970, paraissaient des publications identifiant des effets sur la descendance. En effet, nombreux cancers (utérus, seins, vagin) ont été observés chez les filles de ces femmes et une augmentation de la prévalence d'hypospadias, de cryptorchidie, de kystes épididymaires ou encore d'inflammation testiculaire a été observée chez leurs garçons [472-476].

En 2000, des travaux expérimentaux ont mis en évidence des mécanismes d'action de type épigénétique (méthylation de certains gènes impliqué dans l'adénocarcinome du vagin à cellules claires). Ces mécanismes épigénétiques peuvent aussi expliquer les effets transgénérationnels (3ème génération) d'une exposition *in utero* au DES [477].

Chez les rongeurs, une exposition *in utero* ou néonatale au DES a été corrélée à des cas de cryptorchidie, de kystes épididymaires, d'une altération de la spermatogenèse par apoptose entrainant une diminution du poids des testicules, épididymes et vésicules séminales [153, 478-480].

Il a été décrit qu'un traitement à court terme du poisson zèbre par le 17α-ethinyl estradiol (EE2) entraine une démasculinisation via une altération transcriptionelle de gènes impliqués dans la différenciation sexuelle (tel que Sry-related HMG box-9) [481]. Chez une autre espèce de poisson, l'exposition au EE2 a été corrélée à une altération du comportement sexuel, de l'expression de l'aromatase et à une altération du compte spermatique [482]. Chez les rats, une exposition *in utero* et durant la lactation au EE2 a été corrélée chez les descendantes femelles à une augmentation du nombre de mamelons, une diminution de la taille des ovaires ainsi qu'à des malformations génitales. Chez les descendants mâles, une augmentation de la distance ano-génitale ainsi qu'une augmentation de la taille de la prostate ventrale ont été observées [483].

2-2-2- Molécules produites pour leurs effets autres que hormonal:

Ces composés englobent des produits chimiques conçus pour une utilisation industrielle en tant que solvants, surfactants ou lubrifiants (tels que les PCB ou les nonylphénols), des produits retrouvés dans les substances plastiques (telles que le bisphenol A ou les phtalates), des pesticides (tels que le methoxychlore, le lindane ou le DDT), des fongicides (tels que la vinclozoline), des substances médicamenteuses (tel que le flutamide) ou des produits de la consommation courante (tels que les parfums, cosmétiques ou produits d'entretien). Des sous-produits industriels (tels que les dioxines) ou certains métaux lourds

présentant une activité œstrogénique (tels que le plomb, le cadmium, le cuivre ou le mercure) entrent aussi dans cette catégorie de PEs .

Comme ils sont retrouvés aussi bien dans les aliments et l'eau, fixés ou en suspension et de part leur structure (fig.32), ces composés chimiques peuvent fortement modifier le fonctionnement du système endocrinien de l'homme et des animaux. Ils possèdent une activité œstrogéno-mimétique ou antiandrogénique.

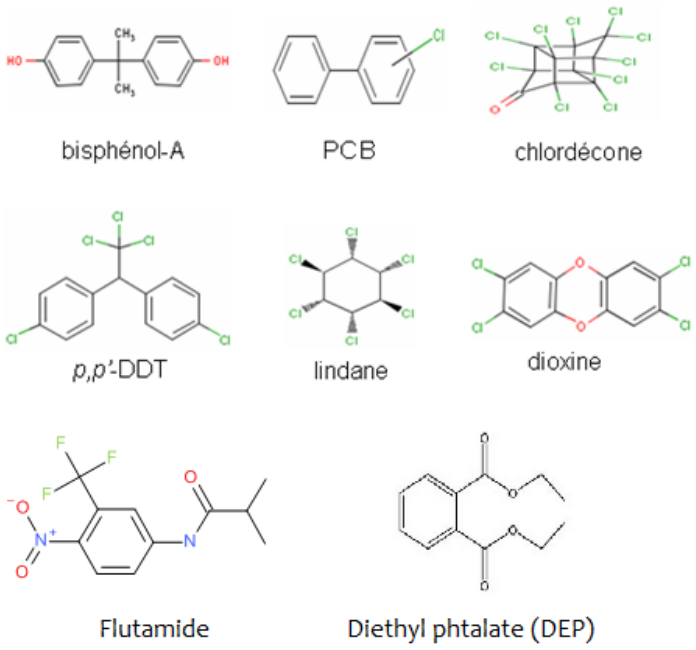


Figure 32: *Structure chimique de quelques xéno-œstrogènes de synthèse.*

Le bisphénol A (BPA) est un composé chimique présent dans la plupart des plastiques polycarbonés et les résines époxy, relargué sous l'effet de la chaleur, il se retrouve dans un nombre fort important de produits de notre consommation quotidienne (boites de conserve, biberons, sacs plastiques, tickets de caisse...). Il possède un effet PE œstrogéno-mimétique. Il est essentiellement absorbé par voie alimentaire chez l'Homme et est retrouvé sous forme libre active dans le sang et sous forme conjuguée dans les urines [484]. Aux USA, la forme conjuguée du BPA a même été retrouvée dans l'urine de 93% de la population [485]. Des rongeurs exposés au BPA, pendant des périodes critiques d'exposition fœtale et/ou périnatale ont présenté des troubles du développement, de la reproduction, du métabolisme. Au niveau du testicule une altération des cellules de Sertoli et des cellules germinales a été rapportée

[486]. Ces résultats restent néanmoins discutés à l'heure actuelle vu que d'autres études ont quant à elles décrit des effets absents ou transitoires sur la spermatogenèse [487, 488].

Comme composé chimique ayant une activité anti-androgénique, nous pouvons prendre l'exemple d'un fongicide très largement utilisé: la vinclozoline. Cette molécule ainsi que ses métabolites M1 et M2 agissent en tant qu'antagonistes du récepteur des androgènes (AR). En inhibant l'activation du AR, la vinclozoline facilite la dégradation des androgènes et inhibe l'expression de gènes androgénodépendants [489]. L'exposition *in utero* à la vinclozoline entraine chez les rongeurs mâles adultes une atrophie de la prostate et une altération de la spermatogenèse par apoptose des cellules germinales ainsi qu'une diminution de la mobilité spermatique [490-492].

Les PEs d'origine chimique peuvent altérer la fonction des cellules de Leydig et par conséquent la stéroïdogenèse de plusieurs espèces. Le tableau suivant présente, d'après [493], quelques autres exemples d'effets que peut avoir l'exposition à différentes fenêtres de ces PEs.

PE chimique	**Période d'exposition**	**Effet sur la fonction de reproduction mâle**	**Référence**
Plomb	néo-natale	- diminution de l'activité des enzymes de la stéroïdogenèse et du taux de testostérone testiculaire et sérique - diminution du poids des testicules et des épididymes	[494]
Cadmium	néo-natale	- diminution de l'expression d'enzymes de la stéroïdogenèse - diminution fœtale et adulte du taux sériques de testostérone	[495]
DEHP	pré-pubertale-	- diminution de la production d'enzymes de la stéroïdogenèse - diminution du poids testiculaire	[496]
BPA	péri-natale	- diminution de l'expression génique des enzymes de la stéroïdogenèse - diminution du taux sériques de testostérone et de LH	[497]
BPA + DEHP	péri-natale	- diminution de l'expression des récepteurs AR et StAR et de l'AMH - diminution du taux sériques de testostérone, progestérone et FSH	[498]

Tableau 11: *Quelques effets des PE d'origine chimique sur le fonctionnement des cellules de Leydig et la stéroïdogenèse. D'après [493]*

3- Mécanisme d'action:

Les mécanismes par lesquels les PEs peuvent interférer avec les systèmes de régulation hormonale sont nombreux. Les PEs peuvent donc être classés selon leur mécanisme d'action sachant qu'un même PE peut agir selon un ou plusieurs mécanismes à la fois. On peut distinguer deux grands mécanismes d'action:

3-1- Interaction avec le métabolisme hormonal:

Les hormones ciblées sont les hormones thyroïdiennes et les stéroïdes sexuels. Nous nous focaliserons sur les PEs qui ciblent les œstrogènes et la testostérone.

- ***Les œstrogeno-mimétiques:*** Un PE est considéré comme œstrogéno-mimétique lorsqu'il agit selon le même mécanisme que les estrogènes naturels et/ou qu'il provoque toute ou partie des effets des estrogènes naturels. Ces PEs ont souvent une structure assez homologue à celle de l'œstradiol. Citons comme exemple le DDT, le PCB, la zéaralénone, la génistéine, le BPA, ou le DES.

- *Les antiandrogènes:* Un PE est considéré comme ayant une activité antiandrogénique lorsqu'il empêche l'activité des androgènes et pourra jusqu'à provoquer l'apparition d'un phénotype plus ou moins féminisé. Citons par exemple la vinclozoline, le linuron, le p-p'-DDE ou le flutamide.

Les PEs modifient l'action des hormones endogènes sur une ou plusieurs étapes de leur métabolisme [104, 123]. Si le PE possède une structure similaire à l'hormone endogène, il peut interagir directement avec le récepteur de l'hormone et l'activer, mimant l'action d'une hormone endogène et induisant des effets similaires, notamment par l'activation ou l'inhibition de transcription des gènes en aval.

3-1-1- Modification de la concentration hormonale via une altération de sa synthèse, de son transport, de son métabolisme ou de son excrétion:

Un PE peut altèrer la concentration d'une hormone endogène en modifiant sa synthèse, son transport ou son excrétion .

Ces composés affectent les enzymes spécifiques du métabolisme comme les sulfatases, les 5α-réductases, les stéroïdes déshydrogénases ou l'aromatase, en stimulant ou inhibant leur activité. Un inhibiteur de l'aromatase altère ainsi la formation du 17-ß-oestradiol à partir de la testostérone diminuant ses concentrations sériques et augmentant celles de testostérone.

Le tributylétain, composé chimique utilisé comme peinture antisalissure des bateaux entraine un phénomène d'imposex (développement de pénis chez les femelles) chez les gastéropodes marins. Ce phénomène est provoqué par l'inhibition de l'action de l'acétylcoenzyme A responsable de l'inactivation de la testostérone [499, 500]. D'autres PEs sont capables d'affecter la synthèse des androgènes comme la dioxine et de certains antifongiques comme le kétoconazole ou certains métaux comme le cadmium ou le plomb [118, 119, 124].

Les hormones sont en partie des composés lipophiles mais circulent le plus souvent liées à des protéines de transport. Les PEs peuvent ainsi interférer avec le transport plasmatique des hormones endogènes en entrant en compétition avec elles pour les sites de liaisons aux transporteurs. Ceci entraine une augmentation de la fraction hormonale libre et active. Il s'agit du mécanisme d'action des PCB et de leurs métabolites hydroxylés qui à très faibles concentrations entrent en compétition avec le hormones thyroïdiennes pour se fixer à la transthyrétine, leur protéine de transport [501].

3-1-2- Interaction avec le récepteur hormonal:

Il a été proposé que le principal mécanisme d'action des PEs était l'interaction avec les récepteurs aux hormones qu'ils soient nucléaires [502], non nucléaires ou récepteurs orphelins (tels que AhR, Aryl Hydrocarbon Receptor ou Nr0b2: Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner) [153, 485]. Ces interactions des PEs avec les récepteurs hormonaux peuvent entrainer des effets agonistes ou antagonistes (fig.33).

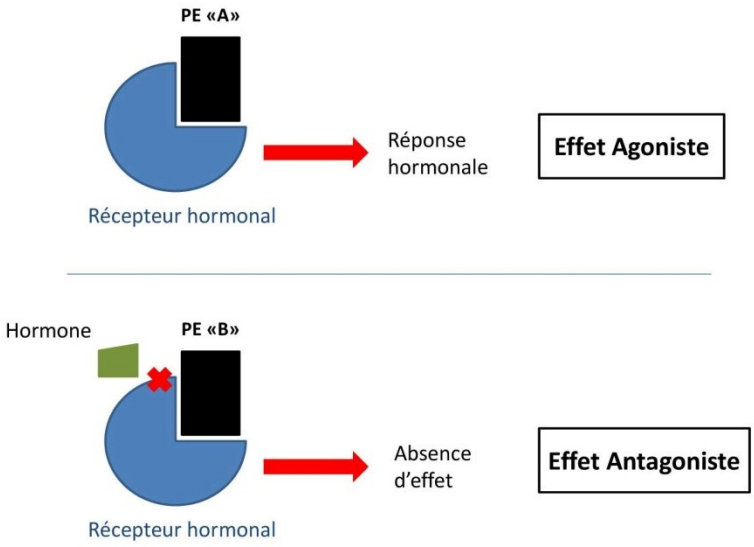


Figure 33: *Modes d'action agoniste et antagoniste d'un PE par interactions avec le récepteur hormonal.*

Un PE capable de se lier à un récepteur comme le fait l'hormone endogène entraine une réponse hormonale agoniste ou antagoniste et proportionnelle à l'affinité du PE au récepteur.

Les PEs à activité œstrogénique (tels que le DES ou la génistéine) sont capables d'activer les voies de signalisation en se fixant aux récepteurs aux œstrogènes alors que les PEs à activité antindrogénique (tels que le triclosan ou le flutamide) se fixent aux récepteurs aux androgènes [104, 106].

Un PE antagoniste sera capable de se fixer sur le récepteur sans l'activer mais empêchera la liaison de l'hormone endogène à son récepteur. Cette inhibition peut être compétitive si le site de liaison est le même que celui de l'hormone endogène, ou non compétitive si le PE se fixe au complexe récepteur-hormone l'empêchant de se fixer sur l'ADN. Ainsi dans les deux cas, le PE empêche d'activer les gènes cibles [104, 106].

Le PE peut ainsi altérer l'activité hormonale en modifiant le système de régulation d'un récepteur cellulaire [114] (le BPA est par exemple capable d'altérer la régulation protéique du récepteur nucléaire et/ou de ses cofacteurs par la voie de dégradation du protéasome [115, 123]). Le PE peut aussi agir en modifiant la concentration du récepteur hormonal comme c'est le cas du 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) [503] ou en altérant le recrutement de

coactivateurs ou de corépresseurs indispensables au bon fonctionnement de l'hormone [104, 123].

3-2- Mécanismes épigénétiques:

Si les mécanismes d'action hormonaux sont la marque des PEs, ils n'expliquent pas les actions de programmation à long terme des pathologies ni les effets transgénérationnels. Depuis une dizaine d'années, il a été montré que les altérations persistantes et transgénérationnelles des PEs sont associées à des modifications de mécanismes épigénétiques [504-508]. (Voir chapitre épigénétique précédant).

Les PEs peuvent agir soit en modifiant le profil de méthylation du génome, soit via une modification des histones ou encore via une altération des profils d'expressions des petits ARNs non codants essentiellement les miRNAs.

Quelques exemples d'altération de la fonction de reproduction par des PEs via des mécanismes épigénétique sont présentés ci-après:

3-2-1- Altération du profil de méthylation de l'ADN:

Une des premières études ayant montré une relation de cause à effet entre l'exposition à un PE (le DES) et une modification épigénétique (altération du profil de méthylation de l'ADN) est l'étude menée en 1997 par Li & *al*. [509]; Depuis, plusieurs autres PEs ont été corrélés à ce type de modification.

- Une exposition *in utero* à la vinclozoline et au methoxychlore induit, via une altération du profil de méthylation de l'ADN, une diminution du compte spermatique associée à une augmentation de l'incidence d'infertilité [336].

- En 2009, une exposition au DDT a été corrélée à une modification du profil de méthylation de l'ADN dans l'hypothalamus des jeunes rats [510].

- Une exposition néonatale au BPA a été associée à une hyperméthylation des récepteurs aux œstrogènes au niveau du testicule de rat adulte [511].

- Une exposition au butyl-parabène a été associée à une modification du profil de méthylation au niveau des spermatozoïdes [512].

- Une exposition néo-natale à l'œstradiol benzoate (EB) entraine chez le rat adulte une modification de l'expression des DNMTs et de la méthylation de l'ADN génomique causant une apoptose massive des cellules germinales [154].

3-2-2- Modification des histones:

- Une exposition *in utero* au DES ou au BPA a été associée chez la souris à des changements néoplasiques dans le tissu mammaire associés à une surexpression de la protéine Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) et sa marque épigénétique l'histone H3 trimethylé. La programmation développementale d'EZH2 (une histone méthyltransférase qui est impliquée dans la tumorigenèse) est un nouveau mécanisme par lequel l'exposition *in utero* aux perturbateurs endocriniens conduit à la régulation épigénétique de la glande mammaire [513].

- Dans notre laboratoire, nous avons montré qu'une exposition néo-natale à l'EB a été corrélée à une apoptose des cellules germinales post-méiotiques via un mécanisme mettant en jeu une surexpression d'EZH2 [514].

3-2-3- Modification des profils d'expressions des miARNs:

- *In vitro*, l'exposition au BPA a été corrélée à une augmentation de l'expression du miARN-146a entrainant un retard de prolifération de cellules placentaires humaines [515]. Sur la lignée murine TM4, une altération du profil d'expression de plus de 35 miARNs a été observée après une exposition de trois heures au BPA [516]. Le traitement d'une lignée cancéreuse mammaire avec le fludioxonil et le fenhaxamid (deux fongicides généralement utilisés dans les rizières) stimule l'expression du miRNA-21 [517].

- Une exposition néo-natale à l'EB entraine chez des rats adultes une modification du profil d'expression de la famille des miRNAs-29 corrélée à une apoptose massive des cellules germinales [154].

4- Effets des perturbateurs endocriniens sur les pathologies testiculaires:

L'utilisation de plus en plus courante de produits chimiques variés, ayant un caractère de PE et qui se retrouvent en concentration croissante dans l'environnement, semble être une des causes majeures de l'apparition du syndrome de dysgénésie testiculaire. Compte tenu de la multiplicité des composés chimiques pouvant ainsi se retrouver répandus dans l'environnement, ce phénomène représente désormais un enjeu de santé publique.

En effet, l'exposition aux PEs environnementaux serait l'une des principales causes de l'infertilité masculine idiopathique. Plusieurs cibles des PEs ont été identifiées au niveau de la stéroïdogenèse ou de la spermatogenèse. De plus, les fenêtres d'exposition au moment desquelles l'animal ou l'homme sont exposés aux PEs entrainent des effets plus ou moins importants. Les résultats de plusieurs études montrent qu'une exposition périnatale ou néonatale entraine des effets plus délétères qu'une exposition adulte, suggérant la notion de fenêtre de vulnérabilité [493].

4-1- Altération de la stéroïdogenèse:

La stéroïdogenèse, dont les cellules de Leydig sont le siège, est une des premières cibles des PEs qui peuvent agir à plusieurs niveaux (fig.40).

In vivo, il a été montré que les composés perfluocarburés (PFC) ou les hydrocarbures perfluorés réduisent les taux de testostérone causant une hypofertilité chez les souris mâles [493] de même que *in vitro* dans le milieu de culture de cellules de Leydig de rats mLTC-1 [518]. Ces composés réduisent aussi le nombre de récepteurs de la LH chez la souris adulte [519] et les mêmes effets ont été observés sur des rats adultes traités à certains métaux lourds (plomb, cadmium) [520].

Une exposition *in utero*, néonatale ou pré-pubertaire au plomb, au cadmium, au BPA ou encore aux phtalates a entrainé chez les rongeurs une altération de la stéroïdogenèse causant une diminution du taux sérique et testiculaire de testostérone, une diminution du poids testiculaire [494-496, 498]. Dans le cas d'une association de BPA et DEHP les effets sont en plus transmis aux descendants [497].

D'autre part, les hormones thyroïdiennes, notamment la triiodothyronine (T3), peuvent affecter la différenciation des cellules de Leydig et la stéroïdogenèse en altérant la transcription du steroidogenic factor-1 (SF-1) et par conséquent de la protéine steroidogenic acute regulatory (StAR). Or il a été décrit que des PEs, tels que les phtalates, le BPA ou certains métaux lourds, sont capables d'altérer ces hormones, exerçant ainsi un effet indirect sur la stéroïdogenèse humaine [521, 522].

La figure 34 résume comment quelques PEs (phtalates, BPA, métaux lourds, ou les hydrocarbures perfluorés) peuvent agir à différents niveaux dans la cellule de Leydig. La stéroïdogenèse représente ainsi une des plus importantes cibles des PEs au niveau du testicule.

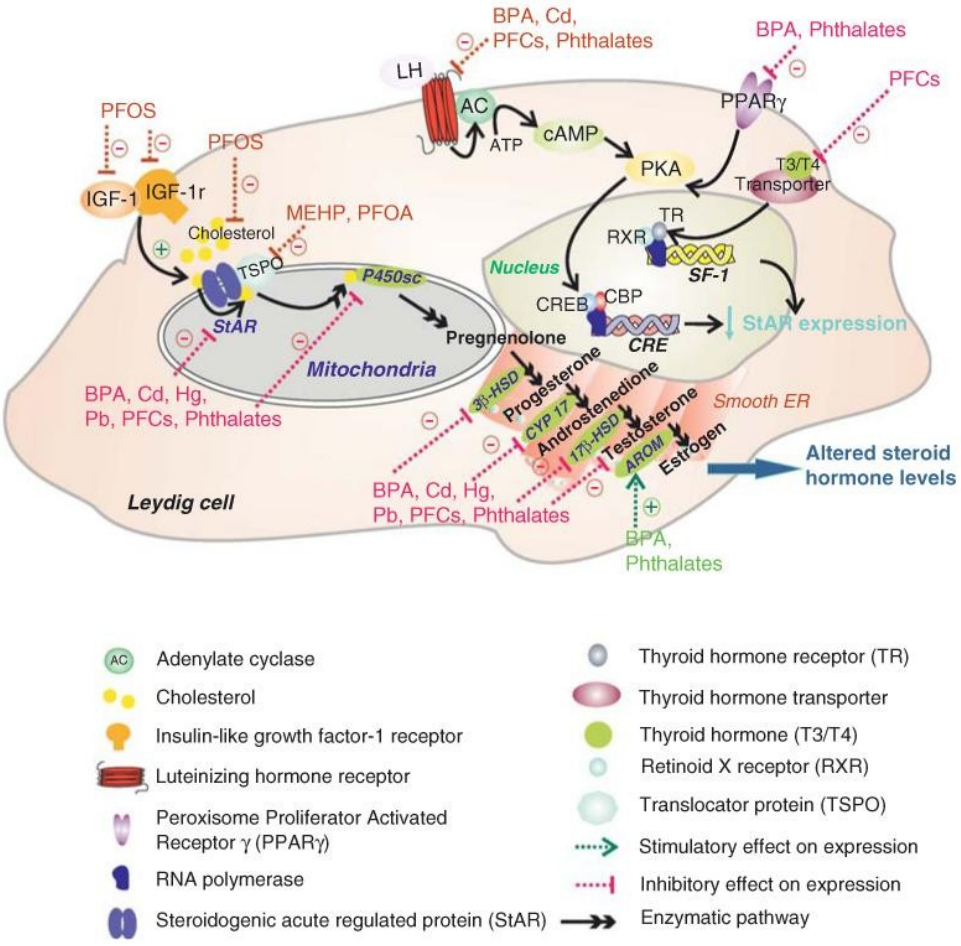


Figure 34: *Schéma représentatif des effets de quelques PEs sur la stéroïdogenèse des cellules de Leydig. D'après [493]*

4-2- Altération de la spermatogenèse:

L'initiation et le bon déroulement de la spermatogenèse sont des étapes cruciales pour la fonction de reproduction du mâle. La testostérone, si elle est essentielle au développement et au bon maintien de la fonction testiculaire adulte, a aussi un rôle fondamental dans la régulation de la signalisation paracrine au niveau de cellules de Sertoli afin d'initier et de maintenir la spermatogenèse [493]. Cette étape constitue aussi une cible privilégiée des PEs qui peuvent agir tant au niveau des cellules de Sertoli qu'au niveau des cellules germinales.

Comme indiqué dans la figure 35, les PEs peuvent agir directement ou indirectement à différents niveaux de la spermatogenèse en agissant directement sur les cellules germinales ou indirectement, à différents niveaux de la cellule de Sertoli.

Les PEs peuvent d'abord induire l'apoptose des cellules de Sertoli en inhibant l'expression de l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) et de son récepteur (IGF-1R) tout deux essentiels à la survie de ces dernières. L'exposition de rongeurs à l'acide perfluorooctanesulfonique (PFOS) ou à la dioxine entraine une diminution du taux d'IGF-1 et de son récepteur au niveau testiculaire [519, 523]. L'EB ou le DES provoquent une infertilité chez les rongeurs en induisant une apoptose sur les cellules germinales méiotiques et post méiotiques [153, 154].

La qualité spermatique est positivement corrélée aux taux de gonadotrophines et négativement corrélée aux taux d'inhibine-ß [524]. Les PEs peuvent altérer indirectement la qualité et la quantité spermatique en modifiant les taux de ces deux hormones. En effet, des expositions des souris mâles au PFOS ou de rats mâles au BPAF entrainent une augmentation du taux sérique de FSH et une diminution du taux d'inhibine-ß. Ce qui a pour conséquence une altération partielle de la spermatogenèse et une diminution du compte spermatique [524].

Dans le testicule, les récepteurs aux androgènes (AR) sont exclusivement exprimés au niveau des cellules de Sertoli. Ces récepteurs sont essentiels à l'entrée en méiose des cellules germinales et au processus de spermiation et leur absence est associée à une infertilité et une hypotestostéronemie [49, 50, 493, 525]. Il en est de même pour les récepteurs aux œstrogènes [526, 527]. Une altération du nombre ou du fonctionnement de ces récepteurs suite à une exposition aux PEs entraine une altération du développement des cellules germinales et par conséquent à une infertilité [493].

Chez l'homme, une exposition périnatale à la dioxine entraine une diminution du taux d'inhibine-ß et une augmentation du taux de FSH [528] pouvant être à l'origine d'infertilité. En effet, des études épidémiologiques chez des patients infertiles a montré une corrélation négative entre leur taux sérique de BPA et leur taux d'inhibine-ß et positive avec leur taux de FSH [529].

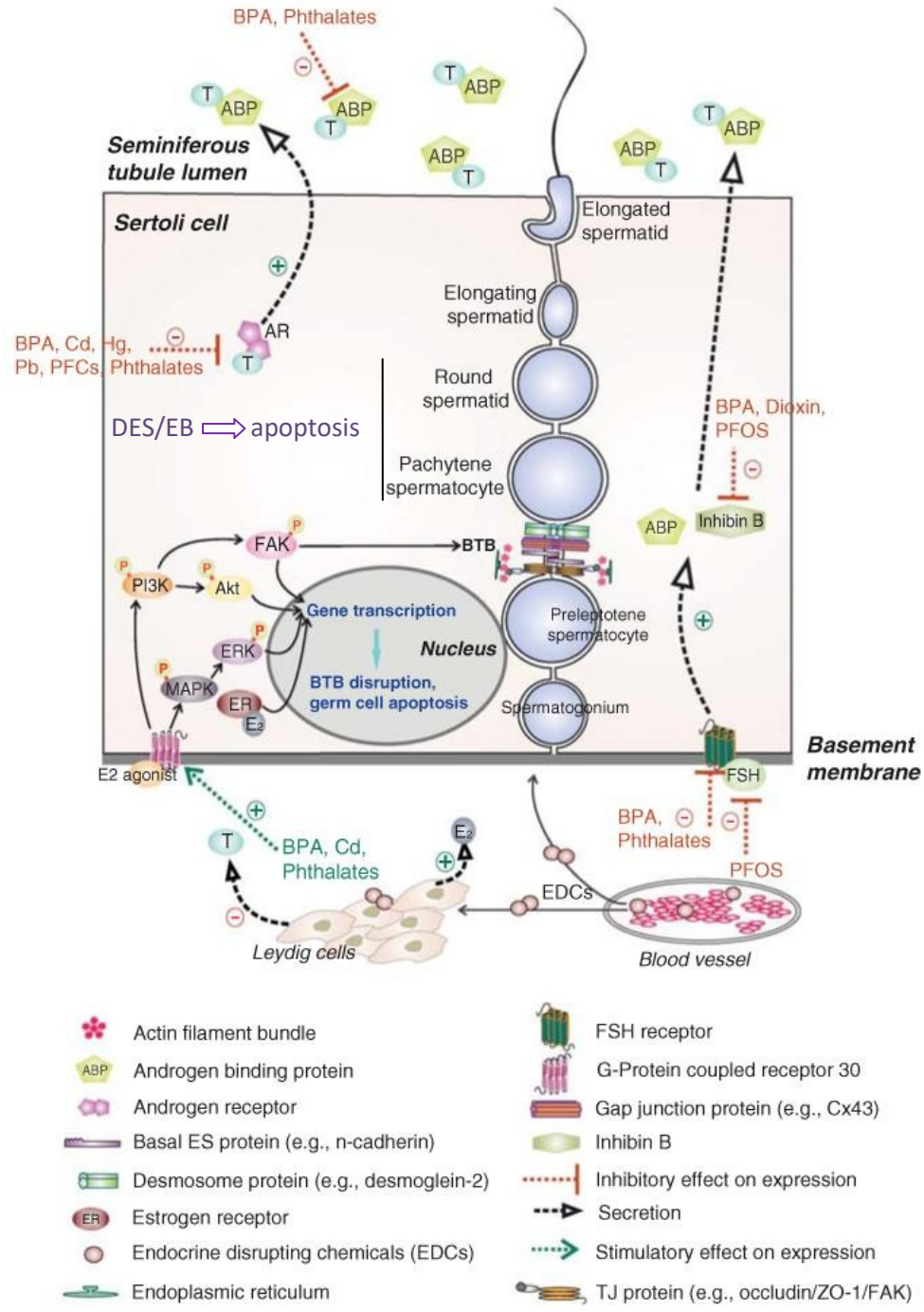


Figure 35: *Schémas représentatif des effets de quelques PEs sur la spermatogenèse via une altération du fonctionnement des cellules de Sertoli. D'après [493] modifié.*

4-3- Fenêtres d'expositions aux PEs et notion de programmation des pathologies du testicule:

Chaque personne peut être exposé durant sa vie, à des temps différents, à un ou plusieurs PEs. Ces expositions occasionnelles ou répétées sont à l'origine de plusieurs pathologies. Plusieurs études ont émis l'hypothèse que les expositions subies *in utero* et pendant les premières années de la vie sont celles qui affecteront l'état à long terme et établiront la susceptibilité d'un individu à développer ou pas certaines pathologies [530, 531] [532, 533].

La figure 36 montre comment l'effet de l'environnement tout au long de la vie peut influer sur le développement puis au déclin du capital fonctionnel d'un organe jusqu'à l'apparition de la pathologie. Il est clair que la période de développement de l'organe est la période la plus sensible de point de vue exposition aux PEs [340].

Les preuves qui montrent les liens entre expositions environnementales précoces et effets à long terme sont établies dans plusieurs modèles animaux, dans des conditions environnementales variées et à des périodes de développement différentes, avec des effets souvent variables selon le sexe [534].

En effet, l'exposition fœtale et/ou néonatale des rongeurs aux PEs (ex: phthalates, PCBs, vinclozoline) entraine un phénotype à l'âge adulte reproduisant tout ou partie des caractéristiques du SDT (altérations de la fertilité, hypospadias, cryptorchidies) à l'exception du cancer testiculaire. De même que les études épidémiologiques qui ont mis en relation exposition durant la vie intra-utérine à plusieurs PEs et développement de pathologies testiculaires chez les jeunes garçons ou les hommes adultes (voir chapitre pathologies du testicule) sont d'autant d'arguments en faveur d'une notion de programmation de certaines pathologies et d'effets transgénérationnels.

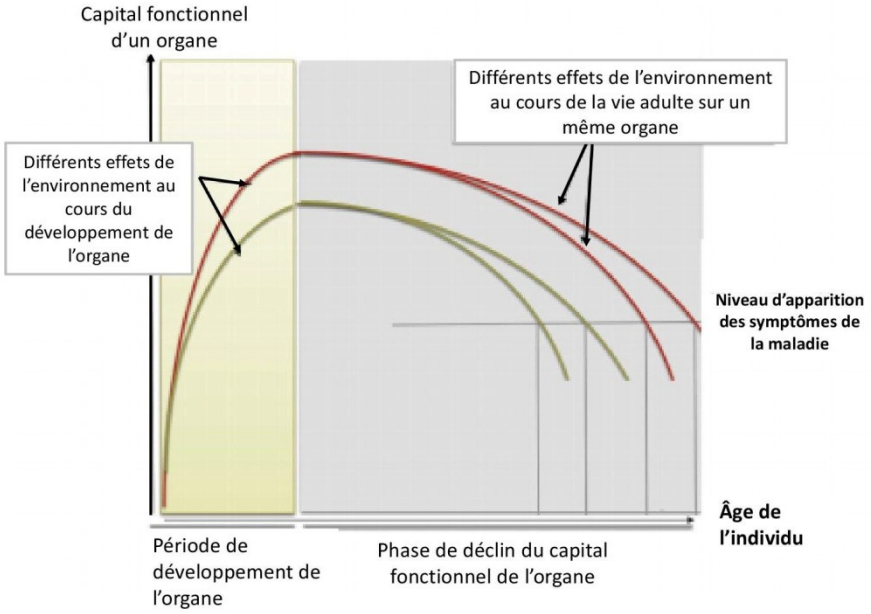


Figure 36: *Schéma représentatif de l'effet de l'environnement tout au long de la vie sur le développement et le déclin de la fonction d'un organe jusqu'au développement d'une éventuelle pathologie. D'après [340].*

La figure 37, établie par Wan et *al.* en 2013, représente les différents stades de développement du testicule avec les différentes cellules et hormones pouvant être affectées par une exposition aux PEs à différents âges [493].

La prolifération des cellules de Leydig débute dès la septième semaine de gestation jusqu'à environ un an et demi. Une exposition aux PEs à cette période, par exemple au BPA, augmente la prolifération de ces cellules via une activation des ERα alors qu'une exposition aux phtalates diminue leur prolifération. A partir de deux ans, les cellules de Leydig "adultes" commencent à proliférer jusqu'à la période post pubertaire où elle cessent de se diviser. Durant cette période pré-pubertaire, une exposition au BPA stimule la prolifération des cellules de Leydig tandis que les phtalates auront l'effet inverse [497].

Concernant les cellules de Sertoli, leur prolifération débute *in utero* jusqu'à l'âge de six mois environ où elles atteignent leur nombre final. Après une période de quiescence, leur maturation débute au moment de la puberté. Une exposition périnatale aux PEs comme le BPA entraine une augmentation de la prolifération de ces cellules, augmentant le poids testiculaire [493].

Les cellules germinales prolifèrent quant à elles juste après la naissance. Leur prolifération peut aussi être altérée par des PEs tels que le cadmium ou les phtalates et stimulée par le BPA [535, 536].

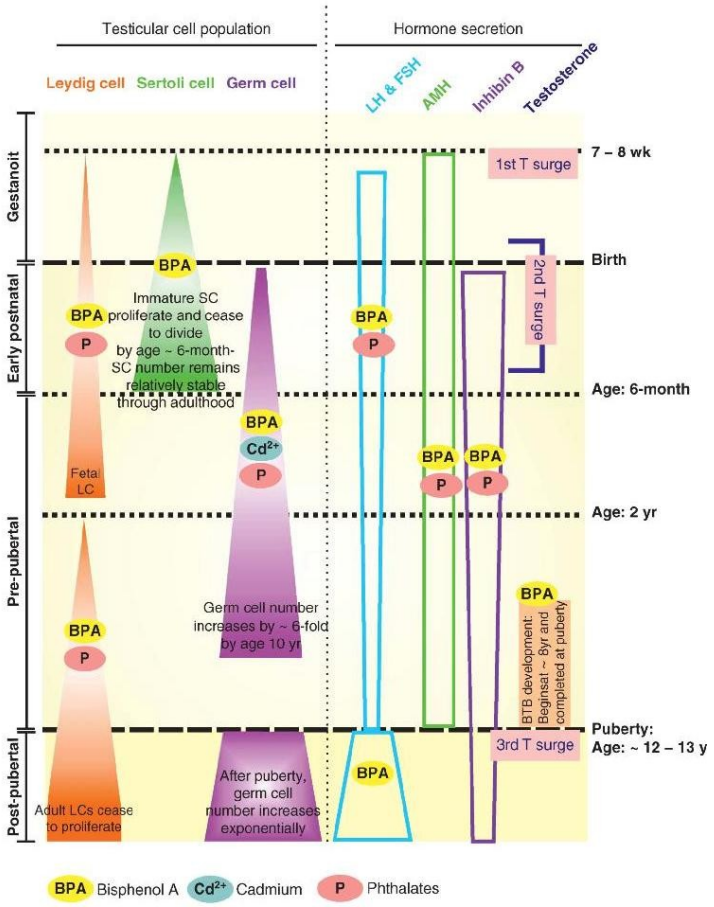


Figure 37: *Schémas représentatif des différents stades de développement testiculaire, des différentes cellules et hormones qui peuvent être affectées par une exposition à certains PEs. D'après [493]*

Les hormones ont aussi un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de la fonction de reproduction. La régulation hormonale pendant le développement précoce est médiée par gonadotrophines pituitaires (LH et FSH), l'hormone anti-Müllerienne (AMH) et inhibine-ß. Une exposition périnatale au BPA et aux phtalates augmente la concentration d'AMH et nuit à la sécrétion des gonadotrophines et de l'inhibine-ß. Au cours de la puberté, l'amplitude et la fréquence de libération des gonadotrophines sont augmentées pour répondre aux besoins croissant en ces hormones. L'exposition au BPA à ce stade du développement altère leur sécrétion ce qui affecte la biosynthèse des stéroïdes testiculaires [496].

Tout au long du développement du mâle, il y a trois pics de testostérone qui stimulent différents événements; le premier pic est gestationnel, il se produit vers la septième semaine et stimule la prolifération des cellules testiculaires fœtales. Le second pic se produit juste avant la naissance et dure quelques mois après et sera à l'origine de l'augmentation de la prolifération des cellules de Leydig. Enfin, le troisième pic se produit à la puberté et stimule la maturation des cellules de Sertoli, étape essentielle au bon déroulement de spermatogenèse. Une exposition aux PEs durant ces trois périodes critiques peut altérer les processus biologiques mis en jeu [493].

En plus d'altérer la prolifération et l'intégrité des cellules testiculaires, de la sécrétion des hormones, l'exposition aux PEs peut aussi altérer l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire. Dans les tubes séminifères, la mise en place de la barrière hémato-testiculaire débute vers environ 8 ans et se termine à la puberté. Les spermatocytes préleptotène doivent être transportés à travers cette barrière vers le compartiment adluminal pour leur entrée en méiose. L'exposition au BPA, au DES ou de cadmium chez des rats perturbe l'intégrité de la membrane hémato-testiculaire [495, 537-539].

5- Modèle d'un perturbateur endocrinien a activité antiandrogénique: Le flutamide:

Le flutamide est une molécule de synthèse a propriété antiandrogène non stéroïdienne. De part sa structure, il agit comme un antagoniste du récepteur aux androgène (AR) (fig.38). Il se fixe de façon compétitive sur le AR sans l'activer.

Dans le cadre médical, le flutamide est utilisé dans le traitement des cancers de la prostate métastasés et ce, dans le cadre d'une thérapie dite "de privation androgénique" en association avec une castration médicale ou chirurgicale [540-542], la castration à elle seule ne diminuant pas la sécrétion des hormones stéroïdiennes. Le flutamide est également préconisé dans les cas d'hirsutisme majeur chez la femme [543, 544].

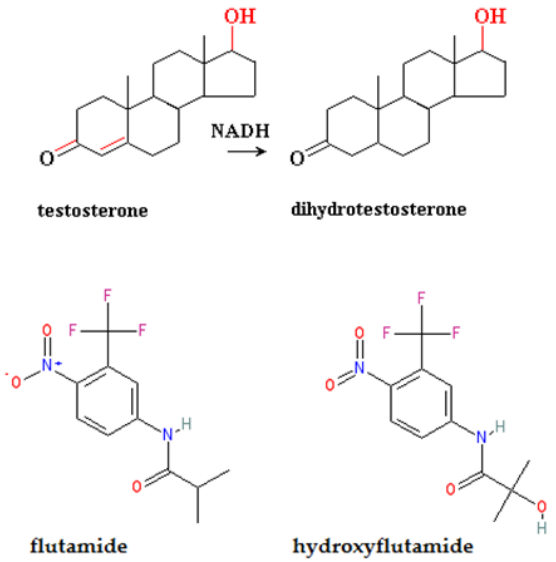


Figure 38: *Structure chimique du flutamide et de son métabolite l'hydroxyflutamide comparée à celle de la testostérone et de la DHT.*

Par ailleurs, le flutamide est fréquemment utilisé comme molécule de référence dans les études conventionnelles de toxicologie (test de Hershberger, études suivant la ligne directrice 407 de l'OCDE,…) ou visant à détecter ou comparer les effets de composés ayant une activité potentielle de type PE à activité antiandrogénique [545-549].

De point de vue toxicologique, il est aussi utilisé comme molécule de référence pour doser la bioactivité d'une pollution par un mélange de PEs à activité antiandrogènique dans la nature. En effet, l'activité antiandrogénique d'une mixture de PEs antiandrogène a été évaluée en Concentration Equivalente de Flutamide (FEQ) [550-553].

5-1- Mode d'action du flutamide:

Le flutamide est rapidement absorbé par l'organisme et métabolisé en 2-hydroxyflutamide dans le foie. Chez l'homme, le pic plasmatique de flutamide est atteint en deux heures environ, et la demi-vie plasmatique de son métabolite, l'hydroxyflutamide, est d'environ six heures chez les sujets jeunes et de huit heures chez le sujet âgé.

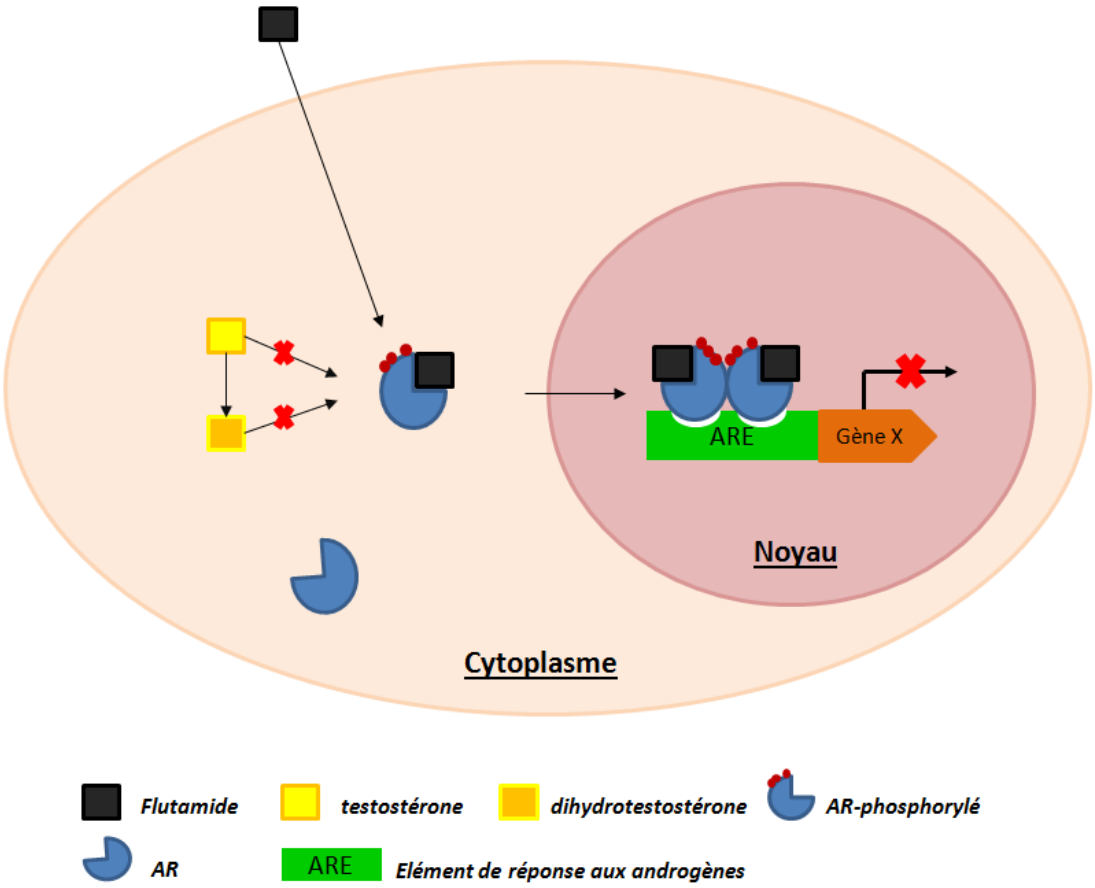


Figure 39: *Mécanisme d'action du flutamide sur sa cellule cible. En se fixant sur le AR, le flutamide empêche la fixation des ligands naturels (T ou DHT) et inhibe ainsi la transcription des gènes cibles.*

Les effets du flutamide passent principalement par son métabolite capable de se lier à l'AR et d'empêcher ainsi la liaison des androgènes endogènes (testostérone et DHT) à leur récepteur au niveau des cellules cibles [554-557] (fig.39). Le flutamide ou l'hydroxyflutamide empêchent aussi la liaison de l'AR au niveau des éléments de réponse aux androgènes (ARE) modulant ainsi la transcription des gènes androgéno-dépendants [554, 555, 558]. Le flutamide est également capable de bloquer le rétrocontrôle de la testostérone au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire ce qui induit une augmentation de la concentration sérique de LH et de testostérone, provoquant une surstimulation des cellules de Leydig [559].

5-2-Effet d'une exposition fœtale au flutamide:

La production d'androgènes pendant la vie fœtale est indispensable au développement normal de l'appareil reproducteur. La testostérone est nécessaire au développement des testicules et à la différenciation des canaux de Wolf en épididyme, vésicules séminales et canaux déférents, alors que la DHT produite localement stimule le développement de la prostate ainsi que les organes génitaux externes, et inhibe le développement des mamelons. Ainsi, l'exposition à des antiandrogènes pendant la vie fœtale perturbe le développement androgéno-dépendant de l'appareil reproducteur mâle.

Des études ont montré que des rats mâles exposés *in utero* au flutamide développent certaines anomalies génitales à l'âge adulte caractéristiques telles que la cryptorchidie, l'atrophie de la prostate, la féminisation des organes génitaux externes, la rétention des mamelons, la diminution du poids des testicules, l'augmentation de l'incidence des hypospadias [560] ou encore une altération de la spermatogenèse [559, 561-566].

Une modification de l'expression des principales connexines dans l'épididyme caudal de rats exposés à de faibles doses de flutamide pendant la période néonatale, altère le bon fonctionnement des processus de maturation, transport et stockage spermatique [567, 568]. Des anomalies affectant les cellules germinales sont aussi observées chez le rat; elles seraient liées à une activation chronique de l'apoptose via une activation de caspases effectrices et de facteurs pro-apoptotiques, ainsi qu'une inhibition de facteurs anti-apoptotiques [569, 570][571, 572]. Cette apoptose touche spécifiquement les spermatocytes et les spermatides au sein des tubes séminifères en stades androgéno-dépendants VI-VIII [569, 572].

Le flutamide peut également altérer le fonctionnement des cellules de Sertoli lors de la spermiogenèse en altérant les jonctions spécialisées entre les cellules de Sertoli et les spermatides, ainsi que l'acrosome et le noyau des spermatides [573-575].

Il est intéressant de noter qu'une modification de la dose de flutamide ou du temps d'exposition va entrainer des effets plus ou moins délétères lors d'une exposition fœtale [576][577-579] suggérant l'importance de cette fenêtre d'exposition péri-natale dans le développement de pathologies à l'âge adulte. Ainsi des rats mâles exposés *in utero* au flutamide présentent des taux de testostérone, de FSH et LH normaux à l'âge adulte [580] alors qu'un traitement néonatal de rongeurs induit dans le testicule prépubère une augmentation du taux de testostérone intratesticulaire [581].

5-3- Effet d'une exposition adulte au flutamide:

Chez l'adulte par contre, les androgènes jouent un rôle important dans la croissance et le maintien des fonctions de l'appareil reproducteur. Le flutamide exerce une forte inhibition sur l'action de la testostérone au niveau des organes androgéno-dépendants, induisant une altération de la croissance de ces tissus

L'administration de flutamide à des rats mâles adultes engendre un dérèglement de la balance hormonale, par augmentation du niveau de LH et de testostérone [582] qui est accompagnée, chez le poisson zèbre, d'une diminution de la 11-kétotestostérone plasmatique [583]. Une diminution du poids des organes androgéno-dépendants et une hyperplasie des cellules de Leydig sont également observées [545, 546, 584]. Des études effectuées sur le rat adulte rapportent également l'effet du flutamide sur la spermatogenèse, où une dégénérescence des spermatocytes et une diminution du nombre de spermatides rondes et allongées sont observées [559].

L'exposition d'animaux adultes à des doses quasi comparables à celles utilisées *in utero* cause des effets similaires au niveau du testicule (apoptose des cellules germinales par exemple). Toutefois, alors qu'une exposition fœtale provoque une apoptose chronique des cellules germinales adultes, une exposition chez l'adulte provoque des altérations testiculaires réversibles après arrêt du traitement [585].

Enfin, certaines études ont montré que le flutamide est capable d'induire une modulation de l'expression de gènes androgéno-dépendants parmi lesquels les gènes codant le Cyp26a1 (intervient dans le catabolisme de l'acide retinoique) [583], Cyp11a1 (P450scc), la 3β-hydroxystéroïde déhydrogénase de type I (3βHSD), la protéine StAR, la lactose déhydrogénase-c et les sous-unités LHβ et FSHβ [585, 586]. Il agit aussi sur l'expression de protéines clés des jonction inter-cellulaires telles que la Connexine 43 (Cx43) ou c-Src, modulant ainsi la dissociation du complexe N-cadherine -- catenine et altérant le bon maintien de la barrière hémato-testiculaire [584, 587]. Le flutamide peut encore altérer la méiose dans la lignée germinale en agissant sur l'expression des gènes nanos1, dmc1 et sycp3[583].

6- Problématique des faibles doses:

La problématique des faibles doses a émergé dans les années cinquante, dans le cadre du suivi des victimes de la bombe nucléaire, où l'évaluation des risques réels encourus étaient difficilement évaluables. La Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) énonce alors qu'il est impossible de déterminer un seuil en deçà duquel une exposition à des radioéléments serait sans danger. Cette annonce entraine la notion de "relation linéaire sans seuil" dans le domaine de la radio-toxicologie d'où vont découler les notions de "seuil d'exposition" et de "doses maximales" en dessous desquels doivent se situer les industriels et autres manipulateurs de radioactivité. Ce modèle de relation dose/effet s'est rapidement étendu à de multiples secteurs [588]. Ainsi, dans le domaine de la toxicologie, les molécules sont testées en effet-dose sur des modèles animaux codifiés. Ces modèles permettent de définir la dose la plus faible où un effet adverse est observé (LOAEL) ainsi que la dose sans effet adverse observé (NOAEL) (fig.40)

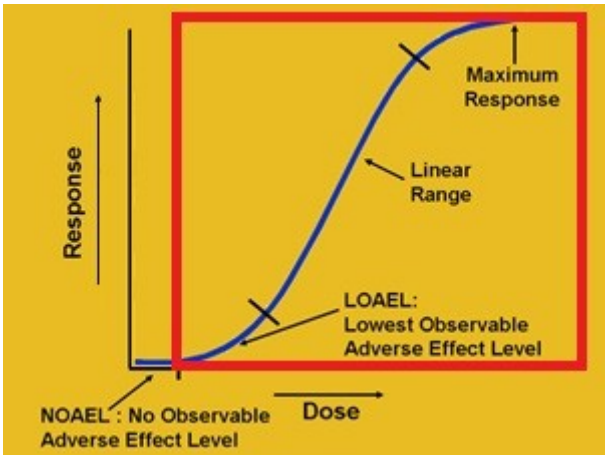


Figure 40: *Effet dose-réponse d'une molécule X. On y distingue la zone de toxicité (représentée par le cadre rouge), la LOAEL et la NOAEL.*

Depuis quelques années, les perturbateurs endocriniens ont contribué à redéfinir le cadre des raisonnements avec la remise en question de la centralité de la dose au profit des vulnérabilités individuelles, des mélanges des substances, ou encore de la durée d'exposition [589, 590]. En effet, dans le domaine des PEs, il est possible d'observer des effets à faibles

doses supérieurs à ceux induits à des doses plus élevées, ou d'observer une atténuation, voire une disparation des effets à fortes doses. La question de la prise en compte de ce type d'effets pour une évaluation de risque chez l'Homme reste toutefois posée et soumise à débat.

6-1- Qu'est ce qu'une faible dose de PE?

La notion de faible dose est difficile à définir. Une première définition épidémiologique définit une faible dose comme "une gamme de doses pour laquelle la mise en évidence épidémiologique est difficile" [588].

Plus récemment, en 2002, les faibles doses ont été définies comme étant des "modifications biologiques qui se produisent dans le cadre d'une exposition humaine ou à des doses plus faibles que celles habituellement utilisées dans le test standard de l'US EPA pour l'évaluation de la reprotoxicité ou la toxicité développementale d'une molécule" [589, 591, 592]. Chez les animaux, une exposition à de faibles doses d'une molécule X, correspondrait à une exposition à des doses qui produisent des concentrations sériques de cette molécule de l'ordre de ce qui est mesuré généralement dans la population humaine [592-594].

La NOAEL observée chez les animaux de laboratoire est utilisée pour définir une "dose tolérable pour une exposition humaine". Pour ce faire, la NOAEL est divisée par un facteur dix d'incertitude, tenant compte des différences de métabolisme, puis d'un autre facteur dix sensé prendre en considération les facteurs de susceptibilité comme la génétique ou la grossesse. Parfois, un autre facteur de deux ou cinq est pris en considération lors de l'évaluation d'autres facteurs de risque ou lorsqu'une toxicité vis à vis de l'enfant est évaluée. Mais en général, il a été défini qu'une "dose d'exposition sans danger" pour l'Homme est obtenu en divisant la NOAEL par mille.

L'estimation de l'exposition humaine réelle est plus compliquée à définir qu'il n'y parait. En effet, si l'on prend l'exemple, bien discuté, du BPA, la détermination d'une NOAEL de 5mg/kg/j a été établie par des études sur deux générations de souris. L'EFSA a alors défini une dose journalière admissible (DJA) pour l'homme de l'ordre de 50µg/kg/j. Cette estimation a été réévaluée complètement en 2015 pour la réduire à une seconde DJA temporaire de 4µg/kg/j en vue des nouvelles données, mais l'EFSA s'est engagé à réévaluer à nouveau cette

DJA en fonction de résultats d'une étude de deux ans menée par le programme toxicologique national Américain cette année [595].

Ce qu'il faut retenir de ces définitions de doses dites "sans effet", c'est qu'elles partent du principe que l'effet de la molécule définit une courbe à allure dite "monotone" qui admet l'existence d'une dose seuil, en dessous de laquelle aucun effet adverse n'est constaté.
Deux questions restent toutefois ouvertes:

1- Les LOAEL et NOAEL sont elles les mêmes chez les adultes et les organismes en développement (fœtus, nouveau né, enfant)?

2- Parallèlement au développement des outils moléculaires, les NOAEL déterminées à partir de d'analyses moléculaires ou à partir de données classiques sont-elles les mêmes? [586, 596-598]. Il semblerait que pour certaines molécules antiandrogéniques, comme le flutamide, les deux approches histopathologique et moléculaire donnent des NOAELs similaires [586].

6-2- Courbes monotone *versus* non monotone des effets des PEs

L'évaluation de la sécurité des produits chimiques pour l'Homme repose sur la détermination de la NOAEL dans les études de toxicité chez les animaux de laboratoire. Ce processus admet l'existence d'une dose seuil, en dessous de laquelle aucun effet adverse n'est constaté; dans ce cas, la courbe dose-réponse présente une allure dite "monotone" (fig. 41).

Au sein de la communauté scientifique les effets d'une exposition aux faibles doses de PEs fait largement débat. Certains clament que la plupart, si ce n'est tous les PEs, ont des effets à faibles doses et que les courbes effet-dose à allure non-monotone sont très courantes après une exposition aux PEs ou aux hormones, et ce, que ce soit dans un modèle cellulaire, animal ou chez l'Homme [589, 594, 599]. Ainsi les effets adverses d'une exposition à de telles molécules seraient sous-estimés. Il est à noter que les études qui identifient des effets non monotones testent généralement plus de doses que celles qui identifient des effets monotones [600, 601]. D'autres scientifiques, estiment que les exemples données par les précédents ne sont pas relevants, reproductibles ou réellement transposables à toutes les espèces ou que les doses testées précédemment sont trop faibles pour conclure [602]; les données demeurent souvent insuffisantes et les mécanismes moléculaires reportés pour les faibles doses n'est souvent pas clair [591].

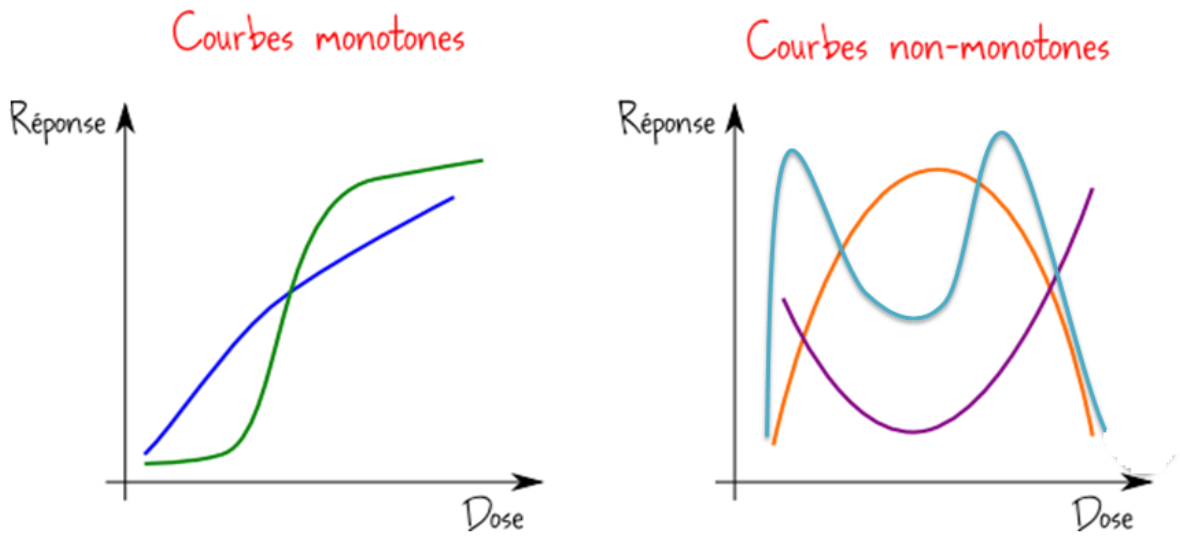


Figure 41: *Principales courbes dose-réponse à allure monotone ou non monotone*

Toutefois, des effets adverses avérés à des doses bien inférieures à celles traditionnellement étudiées par les toxicologues ont été rapportés dans la littérature et confirmés par le Danish Centre on Endocrine Disrupters (DCED) en 2013 [603] mais font encore l'objet de controverses [589, 604]. En effet, une part de la communauté scientifique et industrielle estime que les effets observés à faible doses, même s'ils sont reproductibles et présentent des courbes dose-réponse aux allures non monotones, n'empêchent pas de supposer l'existence d'un seuil qui serait seulement rendu inobservable car situé en-deçà de la capacité de détection des outils analytiques [588, 602]. Le DCED préfère ainsi évoquer des limites intrinsèques de détection des tests en cas de différences non significatives, lors d'exposition aux faibles doses, ainsi que de comportement à seuil plutôt que de l'existence de seuil de toxicité [603].

Les débats ayant lieu entre la communauté scientifique et les industriels autour des effets à faibles doses et des relations doses-réponses non monotones illustrent la remise en cause, plus générale, du principe de Paracelse selon lequel "la dose fait le poison" et augmentent la complexité de l'évaluation des risques sanitaires. Il ressort des nombreux débats menés par l'ANSES que si l'allure non-monotone d'une molécule est retenue, elle est très souvent ignorée [601, 605, 606], il faut que ce résultat soit confirmé plusieurs fois afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'un phénomène réel [602].

Dans sa revue [607], Z. Xu propose que cet aspect non monotone des courbes doses-réponses pourrait être dû à des mécanismes différents aux faibles doses par rapport aux fortes doses (liaison à plusieurs facteurs de transcriptions pouvant mitiger les effets à forte dose par rapport aux faibles doses; effet agoniste ou antagoniste ou encore des effets métaboliques différents en fonction de la dose de PE). Un phénomène de co-exposition à diverses faibles doses de différents PE peuvent de même engendrer des effets différents en fonction de la dose.

6-3- Effets potentiels d'une exposition à de faibles doses de PEs sur la fonction de reproduction:

Le corps de la femme enceinte contient, dans 99 à 100% des cas, des traces de plusieurs PEs (phtalates, phénols, perchlorates...) prouvant ainsi que l'Homme est exposé dès sa vie intra-utérine à une multitude de PEs [608, 609]. Nombreuses études épidémiologiques ou toxicologiques se sont intéressées aux effets potentiels d'une exposition à de faibles doses de PEs. Quelques unes ont porté sur l'effet des faibles doses de PEs sur la fonction de reproduction dont une grande majorité a porté sur le BPA étant donné les incertitudes relevées par la communauté scientifique sur certains résultats.

Le tableau suivant résume certaines des principales études menées les 20 dernières années sur les effets d'une exposition à des faibles doses de PEs sur la fonction de reproduction de diverses espèces (Tableau 12). Il en ressort trois observations majeures:

1- Les effets des faibles doses de PEs existent dans la littérature; ils sont montrés avec diverses molécules, divers temps d'exposition et diverses espèces.

2- Les effets des faibles doses sont plus importants après une exposition fœtale ou périnatale qu'après une exposition à l'âge adulte.

3- Il existe des réponses différentes inter-espèces, comme le montre l'étude de N'Tumba-Byn et *al.* en 2002. Ces différences soulèvent des inquiétudes sur l'extrapolation, des données relatives à la thématique sensible des faibles doses, des rongeurs à l'homme [610].

Année	Molécule	Doses testées	Espèce	Durée de traitement	Fenêtre d'exposition	Effets observés	Référence
1997	BPA	2µg/kg/j	Souris	GD11 à GD17	Fœtale	Diminution du poids corporel et épididymaire Augmentation du poids des glandes préputiales et de la prostate	[611]
1999	Génistéine	3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100mg/kg/j	Rats	GD14 à PND3	Périnatale	Augmentation du poids de la prostate à l'âge adulte et rétention aréolaire à l'âge adulte	[612]
2000	BPA Octylphenol DES	100µg/kg/j 500µg/kg/j 5µg/kg/j	Rats	5j	Néonatale	Hyperprolactinémie à 30j et augmentation de l'expression de ERα et ERß dans la glande pituitaire Diminution de l'expression de ERα dans l'utérus et de ERß dans la prostate	[613]
2003	BPA	0,2 - 2-20µg/kg/j	Rats	45j	Adultes	Diminution du poids des testicules, épididymes Réduction du nombre et de la viabilité des spermatozoïdes	[614]
2003	Flutamide	0,4 - 2 mg/kg/j	Rats	15- 16j	Fœtale	Augmentation de l'apoptose des cellules germinales adulte (par augmentation de l'expression des caspases 3 et 6)	[569]
2004	Flutamide	0,4 - 2 mg/kg/j	Rats	11- 12j	Fœtale	Altération de la balances des protéines pro et anti-apoptotiques dans les cellules germinales de rats adultes	[570]
2005	Tamoxifen	0,12 - 0.6 - 3 µg/kg/j	Rats	GD6 à PND21	Périnatale	Retard de l'âge de la séparation balano-préputiale	[615]
2007	BPA	250 ng/kg/j	Souris	GD8 à PND2	Périnatale	Altération du développement des glandes mammaires et augmentation de leurs sensibilité à l'E2 à l'âge adulte	[616]
2012	BPA	0 - 0,005 - 0,5 - 50 - 500 µg/kg/j	Rats	45j	Adulte	Diminution du taux plasmatique de testostérone, insuline, enzymes de la stéroïdogenèse Anomalies du testicule Défauts de différentiation et de maturation des spermatozoïdes	[617]
2012	BPA	1pM et 10µM	Homme, rats et souris	6,5 à 10,5 SG	Fœtale	Altération de la sécrétion de la testostérone et INSL3	[618]

	DES	1 - 10 µM	(culture ex vivo de cellules de Leydig)	14,5 et 12,5 DPC (rat et souris)		Diminution de la sécrétion de testostérone que chez les rongeurs	
2014	Atrazine	1 - 13,5µg/l	Poisson d'eau douce	4j	Fœtale	Altération du comportement combatif sexuel par diminution du taux de testostérone	[619]
2014	Phtalates (DBP)	1 - 10 - 50 - 200 - 400 mg/kg/j	Cailles	30j	Pré-puberté	Altération de l'expression de P450scc et 3ßHSD	[620]
2014	Mercure	0,07µg/kg/j	Rats	30j	Adulte	Diminution du compte spermatique, augmentation de la tétraspermie et diminution des taux testiculaires de LH	[621]
2014	Mercure	4,6	Rats	60j	Adulte	Altération de la qualité spermatique et dérèglement des balances hormonales	[622]
2016	BPA	25 - 250 µg, 5 - 50 mg/kg/j	Rats	GD6 à PND22	Périnatale	Diminution du compte spermatique à la plus faible dose uniquement Masculinisation de l'appréhension spatiale des femelles à 25µg/kg/j	[623]
2017	BPA	20 - 200 µg/kg/j	Rats	60j (PND36 à 66)	Pré-puberté	Altération du développement des tubes séminifères Altération de la morphologie et du nombre des spermatozoïdes	[624]
2017	Phtalates (mélange)	0,267 - 2,67 - 26,7 mg/kg/j	Rats	15 semaines	Pré-puberté & adulte	Altération de la spermatogenèse par induction de l'apoptose des cellules germinales Arrêt de la progression du cycle cellulaire	[625]
2017	DEHP	5 µg/kg/j	Souris	GD1 à PND10	Périnatale	Modification du comportement social, Augmentation de l'anxiété, Diminution du poids total et de la distance ano-génitale allant de la F1 jusqu'à la F3	[626]

Tableau 12: Effets recensés dans la littérature depuis 20ans des effets de certains PEs sur la fonction de reproduction

(GD: jour de gestation; PND: jour après la mise bas; SG: semaine de gestation; DPC: jour post coïtum)
Néonatale= exposition débute à PND1; Périnatale=exposition fœtale + néonatale; Pré-puberté=exposition débute juste avant la puberté estimée entre 39 et 47j chez le rat par exemple.

Plusieurs comités scientifiques et toxicologues se sont réunis durant ces vingt dernières années et ont rédigé des rapports dont les buts sont d'analyser toutes ces études, de juger de leur robustesse et de voir *in fine*, s'il est nécessaire ou pas de revoir les lignes directives déjà en place pour les études de toxicologie de la reproduction et du développement. C'est notamment le cas du rapport de l'US-NTP (Programme National de Toxicologie des Etats Unis) paru en 2001 [591], des revues de l'US-EPA (United States-Environmental Protection Agency) [627] et du DCED (Danish Center for Endocrine Disrupters) [628] ou encore de la revue de l'AEP (Agence de Protection de l'Environnement) en 2014 [629]. Ces quatre rapports concluent tous par le fait que les effets des faibles doses de PEs sur les animaux existent notamment quant à l'exposition durant la fenêtre critique du développement. Ils pointent néanmoins, le manque de reproductibilité des résultats expérimentaux retenus comme robustes et des preuves avancées pour dire que les effets clés précoces observés aux faibles doses soient réellement prédictifs d'effets adverses transposables à l'Homme.

Ces comités suggèrent aussi la nécessité de revoir les principales lignes directives des études de toxicologie de la reproduction et du développement en:

(1) élargissant les gammes de doses testées, en choisissant des doses plus faibles encore et en effectuant une étude toxico-cinétique préalable aux choix de ces doses,

(2) en prenant un soin très particulier non seulement aux choix des doses, mais aussi des espèces, des fenêtres d'exposition (essentiellement l'exposition péri-natale qui ressort comme la plus vulnérable) et des molécules (ils recommandent entre autre les phtalates, le kétoconazole, le paracétamole et les antiandrogènes tels que le prochloraz ou le flutamide)

(3) et d'élargir les paramètres étudiés en allant des analyses morphologiques macroscopiques, aux analyses transcriptomiques en passant par les analyses cellulaires (prolifération, apoptose...)

Nous avons essayé de prendre en considération toutes ces recommandations lors du choix de nos modèles expérimentaux qui sera détaillé dans le chapitre suivant.

MATERIELS ET METHODES

1- Rationnel pour le choix d'un modèle d'étude des effets des PEs:

Les données obtenues sur les effets des PEs sont issues de différentes études: épidémiologiques, expérimentales, *in vivo* ou *in vitro*. Chaque type d'étude apporte des informations différentes pouvant se recouper. Les études épidémiologiques étant les données les plus pertinentes pour les effets sur l'homme mais il est difficile de contrôler strictement l'exposition [630]. La mise en place de cohortes ces dernières années où les individus sont suivis dès la grossesse apporteront certainement des données très intéressantes sur les effets à long terme des PEs. C'est le cas par exemple la cohorte ELFE (Etude Longitudinale Française dès l'Enfance) qui permet d'évaluer l'exposition de plus de 4000 femmes à divers PEs environnementaux durant leur grossesse [631, 632]. Les modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* permettent d'évaluer spécifiquement l'effet d'une molécule ou d'un mélange de molécules et d'étudier finement les mécanismes d'action; ils posent toutefois la question de l'extrapolation à l'homme, notamment pour des expositions à de faibles concentrations.

1-1- Pourquoi le modèle *in vivo* plutôt que le modèle *in vitro*?

Si les tests *in vitro*, sont rapides, facilement reproductibles et sont relativement économiques, ils ne permettent cependant d'obtenir que certaines informations limitées et présentent plusieurs défauts. En effet,

- ils est impossible de stimuler *in vitro* des systèmes endocriniens entiers ni d'analyser les interactions intercellulaires qui existent dans un tissu vivant
- ils ne prennent pas en considération les interactions métaboliques qui existent dans un organisme *in vivo*
- ils ne permettent pas de répondre aux conséquences toxiques de l'exposition à une molécule sur l'organisme entier
- ils ne permettent pas d'étudier l'effet d'une exposition sur une condition donnée (pas d'espace spatio-temporel)

Dès lors, l'utilisation d'un modèle *in vivo* semble la plus adéquate pour étudier la réponse d'un organisme à une exposition à un PE. Elle nous permet en plus d'étudier l'effet de

l'exposition à cette substance à différents moment de la vie (exposition intra-utérine *vs* à l'âge adulte).

1-2- Recommandations de l'OCDE pour les modèles *in vivo* dans l'exploration des effets chimiques sur la reproduction:

Différentes procédures OCDE ont été établies pour tester les molécules chimiques Nous avons listé dans le tableau suivant les protocoles les plus pertinents par rapport à l'exploration des effets d'une substance de type PE sur l'organisme.

Les objectifs de ces test sont (1) d'identifier le ou les organe(s) cible(s) et les effets adverses, (2) d'apporter des informations sur le choix des doses pour les études subchroniques et chroniques et (3) de participer à la détermination d'une dose sans effet (NOAEL) et de la dose la plus faible où un effet adverse est observé (LOAEL) [633].
Ce qu'il ressort néanmoins de ces recommandations, est que malgré les relectures et les modifications qui y sont apportées, et même si certaines prennent en compte la période péri-conceptionnelle (essais 414, 415, 416, 421 et 422), aucune ne fait d'observation de la descendance mâle adulte ni d'analyses cellulaires et moléculaires de la spermatogenèse.

Etant donné la spécificité des antiandrogènes (par rapport au développement du tractus génital mâle) et sur la base de travaux antérieurs du laboratoire [569], nous avons choisi d'étudier les effets d'une exposition ***in utero*** sur les fonctions testiculaires adultes. Pour ce faire, nous avons développé un modèle expérimental d'exposition *in utero* de **11 jours** (du **10ème** au **21ème jour de gestation**). Cette période correspond à la fenêtre de vulnérabilité aux antiandrogènes. Cette exposition fœtale est ensuite comparée à un second modèle d'exposition de même durée (11 jours) survenant uniquement chez le rat mâle **adulte** sexuellement mature (exposition du **66ème** au **76ème** jour). Ces modèles expérimentaux seront développés dans les chapitres suivants.

N°	Titre	Durée d'exposition	fenêtre d'exposition	Age de sacrifice	Procédure	Buts	Référence
407	Toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs	28j	Adulte	à la fin du traitement	Administration par voie orale sur rats sexuellement matures	Identification des organes cibles, effets adverses et NOAEL	[546]
408 & 409	Toxicité orale à doses répétées (rongeurs/non rongeurs) : 90 jours	90j	Pré-pubère (juste après le sevrage et avant 9 semaines)	à la fin du traitement	Administration par voie orale prolongée sur rats sexuellement immatures jusqu'à l'âge adulte	Identification des risques liées à une exposition longue	[634] et [635]
414	Etude de la toxicité pour le développement prénatal	16j	Gestationnel (GD5 à GD20)	la veille de la mise bas	Administration par voie orale	Information générales sur les effets d'une exposition prénatale sur la femelle gestante et les organismes en développement	[636]
415	Etude de toxicité pour la reproduction sur une génération	>70j chez le mêle et >15j chez la femelle et arrêt après accouplement	Adulte	4 et7 j pour la F1	Administration quotidienne avant accouplement sur minimum 70j pour les mâles et 3 semaines pour les femelles Les petits sont sacrifiés à 4 et 7j	Etude des effets sur la performance de reproduction	[637]
416	Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations	>70j chez le mêle et >15semaines chez la femelle et arrêt après accouplement	Pré-pubère et adulte	après le sevrage pour la F2 et dès lors qu'ils ne sont plus utiles pour les P et F1	Administration quotidienne avant accouplement sur minimum 70j pour les mâles et 3 semaines pour les femelles	Effets d'une substance d'essai sur l'intégrité et la performance des systèmes reproducteurs mâle et femelle, et sur la croissance et le développement de la progéniture.	[638]
421	Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement	>28j pour les mâles et 63j pour la femelle	Adulte	PND13	Administration quotidienne: 14j(femelle) et 70j(mâle) avant accouplement + 14j maximum pour l'accouplement + 22j de gestation +13j de lactation	Effets d'un produit chimique d'essai sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle	[639]

422	Etude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement	28j pour les mâles et 54j pour la femelle	Adulte	PND4 + PND13	Administration quotidienne: 54j(femelle) et 70j(mâle) avant accouplement + 14j maximum pour l'accouplement + 22j de gestation +13j de lactation	Information sur les effets adverses et des effets (notamment des PEs) durant la période prénatale et naissance	[640]
426	Etude de neurotoxicité du développement	GD6 à PND21	Fœtale et périnatale	PND22 et PND70	Administration quotidienne par voie orale des femelles gestantes et allaitantes	Effets de l'exposition répétée à une substance pendant le développement dans l'utérus, et la phase post-natale précoce	[641]
451	Etudes de cancérogénèse	à partir du sevrage et avant 8 semaines	Pré-pubère, adulte et adulte vieillissant	24 mois	Administration quotidienne essentiellement par voie orale de rats mâles ou femelles	Identification des propriété cancérogènes et des risques néoplasmiques, des organes cibles. Identification de la NOAEL	[642]
452	Etudes de toxicité chronique	à partir du sevrage et avant 8 semaines	Adulte	12 mois	Administration quotidienne essentiellement par voie orale de rats	Identification de la toxicité chronique d'une substance et des organes cibles. Identification de la NOAEL	[643]

Tableau 13: *Principaux protocoles de l'OCDE envisagés pour l'étude des effets d'une substance sur la fonction reproductive*

1-3- Choix de la souche Sprague Dawley:

Les rats de la souche Sprague-Dawley (SD) utilisée dans le cadre de ma thèse sont des rats dits "outbred", c'est-à-dire qu'il s'agit d'une race génétiquement non homogène. Ce caractère est essentiel car il permet de détecter des sensibilités individuelles qui ne pourraient pas être observées sur des lignée "pures" génétiquement homogènes. Dans le cadre des études toxicologiques, le choix se porte donc sur des souches "outbred" de race SD ou Wistar Han (WH).

Les rats SD permet d'assurer une certaine homogénéité de poids et de taille à un âge donné, ce qui permet de diminuer les variations. Le choix de cette race est confirmé par les protocoles de l'OCDE et du programme toxicologique national (PTN) du département US des services de la santé et de l'homme. En effet, des études menées par le PTN ont montré que les rattes WH présentent une portée plus réduite que les SD avec un sex ratio asymétrique [644, 645]. Ceci peut fausser les résultats d'études portant par exemple sur l'effet d'une molécule sur la fonction de reproduction. C'est pourquoi, plusieurs protocoles portant sur la fonction de reproduction ont été réalisées sur des rats SD [646, 647]. Selon la littérature et les caractéristiques décrites de chaque souche, il semble que les rats SD développent naturellement moins de cryptorchidie que les WH [648]; ce qui fait que les SD ont plus souvent été utilisés dans les études portant sur le testicule [649-651] ou plus spécifiquement sur l'effet d'une exposition aux PEs sur le testicule [652-654].

Afin de limiter au maximum les artefacts, dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi d'utiliser la souche **Sprague Dawley** plutôt que la Wistar Han.

1-4- Choix du perturbateur endocrinien antiandrogénique: le Flutamide:

Le flutamide est un antiandrogéne synthétique non stéroïdien standard. De part son activité antagoniste, il est utilisé (1) chez l'homme à indication thérapeutique dans le cancer de la prostate par exemple, (2) comme substance de référence dans les tests toxicologiques de perturbation endocrinienne et (3) comme standard de bioactivité pour doser une pollution

environnementale par un mélange de PEs à activité antiandrogénique (voir chapitre PE précédant). Par ailleurs, nombreuses données sont disponibles dans la littérature quant au mécanisme d'action et des effets du flutamide. Ceci a justifié le choix de cette molécule dans notre étude.

2- Modèle d'exposition *in utero* au flutamide:

Des femelles gestantes ont été commandées chez Janvier Labs et reçues au cinquième jour de gestation (GD5). Elles ont été mise une par cage et ont été acclimatée pendant quatre jours. A partir de GD10 et jusqu'à GD21, les rattes gestantes ont été gavées quotidiennement, à heure régulière, par le même manipulateur avec des différentes doses de flutamide (fig. 42) à raison de 5 femelles minimum par condition. La période d'exposition de GD10 à GD21 choisie recouvre la période de morphogenèse testiculaire et la majeure partie du développement gubernaculaire [655, 656].



Figure 42: *Modèle expérimental d'exposition in utero au Flutamide*

Le Flutamide (F9397, Sigma-Aldrich) a été mis en suspension dans de la methylcellulose (274429, Sigma-Aldrich) et des dilutions sérielles ont été effectuées.

Les différentes conditions utilisées sont:

-10 mg de Flutamide/ kg/ jour (dose connue pour induire des effets adverses sur le testicule)

-1 mg de Flutamide/ kg/ jour (NOAEL: dose à partir de laquelle aucun effet adverse n'est observé)

-0.1 mg de Flutamide/ kg/ jour (NOAEL/10)

- 0.01 mg de Flutamide/ kg/ jour (NOAEL /100)

- 0.001 mg de Flutamide/ kg/ jour (NOAEL/1000)

- Contrôle, 0 mg de Flutamide/ kg/ jour

Après contrôle des mises bas, la descendance est comptée. Un sexage est effectué à J2 et le sevrage à J21. Les descendants mâles sont alors répartis à raison de deux par cage et au total de vingt rats par condition. Les rats seront sacrifiés à onze semaines (77Jours).

3- Modèle d'exposition adulte au flutamide avec ou sans période de récupération:

Des rats mâles ont été commandées chez Janvier Labs et reçus âgés de 60j; les rats sont mis deux par cage et acclimatés pendant six jours. A partir de J66 et jusqu'à J76, les rats ont été gavées quotidiennement, à heure régulière, par le même manipulateur avec les mêmes conditions que citées précédemment (fig. 43).

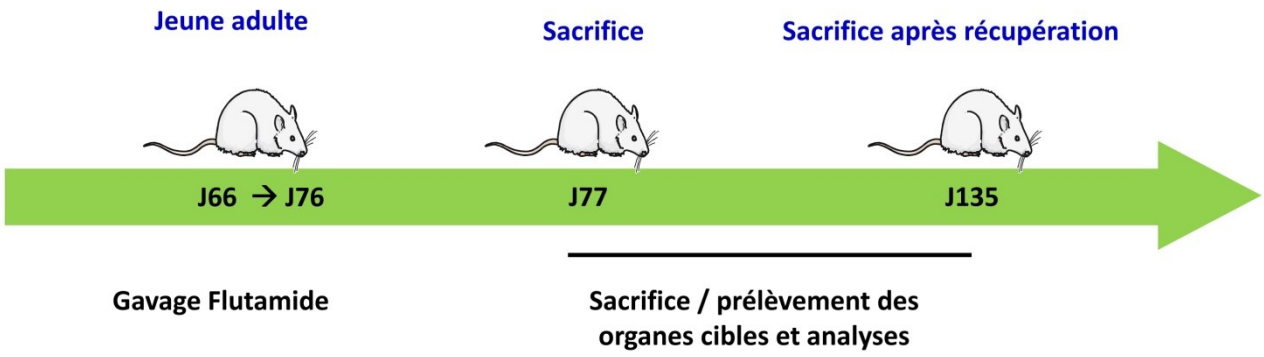


Figure 43: *Modèle expérimental d'exposition à l'âge adulte au Flutamide avec et sans période de récupération.*

Seize rats par condition seront sacrifiés à J77 afin d'étudier l'effet direct d'une exposition à l'âge adulte au flutamide. Et afin de voir si l'effet du flutamide est réversible après une exposition adulte, seize autres rats par condition seront conservés sans aucune manipulation pendant deux mois (deux cycles de spermatogenèse murine), puis ils seront sacrifiés.

4- Prélèvements:

Les observations cliniques et le poids corporel ont été enregistrés quotidiennement afin d'ajuster les volumes gavés. Vingt-quatre heures après la dernière administration, les animaux ont été pesés puis sacrifiés par inhalation de CO_2. Afin d'entreprendre à la fois des analyses histologiques et moléculaires sur les différents organes d'intérêt, ceux-ci ont été prélevés comme suit (tableau 14). Un soin particulier a été porté aux prélèvements de vésicules séminales afin d'éviter de les percer et de fausser les résultats de pesée.

Prélèvement	Analyses
Sang	Extraction du plasma, puis congélation pour éventuels dosages hormonaux et de miARNs
Testicules	Pesée puis congélation du testicule droit pour analyses moléculaires et fixation du testicule gauche en paraformaldéhyde pour analyses histologiques
Vésicules séminales	Pesée
Epididymes	Congélation pour comptage des spermatozoïdes
Prostate ventrale	Pesée et congélation pour éventuels dosages moléculaires

Tableau 14: *Organes prélevés et analyses effectuées*

5- Principales techniques utilisées:

Pour identifier les phénotypes, nous avons eu recours à diverses techniques morphologiques, cytologiques, biochimiques et de biologie moléculaire:

(1) le comptage du nombre et de la viabilité des spermatozoïdes épididymaires avec le countess Automated Cell Counter (Life Technologies) (fig.44),

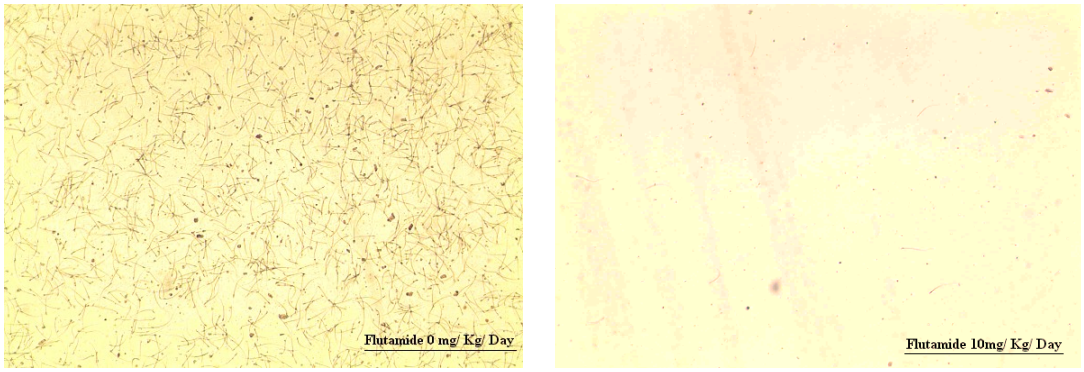


Figure 44: *Exemple de résultats obtenus pour un comptage de spermatozoïdes avec le compteur automatique de Life Technology aux doses extrèmes 0 et 10mg/kg/j de flutamide*

(2) l'analyse de la morphologie des tubes séminifères par observation de l'intégrité et de la structure des tubules après coloration Hématoxyline Eosine sur des coupes de 5µm. Nous avons aussi mesuré le diamètre des tubes (à raison de 100 tubules et 3 coupes par animal) avec le logiciel Image J (fig.45),

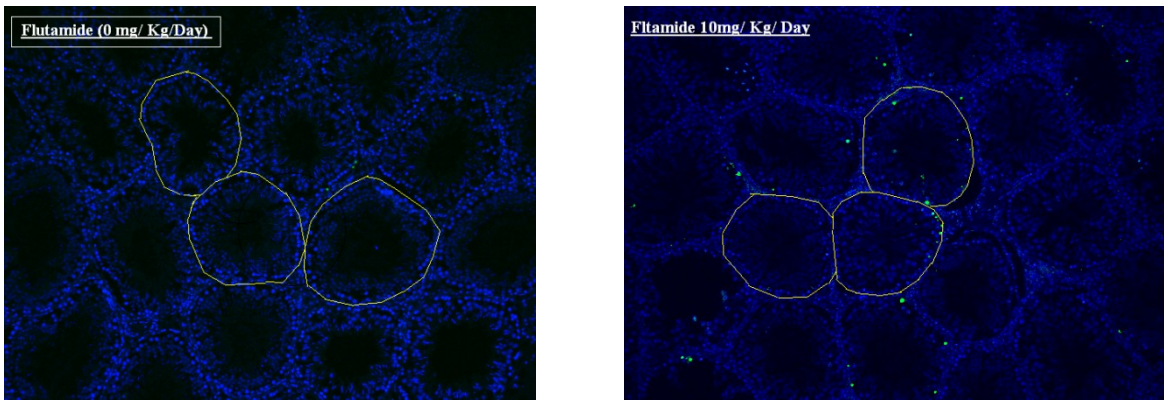


Figure 45*: Exemple de résultats obtenus pour une mesure du diamètre des tubules séminifères sur deux rats exposés aux doses 0 et 10 mg/kg/j de flutamide.*

(3) la quantification des cellules apoptotiques testiculaires par la détection de la fragmentation de l'ADN via la technique du TUNEL (le protocole a été décrit dans une précédente publication [154]),

(4) la visualisation *in situ* des différents marqueurs étudiés par immunofluorescence afin de localiser le type cellulaire concerné,

(5) l'extraction des protéines à partir du testicule par un tampon Tris SDS ou RIPA complet selon les protéines et leur quantification a été réalisée par western blot,
(6) l'extraction des ARNm et des miARNs à partir du tissus testiculaire par trizol (Invitrogen)/ chloroforme suivi d'une étape de purification sur colonnes du kit High Pure miRNA (Roche).
(7) la quantification des ARNs a été réalisée quant à elle par RT-qPCR
(8) sur le plan *in vivo*, la culture et la transfection de la lignée cellulaire de carcinome embryonnaire humain NCCIT par un siARN à 10mM par le kit RNAimax (Qiagen).

6- Analyses statistiques:

Les analyses statistiques ont été effectuée en collaboration avec les biostatisticiens du Département de Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI) de l'hôpital de Cimiez de Nice, en utilisant le logiciel SAS Entreprise Guide v 5.1 pour les marqueurs les plus relevants (qui montrent une modification de leur expression dès la plus faible dose testée), pour le reste des paramètres, le logiciel Graphpad Prism 5 a été utilisé.
Pour l'exposition *in utero*, le premier facteur analysé est un potentiel "effet portée" pouvant se traduire par un effet design. Cet effet portée est très variable selon le paramètre étudié mais de manière générale non significatif. De ce fait, les résultats observés dans la suite sont dus à la seule action du flutamide et ne sont pas du à l'effet d'une mère en particulier
Les analyses ont portées sur la comparaison de toutes les doses à la dose de référence (0). Lorsque les données suivent une loi normale (variances homogènes), une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test de Dunnett est effectuée. Il est a noter que nous avons comparé 3 corrections (Bonferoni, Tuckey et Dunnett) et avons opté pour celui qui semblait être le plus robuste par rapport aux effets aux faibles doses, à savoir la correction de Dunnett (voir tableau 13).
Lors de variances hétérogènes, les différences significatives ont été identifiées par un test de Kruskall-Wallis en y appliquant une correction avec la méthode du Step-down Bonferroni.

		Test de comparaison de colonnes suivi d'une anova + correction de Bonferoni					Test de comparaison de colonnes suivi d'une anova + correction de Tukey					Test de comparaison de colonnes suivi d'une anova + correction de Dunnett				
Dose of flutamide		0,001	0,01	0,1	1	10	0,001	0,01	0,1	1	10	0,001	0,01	0,1	1	10
Morphological Effects	Litter size															
	sex ratio															
	cryptorchidia															
	seminal vesicle weight															
	prostate weight															
	testis weight															
	sperm count															
	sperm viability															
	seminiferous tubule diameter															
Microscopical Effects	Tunel positive cells															
	XIAP protein level															
	Mcl1 protein level															
	Smac Diablo protein level															
	BAX protein level															
	CASP3 protein level															
	BCL2 mRNA level															
	XIAP mRNA level															
	Mcl1 mRNA level															
	Smac Diablo mRNA level															
	BAX mRNA level															
	CASP3 mRNA level															
	HSF1 protein level															
	HSF2 protein level															
	HSP70 protein level															
	HuR protein level															
	BAG6 protein level															
	HSF1 mRNA level															
	HSF2 mRNA level															
	HSP70 mRNA level															
	HuR mRNA level															
	BAG6 mRNA level															
	TDRD1 mRNA level															
	PiwiL2 mRNA level															
	Dnaja1 mRNA level															
	Spo11 mRNA level															
	Mov10l1 mRNA level															
Epigenetical Effects	Dnmt3A protein level															
	Dnmt3B protein level															
	Dnmt3A mRNA level															
	Dnmt3B mRNA level															
	Dnmt1 mRNA level															
	miRNA-29a level															
	miRNA-29b level															
	miRNA-29c level															
	miRNA-125 level															

Tableau 15: *Tableau comparatif des différentes corrections statistiques testées avant de choisir Dunnett*

Une case de couleur signifie la présence d'une modification significative par rapport au témoin avec le test et la correction correspondante. Une case blanche signifie l'absence de modifications significatives par rapport au témoin.

OBJECTIFS

Lors des dernières décennies, de nombreuses études ont mis en avant deux constats alarmants quant à la fonction reproductive masculine; d'une part l'existence dans l'environnement de nombreux xénobiotiques issus de pollutions industrielles capables de perturber le système hormonal (PEs) et d'autre part, l'altération drastique de la fonction de reproduction masculine avec une augmentation des pathologies du SDT. Si des études expérimentales existent sur l'effet de faibles doses de PEs œstrogéniques [607], il manque des données sur l'effet des faibles doses d'antiandrogènes, alors qu'ils représentent une contamination environnementale tout aussi importante.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié l'effet, sur le **testicule de rat adulte**, d'une exposition à de **faibles doses** d'une molécule à activité antiandrogénique: le **flutamide**. Pour cela, deux fenêtres d'exposition ont été analysées: une exposition ***in utero*** et une exposition à l'âge **adulte**.

Les objectifs principaux étant:

1- de mettre en place des modèles expérimentaux pouvant reproduire au plus près une exposition humaine fœtale ou adulte aux faibles doses d'un PE représentant la bioactivité antiandrogène environnementale [553];

2- de mettre en évidence l'absence/l'existence d'effet aux faibles doses (inférieurs à la NOAEL);

3- d'analyser les effets du flutamide sur les organes hormono-sensibles et plus précisément sur le testicule notamment quant à l'apoptose et la prolifération des cellules germinales;

4- d'identifier et de caractériser le(s) mécanisme(s) d'action mis en jeu par cette molécule, plus précisément, d'identifier des voies de signalisations du phénotype reliant les effets macroscopiques, cellulaires et moléculaires;

5- d'identifier s'il existe des mécanismes d'action de type épigénétique pouvant être à l'origine des altérations phénotypiques observées.

RÉSULTATS

1- Liste des publications:

Le travail effectué durant ma thèse a donné lieu à des publications soumises ou en préparation pour soumission:

- **Article n°1:** *(Soumis pour publication)*

Programming of adult male germ cell diseases after fetal exposure to low doses of anti-androgen.

L. INOUBLI, B. SIDDEEK, N. LAKHDARI, R. PAUL-BELLON, E. FONTAS, C. ROGER, C. MAUDUIT, M. BENAHMED

- **Article n°2: (Annexes 1)** *(Soumis pour publication)*

Neonatal programming of adult germ cell death disease after early exposure to an endocrine-disrupting compound: involvment of mirna-heat shoc response pathways.

N. LAKHDARI, B. SIDDEEK, L. INOUBLI, S.LATTES, R. PAUL-BELLON, V. ISNARD, E. THIBAULT, A. BONGAIN, D. CHEVALIER, A. GUY-DUCHE, N. KUZINER, E. REPETTO, M. TRABUCCI, M. URTIZBEREA, C. MAUDUIT, M. BENAHMED.

- **Article n°3:** *(En préparation)*

Effect of neonatal exposure to estradiol benzoate on spermatogonial proliferation and differentiation in rat testis

L. INOUBLI, B.SIDDEEK, R. PAUL-BELLON, C. MAUDUIT & M. BENAHMED

J'ai aussi eu l'occasion d'effectuer des travaux dans le cadre de collaborations, qui ont donné lieu à des articles publiés:

- **Article n°4:**

Developmental epigenetic programming of adult germ cell death diseases: Polycomb protein EZH2-miR-101. (2016)

B. SIDDEEK, N. LAKHDARI, L. INOUBLI, R. PAUL-BELLON, V. ISNARD, E. THIBAULT, A. BONGAIN, D. CHEVALIER, E. REPETTO, M. TRABUCCHI, J-F.

MICHIELS, C. YZYDORCZYK, U. SIMEONI, M. URTIZBEREA, C. MAUDUIT & M.BENAHMED.

Epigenomics. 8(11), p.1459-1479.

- **Article n°5 (revue bibliographique):**

MicroRNAs as potential biomarkers in diseases and toxicology. (2014)

B. SIDDEEK, L. INOUBLI, N. LAKHDARI, R. PAUL-BELLON, K.C. FUSSELL, S. SHNEIDER, C. MAUDUIT & M.BENAHMED.

Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. V.764-765, p.46-57.

- **Article n°6:**

Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of ABC transporter expression in testis. **(2013)**

F. KORAICHI, L. INOUBLI, N. LAKHDARI, L. MEUNIER, A. VEGA, C. MAUDUIT, M. BENAHMED, C. POUILLAC & S.LECOEUR.

Toxicology. V.310, p.29-38

- **Article n°7:**

Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and Mcl-1. (2012)

L. MEUNIER, B. SIDDEEK, A. VEGA, N. LAKHDARI, L. INOUBLI, G. LEMAIRE, C. MAUDUIT & M. BENAHMED.

Endocrinology. 153(4):1936-47

Ma thèse a été effectuée dans le cadre d'une collaboration CIFRE avec l'industriel BAYER CS. La thématique première posée étant les effets d'une exposition aux faibles doses d'un PE à activité antiandrogénique sur le fonctionnement du testicule, dans la suite de ce manuscrit, je ne vais discuter que les résultats issus du premier article.

2- Article: Programming of adult male germ cell diseases after fetal exposure to low doses of anti-androgen.

Programmation développementale de pathologies adultes des cellules germinales après une exposition fœtale à de faibles doses d'anti-androgènes.

- *Contexte et résumé de l'article:*

Les études épidémiologiques ont clairement démontré que l'exposition durant la vie péri-natale (*in utero*, néonatale) à des produits chimiques affectent le risque de développer plus tard dans la vie des pathologies chroniques. Parmi ces produits chimiques, les perturbateurs endocriniens (PEs) qui modifient le fonctionnement des hormones endogènes et particulièrement ceux ayant une activité antiandrogène, induisent des altérations durables du système reproducteur. A ce jour, les études démontrant l'action de PE antiandrogénique ont été effectuées avec de fortes doses alors que l'exposition humaine se produit plutôt sous forme d'un mélange de composés à faibles doses. Au sein de la communauté scientifique, ces effets font débats depuis le début des années 2000 [591]; certains scientifiques arguent que les effets aux faibles doses existent et pourraient même être différents que ceux observés aux fortes doses alors que pour d'autres, une molécule a par définition un seuil d'activité et produit un effet dose dit monotone [589, 601, 607, 657].

Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet-dose d'un antiandrogène non stéroïdien de référence dit "pur", le flutamide, couramment utilisé dans les tests toxicologiques. L'objectif de notre travail était de caractériser les effets à long terme des antiandrogènes sur le testicule de rat adulte. Nous avons ainsi développé un modèle expérimental composé de six groupes de vingt rats Sprague Dawley exposés *in utero* (du 10ème au 21ème jour de gestation) à différentes doses de flutamide: 10 mg/kg /j (LOAEL); 1mg/kg/j (NOAEL décrite [598]); 3 doses dites faibles de 0.1mg/kg/j (NOAEL/10); 0.01mg/kg/j (NOAEL/100); 0.001mg/kg/j (NOAEL/1000) et un groupe témoin.

Nous démontrons dans un premier temps que l'exposition fœtale au flutamide induit des altérations morphologiques chez le rat adulte avec (1) une augmentation de la prévalence des cryptorchidies unilatérales (dès la plus faible dose avec 15% des cas) et uni ou bilatérales à la plus forte dose (45% des animaux traités), mais aussi (2) une diminution du poids de la prostate ventrale et des vésicules séminales et (3) une diminution du compte spermatique et du diamètre des tubules séminifères à la dose la plus élevée (10 mg/kg/j). Au niveau cellulaire, une augmentation du nombre de cellules germinales apoptotiques est observée à partir de 1mg/kg/j de flutamide (NOAEL). Au niveau moléculaire, nous observons des effets à courbe non monotones selon les marqueurs et nous avons identifié une signature de l'exposition fœtale au flutamide dès la plus faible dose testée et qui se traduit par une diminution de l'expression de MCL1, BCL2, XIAP, HSPA2, ELAVL1 et MOV10L1 (protéines impliquées dans le processus d'apoptose des cellules germinales). Une régulation épigénétique via le miRNA-125a pourrait en être à l'origine.

Un schéma d'exposition de onze jours pendant l'âge adulte (jour 66 à 76) a aussi été effectué avec les mêmes doses de flutamide suivi ou pas d'une période de récupération de deux mois. Cette exposition entraine une induction dose-dépendante de l'apoptose des cellules germinales dès 1 mg/kg/ j mais ces effets ne sont plus observés 2 mois après la fin de l'exposition au flutamide.

En conclusion, nos données indiquent que l'exposition *in utero* au flutamide induit des effets qui sont (1) durables sur les fonctions testiculaires, ce qui compromet la fertilité et la fonction reproductrice du rat à l'âge adulte et (2) qui offrent une courbe effet-dose monotone et non monotone selon les marqueurs en regard des effets observés aux plus faibles doses. Ces résultats mettent en avant l'importance de la fenêtre d'exposition et la notion de programmation développementale d'une pathologie et suggèrent une signature des effets à faible dose du flutamide via le miRNA125a, ELAVL1, HSPA2, Mov10L1 et des effecteurs clés de l'apoptose (MCL1, BCL2 et XIAP).

PROGRAMMING OF ADULT MALE GERM CELL DISEASES AFTER FETAL EXPOSURE TO LOW DOSES OF ANTI-ANDROGEN.

Lilia INOUBLI[1, 2], Bénazir SIDDEEK[1, 2*], Nadjem LAKHDARI[1, 2], Rachel PAUL-BELLON[1, 2], Eric FONTAS[3], Coralie ROGER[3], Claire MAUDUIT[1, 4, 5], Mohamed BENAHMED[1, 2, 3].

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Team 5, Nice F-06204, France

[2]Université de Nice Sophia-Antipolis, Unité de Formation et de Recherche (UFR) Médecine, Nice F-06000, France

[3]Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Département de Recherche Clinique et d'Innovation, Nice F-06001

[4]Université Lyon 1, UFR Médecine Lyon Sud, Lyon F-69921, France,

[5]Hospices Civils de Lyon, Hopital Lyon Sud, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Pierre-Bénite F-69495, France,

*BS present address: Lausanne University Hospital CHUV and University of Lausanne, Division of Pediatrics and DOHaD, Rue du Bugnon 46, 1011, Lausanne, Switzerland

Corresponding author: Dr. Mohamed Benahmed, Inserm U1065, Team 5, Bâtiment Universitaire Archimed, C3M, 151 Route Saint-Antoine Ginestiere, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 3, France. Tel: (33) 4 89 06 42 66; Fax (33) 4 89 06 42 60 ; E-mail: mohamed.benahmed@unice.fr

Running title: anti-androgens male infertility programming

ABSTRACT

Epidemiological studies clearly demonstrated that early (fetal, neonatal) events such as nutritional imbalances or chemical exposures affect the risk of developing diseases later in life. Among the chemicals, the endocrine-disrupting chemicals (EDCs) modify endogenous hormones; especially anti-androgenic EDCs induce long lasting alterations in the reproductive system. To date, studies tested the anti-androgenic EDCs at high doses while human exposure occurs as a mixture of compounds at low doses. Since, anti-androgenic EDCs exposure is evaluated as flutamide equivalent quantity, we developed an experimental model of rats exposed in utero (gestational day 14 to 21) to different flutamide doses 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/kg/d) to evaluate the long lasting effects on testis functions. We demonstrate that fetal exposure to flutamide induces morphological alterations in the adult rat (decreased ventral prostate, seminal vesicle weights, sperm counts and seminiferous tubule diameter) at the highest (10m/kg/d) dose tested. The cellular testicular effects (increased apoptotic germ cell number) were observed from 1mg/kg/d flutamide. At molecular level, we identified a signature of fetal flutamide exposure from the lowest dose tested (0.001mg/kg/d) through decreased expression of MCL1, BCL2, XIAP, HSPA2, ELAVL1 and MOV10L1, proteins involved in germ cell apoptosis. An exposure scheme during adulthood (day 66 to 77) induced similar alterations at 1 and 10mg/kg/d but the effects were no longer observed 2 months after the end of flutamide exposure. In conclusion, our data indicate that fetal exposure to flutamide induces long lasting effects on testicular functions at low doses which compromises fertility.

KEYWORDS: Endocrine disruptors, low doses,0 anti-androgen, flutamide, developmental exposure, DOHaD, testis, male infertility

INTRODUCTION

The development period is plastic, some fetal chemical exposures undoubtedly demonstrate adverse effect on offspring such as thalidomide that induces phocomelia or fetal alcohol that induces lasting adverse effects [1]. Epidemiological studies have also clearly indicated that early (fetal, neonatal) events such as nutritional imbalances, chemical toxicant exposure affect the risk of developing diseases later in life. This field is now recognized as Developmental Origin of Health

and Disease (DOHaD). From industrial accidents [2-4] or occupational applications [5-7] an association has been observed in the offspring between diseases (particularly reproductive diseases) and exposure of the parents to large concentrations of EDCs. To date more than 1000 chemicals currently in commerce are characterized as endocrine-disrupting chemicals (EDCs) defined as “an exogenous chemical or mixture of chemicals that interferes with any aspect of hormone action” [8]. EDCs can alter the effects of the endogenous hormones thereby resulting in abnormal hormonal signaling and leading to altered hormone action [1]. EDCs belong to different categories of products such as insecticide, herbicides plasticizers, detergent, preservatives, personal care products and flame retardants [9]. In the male reproductive system, not surprisingly, EDCs with anti-androgen or estrogen-like activities are of major concerns. Experiments with animal models have confirmed the link between early EDCs exposure and male reproductive tract alterations at adulthood [10] and have established some mechanisms of actions [11] (for a review, see [12]. [13]). The anti-androgenic EDCs induced male reproductive tract alterations (cryptorchidism, hypospadia, male infertility) and animal experiments demonstrated the existence of critical windows of exposure (particularly fetal period) [10, 14]. Since organism in development is plastic, the doses of chemical toxicant and specifically EDCs that can affect its integrity may be different that adult ones [1]. It is noteworthy that most of the experimental studies reporting gross reproductive abnormalities in male offspring involved the administration of high doses of EDCs, while environmental human exposure to EDCs occurs at low doses from daily used products and food. Moreover, it seems that EDCs can have effects at low doses that are not predicted by high dose effects particularly in the field of reproduction [9]. In this context, the evaluation of EDC low doses effects on male offspring remains an open field.

To date the term “low doses” is widely used but no single standard definition has been set up. The low doses effects of EDC exposure have been defined as "doses that occur in the range of human exposure" or "effects observed at doses below those used for traditional toxicological studies" according to the National Toxicology Program panel of experts (for a review, [9]). Bio-monitoring studies revealed the presence of EDCs in human blood and urine and specifically, pregnant women

showed dozens of chemicals in their bodies (for a review, [15]). In this context, a major issue that must be addressed is whether the presence of EDCs at low doses would be harmful, specifically for offspring health [15].

In the present study, by using an experimental model of adult male rats exposed in utero to the anti androgen flutamide, we analyzed the effects of low doses for lasting adverse effects on reproductive tract. The dose-effect we used here is composed of LOAEL (10 mg/kg/d), NOAEL (1 mg/kg/d) and three 1:10 dilution of NOAEL (0.1; 0.01; 0.001 mg/kg/d) of flutamide.

MATERIAL AND METHODS

Animals. Animal experiments were carried out in accordance with EU legislation (Directive 2010/63/EU) and were approved by the local Animal Care and Use Committee. In a first protocol (No. 2012-28), pregnant Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were given by oral gavage methylcellulose (vehicle), 0.001, 0.01, 0.1, 1, or 10 mg of flutamide per kg and per day (adjusted daily based on body weight) from gestational day (GD) 10 to 21. Flutamide obtained from Sigma-Aldrich (L'Isle D'Abeau, France) was suspended in an aqueous solution of methylcellulose 400 (Fluka, Mulhouse, France) at 0.5% (wt/vol) and stored at 5°C (±3°C). At birth, each pup was sexed, male pups were weighed and female pups were killed by intraperitoneal injection of a pentobarbitone sodium solution. The male rats were then left with no treatment until postnatal day (PND) 77 when they were sacrificed by CO_2 inhalation. At least seventeen animals from three litters were used in each group. In a second protocol (No.2012-112), flutamide, at the same doses, was administrated by oral gavage to adult male rats from PND 66 to PND 76. Animals were euthanized at PND77 or left without treatment for 2 months and then euthanized (PND135).

Histology, immunohistochemistry, and in situ apoptosis detection. Testes were immediately fixed for 48 h in a 4% paraformaldehyde solution, dehydrated stepwise in graded ethanol baths, and embedded in paraffin. Blocs were cut into 5 µm-thick sections. Hematoxylin and eosin staining, immunohistochemistry, and TdT-mediated dUTP-X Nick End Labeling (TUNEL) approaches were performed on at least five animals per group as previously described [16]. Antibodies rose against DIABLO, HSPA2, HSF1, HSF2, BAG6 (Cell Signaling, St Quentin-en-Yvelines, France),

cleaved CASP3 (Abcam, Cambridge, MA), XIAP (BD Biosiences, Le Pont de Claix, France) and ELAVL1 (Sigma, L'Isle D'Abeau, France) were diluted at 1:100.

Western blotting analysis. Frozen testicular tissues were ground in liquid nitrogen to obtain a frozen powder. Aliquots (~20 mg) of powder were homogenized in RIPA buffer (150 mM NaCl, 2 mM Magnesium acetate, 20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 5% Glycerol, 0.5% NP-40, 2 mM DTT, Complete-mini® EDTA-free). Protein concentration was determined with the bicinchoninic acid assay. The experimental procedures were carried out as previously described (PMID: 18180314). Primary antibodies were diluted 1:1,000 except anti-ACTIN (1:20,000, Jackson's Laboratory, Bar Harbor, ME). Membranes were scanned with a Luminescent Image Analyzer 3000 CCD camera (Fujifilm, Dusseldorf, Germany) and quantified with MultiGauge software (Fujifilm).

Real-time quantitative PCR for mRNA expression. Total RNA were isolated from frozen testicular powder using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) coupled to an on-column purification and DNase treatment using a RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Complementary DNA was synthesized from 1 µg total RNA as described previously [154]. A 1:20 dilution of the reverse transcribed product was used for real-time PCR analyses with SYBR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described previously [154]. The sequences of the primers for qPCR are listed in Table 1. Gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, and data were normalized to *Actb* levels.

Gene name	**Forward**	**Reverse**
Actb	5'AGCCTCGCCTTTGCCG3'	5'CTGGTGCCTGGGGCG3'
Casp3:	5'TGTCGATGCAGCTAACC3'	5'GCAGTAGTCGCCTCTGA3'
Bcl2	5'GTGATGCAAGCTCCCACCAG3'	5'AGCGTCAACCGGGAGATGTC3'
Xiap	5' TCTTGACAGGCCGTCG3'	5' CCCCGTGTAGTAGAGTCC3'

Diablo	5’ATGACACTGTGTGCGGTTCC3’	5’CACCTCATCTTCCTCCTGGG3’
Bax	5’ATCCAGGATCGAGCAGGGCG3’	5’ACTCGCTCAGCTTCTTGGTG3’
Hsf1	5'CCCTGAAGAGTGAGGACATAA3'	5'GCTGGAGATGGAGCTGAGTA3'
Hsf2	5'TAAATGGCTCCTCCAACCTG3'	5'CCAACAGCTCAACCTTTCCTA3'
Hspa2	5'AGACGCAGACCTTCACTAC3'	5'TTTTGTCCTGCTCGCTAATC3'
Elavl1	5’ GGGTCCTCGTGGATCAGAC3’	5’ GGGGGTTTATGACCATTGAA3’

Statistics. Data were analyzed using SAS Enterprise guide v5.1 software (Brie Comte Robert, France). Values were presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) to account for variations among samples and animals within a dataset ANOVA (Analysis of Variance) for multiple comparisons was performed to determine whether there were significant differences between groups (p<0.05). For ANOVA, this was followed by the Dunnett post-hoc test if p<0.05, which determined the significance of differences between pairs of groups.

RESULTS

Adult phenotypic effects after in utero exposure to flutamide.

The in utero exposure to flutamide increased the number of cryptorchidism in adult animal (0, 15%, 16%, 16%, 5% and 45% for flutamide doses 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/kg/d, respectively). Since the persistence of the testis at the body (37°C) but not the scrotum (32°C) temperature may interfere with molecular expression, only the non-cryptorchid adult male rats were included in the present study (cryptorchid animals either unilateral or bilateral were excluded). The total number of rats studied was therefore 99. The *in utero* exposure to flutamide did not affect the body weight (Fig. 1A) and the relative testis weight (Fig. 1B) of the male offspring. By contrast, the

relative weight of the accessory glands was significantly decreased. Indeed, in utero exposure to flutamide decreased the seminal vesicle (32% decrease, $p<0.001$, Fig. 1C) and prostate (95% decrease, $p<0.001$, Fig. 1D) weights at 10 mg/kg/d. While the testis weight remained unmodified, we observed a decreased in sperm count (40% decrease, $p<0.001$, Fig. 1E), viability (30%, $p<0.01$, Fig. 1F) and in the seminiferous tubule diameter (20% decrease, $p<0.01$, Fig. 1G) at dose 10 mg/kg/d. These last effects were associated morphological alterations, i.e. abnormal spermatogenesis and Sertoli cell only seminiferous tubules at dose 10 mg/kg/d (Supp Data 1).

In utero exposure to flutamide induced an apoptotic phenotype in adult rat testes.

The germ cell loss occurring at 10 mg/kg/d was monitored by TUNEL assay and was preferentially localized in spermatocytes and/or spermatids germ cells (Supp Data 2). The number of apoptotic germ cells increased significantly at 1 (1.7-fold, $p<0.01$) and 10 (2.2-fold, $p<0.0001$) mg/kg/d of flutamide (Fig. 2A). The apoptotic process was also assessed by significant modifications in the expression of proteins involved in cell death. The pro-apoptotic molecules, cleaved CASP3 and DIABLO, were localized to spermatocytes and spermatids (the germ cells affected by programmed cell death) and the anti-apoptotic molecule XIAP was localized to the Sertoli supporting cells (Supp Data 3). In utero exposure to flutamide induced a decrease in (anti-apoptotic) MCL1 protein levels (28% decrease, $p<0.001$, Fig. 2C, D) at dose 1 and 10 mg/kg/d. This effect was associated with a significant decrease in its mRNA levels at each doses tested, except 1 mg/kg/d (Fig. 2B). The mRNA levels of *Bcl2* (58% decrease, $p<0.001$, Fig. 2E) and *Xiap* (46% decrease, $p<0.001$, Fig 2F) were also significantly decreased at each doses tested (except 0.1 mg/kg for *Xiap*). Conversely, the expression of pro-apoptotic molecules was increased. Indeed, cleaved CASP3 protein levels were significantly increased at 1 and 10 mg/kg/d of flutamide (1.4-fold, $p<0.001$, Fig. 3A) and at same doses for transcripts expression (1.8-fold, $p<0.001$, Fig. 3B). BAX protein (1.4-fold, $p<0.001$, Fig. 3C) and mRNA (1.5-fold, $p<0.001$, Fig.3D) levels were increased at 0.1 (except for mRNA); 1 and 10 mg/kg/d of flutamide. DIABLO protein (1.6-fold, $p<0.001$, Fig. 3E) and mRNA (1.3-

fold, p<0.01, Fig. 3F) expression was significantly increased at 0.001, 0.1 (except for mRNA), 1 and 10 mg/kg/d of flutamide.

In utero exposure to flutamide induced the Heat Shock Response (HSR) pathway in germ cells.

To characterize the signaling pathway involved in the long-term apoptosis of adult male germ cells, we evaluated the HSR pathway through its transcription factors HSF1 and HSF2 and its effector protein HSPA2. As reported previously, the HSR pathway alteration (HSF1 over expression, HSF2 or HSPA2 knockout, [265, 277, 287, 313, 670]) induced germ cell apoptosis and infertility [154, 265]. In utero exposure to flutamide induced in adult rat testes a significant increase in HSF1 protein levels at dose 0.001, 1 and 10 mg/kg/day (1.4-fold, p<0.001, Fig. 4A). This effect was associated with a decrease in HSF2 (29% decrease, p<0.01, 10 mg/kg/d, Fig. 4B) and HSPA2 (from the lowest dose 0.001 mg/kg/day, 60%decrease, p<0.001, Fig 4C) protein levels. Similar alterations were observed at mRNA levels for *Hsf1* (1 and 10 mg/kg/d, p<0.01, Fig. 4D) but not Hsf2 (Fig. 4E) or Hspa2 (Fig. 4F). The discrepancies between the decrease in HSPA2 protein expression and the absence of change in mRNA levels could account for the involvement of post-transcriptional regulators. In this context, it was reported that ELAVL1 (previously known as HuR) and BAG6 (previously known asScythe/Bat3) regulate the HSPA2 protein expression. BAG6, a co-chaperone protein of HSPA2, is involved in various developmental processes such as cellular stress and viability. *Bag6* deficiency accelerates the poly-ubiquitylation and subsequent degradation of HspA2 transcripts during spermatogenesis [318]. Immuno-staining localized BAG6 in male germ cells (Fig. 5A). In utero exposure to flutamide significantly decreased BAG6 protein levels (30% decrease, p<0.001, 10 mg/kg/d, Fig. 5B) but not its mRNA levels (Fig.5C). ELAVL1 is a key player in the post-transcriptional events for storing mRNA at post-meiotic stages of germ cells and was previously localized at spermatocytes level [321]. ELAVL1 conditional knockout induces male but not female infertility [321]. In addition, HSPA2 expression is dramatically decreased in ELAVL1 cKO testes, suggesting the involvement of the ELAVL1-HSPA2 pathway in the infertility of these mice [321]. After in utero exposure to flutamide, ELAVL1 protein (45% decrease,

p<0.001, Fig. 5D) and mRNA (25% decrease, p<0.05, Fig. 5E) levels were decreased at all doses except 0.01 for proteins.

To assess the long lasting alterations of HSF1 function in adult rats exposed in utero to flutamide, we next evaluated the mRNA of its targets. In utero exposure to flutamide did not modify the transcript levels of Tdrd1 (Fig. 6A), Piwil2 (Fig. 6B), Dnaja1 (Fig. 6C), but significantly decreased Sp011 levels (17% decrease, p<0.05, Fig 6D) at 1 and 10 mg/kg/day and Mov10l1 mRNA levels (30% decrease, p<0.001, Fig. 6E) at all doses tested.

Adult exposure to flutamide induces reversible alterations of the testis phenotype.

Adult exposure to flutamide during the same duration and with the same doses as in utero exposure did not changed the body (Fig. 7A) or the relative testis (Fig. 7B) or seminal vesicle (Fig. 7C) weight. Expectedly, the adult exposure induced a decreased the prostate (24% decrease, p<0.01, Fig. 7D) weight at the highest doses. The adult exposure did not modify the sperm viability (Fig. 7F) or the seminiferous tubule diameter (Fig. 7G), but decreased (24%, p<0.01, Fig. 7E) the sperm count. The adult exposure to flutamide induced germ cell death (at the level of spermatocytes and spermatids, Supp Data 4) at the highest dose (1.5-fold, p<0.001, Fig. 8A). The apoptotic process assessed by TUNEL was confirmed by an alteration of the balance between pro and anti apoptotic molecule expression. Adult exposure to flutamide induced an increase in pro-apoptotic molecules such as cleaved CASP3 protein (1.2-fold, p<0.05, Fig. 8B, C) and CASP3 mRNA (1.5-fold, p<0.01, Fig. 8D), *Diablo* protein (1.3-fold, p<0.01, Fig. 8E) and mRNA (1.5-fold, p<0.01, Fig. 8F) levels were increased, as well as BAX (Fig. 8G) protein levels, at the highest dose of flutamide. Conversely, the adult exposure to flutamide induced a decrease in the expression of anti-apoptotic molecules such as BCL2 at protein (33% decrease, p<0.001, Fig. 9A, E) and mRNA levels (45% decrease, p<0.001, Fig. 9B) and MCL-1 at protein (52% decrease, p<0.001, Fig. 9C, E) and mRNA (28% decrease, p<0.01,Fig. 9D) levels at 1 and 10 mg/kg/d and 10 mg/kg of flutamide for protein and mRNA expression, respectively. The alteration of the apoptotic process was also associated with a deregulation of the HSR pathway. Indeed, an increase in HSF1

protein (Fig. 10A) and mRNA (Fig. 10B) levels was observed. Similarly to the in utero exposure, adult treatment induced a decreased in HSF2 (Fig 10C) and HSPA2 protein levels (Fig. 10E) but no change in their mRNA expression (Fig. 10D, E). The post-transcriptional regulator of HSPA2 was also affected since we observed a decrease in BAG6 (27% decrease, $p<0.001$, Fig. 10G) but not mRNA levels (Fig. 10H). ELAVL1 expression was also decreased at protein (24% decrease, $p<0.01$, Fig. 11A) and mRNA (20% decrease, $p<0.05$, Fig. 11B) levels at the highest dose. The Hsf1 targets were also analyzed. The transcript expression for Dnaj1 (Fig. 11C), Dnmt3a (Fig. 11D), Piwil2 (Fig. 11F) and Tdrd1 (Fig. 11H) were unchanged. By contrast, adult exposure to flutamide induced a decrease in mRNA levels for Mov10l1 (30% decrease, $p<0.001$, Fig. 11E) and Spo11 (25% decrease, $p<0.05$, Fig. 11G).

We assessed the effect of flutamide after a 10-day exposure (a similar length to the in utero exposure) on testis function (Fig. 7-10). The further step was to evaluate if the alteration of testis function is a long-term effect. In this aim, a group of male rats exposed to flutamide were left without treatment for 2 months. Expectedly, the body (Fig. 12A) and testis (Fig. 12B) and seminal vesicle (Fig. 12C) weights were not modified as well as the sperm viability (Fig. 12F) and the seminiferous diameter (Fig. 12G). In contrast, two months after the exposure the phenotype was no longer observed since the decrease in prostate weight (Fig. 12D) and sperm count (Fig. 12E) was rescued. Similarly, the germ cell death phenotype was rescued since the number of apoptosis cells was no longer increased (Fig. 12H). At the molecular level, the effect of adult exposure to flutamide was also rescued since no modification was longer observed in the apoptotic pathway for the active CASP3 (Fig. 13A), CASP3 mRNA (Fig. 13B), BCL2 protein (Fig. 13C), Bcl2 mRNA (Fig. 13D), MCL-1 (Fig. 13E), Mcl-1 mRNA (Fig. 13F), XIAP protein (Fig. 13G), Xiap mRNA (Fig. 13H) and DIABLO (Fig. 13I). Similarly, the effects of adult exposure on the HSR pathway and targets were also rescued two months after the end of the treatment. Indeed, no modification was observed in the expression of HSF1 protein (Fig. 14A), Hsf1 mRNA (Fig. 14B), HSF2 protein (Fig. 14C), Hsf2 mRNA (Fig. 14D), HSPA2 protein (Fig. 14E), hspa2 mRNA (Fig. 14F), Elavl1 protein (Fig. 14G), Elavl1 mRNA (Fig. 14H), Bag6 mRNA (Fig. 15G) and BAG6 protein (Fig. 15H).

Two months after the arrest of the exposure to the anti-androgen, we no longer observed a modification in the transcript levels of Dnaja1 (Fig. 16A), Mov10L1 (Fig. 16B), PiwilL2 (Fig. 16C), Spo11 (Fig. 16D) and Tdrd1 (Fig. 16E).

DISCUSSION

EDCs may alter the homeostasis during the life span of an organism from the fetal period to adulthood. If EDC exposure occurs during developmental period the effects are often permanent, may lead to organ dysfunction and could have complex and hardly predictable life time consequences, especially they cannot be predicted from changes in hormone levels [12]. Besides industrial accidents or occupational application where humans can be exposed to high doses of EDCs, people are daily in contact to low doses of mixture of xenobiotics. In this context, it is more necessary than ever to better characterize the long-term effect of low EDC doses exposure during the developmental period. For the long lasting effects of EDC, the molecular changes often precede morphological consequences sometimes by weeks or years. As such, experimental studies showing that gene or protein expression changes in response to EDCs may be sentinels for disease propensity later in life.

While flutamide is not an environmental anti-androgen (as pesticides such as vinclozolin, prochloraz, procymidone, linuron, fenitrothion or plasticizers such as some phthalate esters), the study of its effects at low doses is relevant. Indeed, wastewater, surface water and sediment are complex matrices contaminated by mixtures of EDCs. The evaluation of this combined chemicals is based on hormonal bioassays expressed, for antiandrogenic activity, through flutamide equivalent concentration (FEQ) per liter of surface water or per gram of sediment [24]. For example, the Shijing River water contains from 103 to 935 µg/L FEQ that may represent a daily 15µg/kg exposure to anti-androgen mixture for a pregnant woman. In the present work, we investigated the lasting adult effects of flutamide at low doses, representing then the activity of mixture of EDCs. In this aim, we analyzed the LOAEL (10mg/kg.d), the NOAEL (1mg/kg.d), and three 1:10 dilution of NOAEL (0.1, 0.01 and 0.001 mg/kg.d, i.e. 100, 10 and 1µg/kg.d). As mentioned above, the dose range chosen in our study is relevant to potential human (fetal) exposure to anti-androgenic EDC combined exposure. None of the previous reports analyzed the low dose effects of flutamide since the doses used were over 1mg/kg.d making the novelty for the present study.

In utero exposure to flutamide LOAEL dose caused major developmental abnormalities of male reproductive tract when evaluated at adult age (PND 77). The

morphologically most dramatic effects were increased cryptorchid testis number, decreased seminal vesicle and prostate weight. The testes weight was unchanged unless we detected decreased sperm counts and seminiferous diameters. These data are in accordance with literature using similar experimental protocols, summarized in table 2 [25-27], [28-31]. including our [10]. The morphological effects described here with flutamide in addition with decreased anogenital distance and retained nipples reported previously (Table 2) are also observed with environmental anti-androgens such as phthalates (DBP, DEHP), vinclozolin, prochloraz, procymidone, linuron, conazole and ppDDE (for a revue see [32]). These morphological alterations, especially reduced anogenital distance (at birth or during puberty) and retained nipples are good markers of anti-androgen activities of EDCs to identify their LOAEL/NOAEL. These early observed alterations of male reproductive system may be predictive of testicular dysgenesis disorders such as low sperm counts or testicular cancer [27]. However, the morphological markers lack to give information on the mechanisms involved.

The morphological effects observed at LOAEL on male reproductive tract including testis are associated to alterations at cellular levels that explain the phenotype. To go further, we identified the cellular effects supporting the testicular phenotype at flutamide LOAEL. We showed that the germ cell loss (hypospermatogenesis and decreased sperm counts) is explained by apoptotic process induction in adult germ cells. We observed both an increase in the apoptotic (TUNEL-positive) germ cell number and an alteration of the balance between pro and anti-apoptotic proteins in favor of proapoptotic members, at LOAEL and NOAEL. While at NOAEL and lower doses we did no longer observe modification in testis weight or sperm counts, the very same cellular/molecular effects of flutamide that led to the hypospermatogenesis phenotype at LOAEL were yet detected. Indeed, fetal exposure to flutamide induced an increase in apoptotic germ cell number and pro-apoptotic protein (CASP3, BAX, DIABLO) levels at NOAEL (1 mg/kg.d). As early as 0.001 mg/kg/d the lowest dose (NOAEL/1,000) we observed a decreased in anti-apoptotic molecules, i.e. Mcl-1 and Bcl-2 mRNA levels and XIAP protein levels (table 1). These data suggest that gene or protein expression changes in response to fetal exposure to flutamide may be sentinels for hypospermatogenesis propensity (long-lasting germ cell apoptosis) at adulthood. We previously showed that in utero exposure induced germ cell apoptosis

and CASP3 activation as early as 0.4 mg/kg [10]. Similarly, fetal exposure to vinclozolin (100 mg/kg) induced increased germ cell apoptosis [676] related to enhancement of TP53 and p21 [34]. However, the apoptotic pathways involved in such an apoptotic process has not been further evaluated.

To better understand the lasting mechanisms of anti-androgens, we characterized the signaling pathway leading to male germ cell apoptosis, i.e. adult hypospermatogenesis phenotype. In such an aim, we analyzed the Heat Shock Response (HSR). The HSR, through the heat shock factors (HSFs) regulates, at transcriptional level the heat shock proteins such as HSPA2. HSR is crucial for the normal development and function of the male gonad, especially for germ cell survival and function. Alteration of HSR induces massive germ cell death, leading to male infertility in genetically modified mice. Indeed, male mice over-expressing active HSF1 in the testis are infertile because of an increased germ cell apoptosis [21, 22]. Here, in utero exposure to flutamide induced an increase in the transcription factor HSF1 associated in adult rat testes with a decrease in some of its targets genes Spo11 and Mov10l1 (but not Tdrd1, PiwilL2 and Dnaja1) suggesting the functionality of this pathway. DNAJA1, SPO11, PIWIL2, TDRD1 and MOV10L1 are necessary to spermatogenesis because they are involved in major pathways for gamete formation including meiotic recombination (SPO11), repression of transposable elements (TDRD1, PIWIL2, MOV10L1), 3'UTR ARE-mediated mRNA stabilization (ELAVL1) and HSR through co-chaperoning of HSP70s proteins (DNAJA1). In the spermatocytes germ cells, these genes are repressed following heat shock through HSF1 binding [35].

In the HSR pathway, HSPA2 protein expression was decreased at all doses tested. This dramatic decrease of HSPA2 may explain in part the long-lasting apoptotic effects on adult germ cells as mice knocked-out for HSPA2/HSP70-2 displayed increased-apoptotic germ cell death with reduced quality sperm [17, 18]. The link between HSPA2 and spermatogenesis has been demonstrated not only with reports on rodents but also with clinical studies indicating that HSPA2 levels were decreased in seminal plasma from infertile patients [23, 24]. To insight the upstream mechanisms of the HSPA2 loss, we analyzed the levels of its transcription factor HSF2 and some regulatory proteins BAG6 and ELAVL1. Since HSF2 and BAG6 expression was decreased only at LOAEL, they may not be implicated in the HSPA2

regulation in our model. By contrast, ELAVL1 protein (except 0.01 mg/kg/d) and mRNA expressions were decreased all doses tested, suggesting this mRNA regulating factor explain in part the HSPA2 fall. Moreover, cKO ELAVL1 mice showed decreased levels of HSPA2 [23] associated to a male infertility because of a deregulation of germ cell apoptosis. Noteworthy, in terms of apoptosis, MCL1, BCL2 and XIAP and in terms of metabolism ELAVL1, HSPA2 and Mov10L1 may be early sentinels of the effects of anti-androgens at low doses since their expression was decreased until NOAEL/1,000. These molecules could be a part of a signature of long lasting effects of in utero anti-androgen exposure. Interestingly, the 6 molecules may belong to a same functional protein network (see Fig. 17).

The adult germ cell death phenotype is to be viewed in the context of the programming of an adult disease, as it was irreversible only when hormonal disruption occurred during the neonatal (but not adult) period. Indeed, we showed that adult exposure to anti-androgen at the same doses as in utero, induced alterations of the male reproductive system. The main differences are that the effects (i) are observed mainly at LOAEL, for few parameters at NOAEL (CASP3, BCL2, MCL1, Mov10l1) (ii) are no longer observed 2 months after exposure arrest suggesting the recovery of the anti-androgen action. Such data highlighted the difference of sensitivity between the developing and the adult organism. The cellular and molecular mechanisms underlying such an irreversible process linking the early exposure to the late effect still remain a key scientific challenge in NCD development.

Two major issues concerning EDCs are whether (i) anti-androgens have non-monotonic dose-response curves and (ii) low doses of EDCs influence diseases? Our data showed that the anti-androgen flutamide has monotonic dose-response curves on the parameters evaluated. Indeed, we observed a continuum between very low doses and LOAEL and as such the markers studied may be predictive of LOAEL effects. The consequences of non-monotonic dose-response (NMDR) curves for toxicity testing is that a safe dose determined from high doses does not guarantee safety at lower untested doses [666]. An example of NMDR is the herbicide atrazin that produced significant morphological alteration below 1ppb while no effect was observed above 1ppb even 200 ppb (NOAEL). The drawback of the flutamide exposure as used in the present model is that it cannot prejudge the type of dose response for each molecule. However, clearly flutamide, as the FEQ in water and

soil, evaluates the global ant-androgenic activity of chemical mixture as the environmental pollution is. Concerning the second question, low doses of flutamide as early as 1 ug/kg have negative effects on the pathways that control the survival of the male gametes. The in utero exposure to anti-androgen programmed the germ cells to be more responsive to apoptosis. At very low doses, there is no impact on sperm counts, however, we cannot rule out the possibility that the quality of the gamete is affected. The male gamete may transmit to the following generations reduced male fertility as observed previously [36].

In summary, in utero exposure to the anti-androgen flutamide programmed, in adult male rat, alterations of the reproductive system including testis (i.e. increased apoptotic germ cell number at 1mg/kg). The apoptotic process is detected at molecular levels as low as 1ug/kg suggesting that low doses of anti-androgens mixture (relevant to human exposure, especially fetus) may program germ cell propensity to apoptosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by INSERM U1065, University Nice-Sophia-Antipolis, ANRT and and BayerCropScience (CIFRE doctoral grant to L. I.) BASF Agro (CIFRE doctoral grant to N.L.), CEFIC-LRI and BASF Agro (fellowships to B.S.), ANR (Grant ANR-06-SEST-13), PNRA (Grant ANR-07-PNRA-016-, PNRPE (Grant PNRPE-2009-12), the Nord Pas-de-Calais region (SER-2007) and MEDDTL (Grant 11-MRES-PNRPE-1-CVS-027 2011). The authors acknowledge the C3M Imaging Core Facility (Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, MICA) and C3M animal room facility.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Characterization of adult testis phenotype after in utero exposure to flutamide.

Adult male rats were exposed in utero (gestational day (GD) 10 to 21) to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). At adulthood, different parameters were measured in male rats such as (A) body weight; relative weight of (B) testis; (C) seminal vesicle; (D) prostate; (E) sperm count (F) sperm viability and (G) seminiferous tubule diameter. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 20 animals originating from 5 different litters.

Figure 2: In utero exposure to flutamide induced long-term apoptosis in adult rat testes by increasing pro-apoptotic molecule expression (1).

Adult male rats were exposed in utero (GD 10 to 21) to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). At adulthood, the number of TUNEL (apopotic) positive cells per 100 seminiferous tubules was evaluated on paraffin section (A) quantification of TUNEL positive cells. (B-F) The protein and mRNA expression for apoptosis molecules was evaluated by western blotting and RT-qPCR. (B) MCL1 mRNA (C) representative western blot and (D) protein expression, (E) Bcl2 and (F) Xiap mRNA expression. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 20 animals originating from 5 different litters.

Figure 3: In utero exposure to flutamide induced long-term apoptosis in adult rat testes by decreasing anti-apoptotic molecule expression (2).

Adult male rats were exposed in utero (GD 10 to 21) to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). The protein and mRNA expression for apoptosis molecules was evaluated by western blotting and RT-qPCR. (A) CASP3 protein and (B) mRNA expression, (C) BAX protein and (D) mRNA expression, (E) DIABLO protein and (F) mRNA expression. (G) A representative western blot was shown. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 20 animals originating from 5 different litters.

Figure 4: In utero exposure to flutamide altered the Heat Shock Response pathway in adult rat testes.

Adult male rats were exposed in utero (GD 10 to 21) to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). The protein and mRNA expression was evaluated by western blotting and RT-qPCR. (A) HSF1, (B) HSF2 and (C) HSPA2 protein expression. (D) Hsf1, (E) Hsf2 and (F) Hspa2 mRNA expression. (G) A representative western blot was shown. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 20 animals originating from 5 different litters.

Figure 5: In utero exposure to flutamide altered the expression of HSPA2 regulators in adult rat testes.

Adult male rats were exposed in utero (GD 10 to 21) to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). (A) Immuno-localization for BAG6 and ELAVL1 was shown at dose 0 1 and 10 mg/kg/d of flutamide. The protein and mRNA expression was evaluated by western blotting (a representative blot was shown) and RT-qPCR. (B) BAG6 protein and (C) mRNA expression, (D) ELAVL1 protein and (E) mRNA expression. (F) The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 20 animals originating from 5 different litters.

Figure 6: In utero exposure to flutamide altered the expression of proteins involved in male germ cell metabolism.

Adult male rats were exposed in utero (GD 10 to 21) to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). The mRNA expression was evaluated RT-qPCR in adult male rat testes for (A) Tdrd1; (B) Piwil2; (C) Dnaja1; (D) Spo11 and (E) Mov10l1. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 20 animals originating from 5 different litters.

Figure 7: characterization of adult testis phenotype after adult exposure to flutamide.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). At the end of exposure, different parameters were measured in male rats such as (A) body weight; relative weight of (B) testis; (C) seminal vesicle; (D) prostate; (E) sperm count; (F) sperm viability and (G) seminiferous tubule diameter. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 8: adult exposure to flutamide induced apoptosis in male germ cells.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). (A) At the end of exposure, the number of TUNEL (apoptotic) positive cells per 100 seminiferous tubules was evaluated on paraffin section. The protein and mRNA expression was evaluated by western blotting and RT-qPCR: (B) active CASP3 protein, (C) a representative western blot was shown; (D) CASP3 mRNA expression; (E) DIABLO protein and (F) mRNA expression; (G) Bax mRNA and (H) protein expression. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 9: adult exposure to flutamide induced apoptosis in rat testes.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). At the end of exposure, the protein and mRNA expression was evaluated by western blotting and RT-qPCR: (A) BCL2 protein; (B) and mRNA expression; (C) MCL1 protein and (D) mRNA expression; (E) a representative western blot was shown. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 10: adult exposure to flutamide altered the Heat Shock Response pathway in rat testes.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). At the end of exposure, the protein and mRNA expression was evaluated

by western blotting and RT-qPCR: (A) HSF1 protein; (B) and mRNA expression; (C) HSF2 protein and (D) mRNA expression; (E) HSPA2 protein and (F) mRNA expression, (G) BAG6 protein and (H) mRNA expression. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 11: adult exposure to flutamide altered the expression of HSPA2 regulators in rat testes.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). At the end of exposure, the protein and mRNA expression was evaluated by western blotting and RT-qPCR: (A) ELAVL1 protein; (B) and mRNA expression; (C) Dnaja1 mRNA expression; (D) Dnmt3a mRNA expression; (E) Mov10l1 mRNA expression; (F) Piwil2 mRNA expression, (G) Spo11 mRNA expression; (H) Tdrd1 mRNA expression. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 12: characterization of adult testis phenotype two months after adult exposure to flutamide.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d), and then they were left without treatment during 2 months. At the end of experiment, different parameters were measured in male rats such as (A) body weight; (B) relative testis weight; (C) relative seminal vesicle weight; (D) relative ventral prostate weight; (E) sperm count; (F) sperm viability, (G) seminiferous tubule diameter and (H) number of TUNEL positive cells The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 13: Two months after adult exposure to flutamide recovery of the testis apoptosis phenotype.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d), and then they were left without treatment during 2 months. At the end of experiment, the protein and mRNA expression was evaluated by western blotting and RT-

qPCR: (A) active CASP3 protein; (B) CASP3 mRNA expression; (C) BCL2 protein; (D) and mRNA expression; (E) MCL1 protein; (F) mRNA expression; (G) XIAP protein; (H) and mRNA expression and (I) DIABLO protein expression. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 14: Two months after adult exposure to flutamide recovery of the HSR pathway alterations in the testis.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d), and then they were left without treatment during 2 months. At the end of experiment, the protein and mRNA expression was evaluated by western blotting and RT-qPCR: (A) HSF1 protein; (B) mRNA expression; (C) HSF2 protein; (D) and mRNA expression; (E) HSPA2 protein; (F) mRNA expression; (G) ELAVL1 protein; (H) and mRNA expression. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 15: Two months after adult exposure to flutamide recovery of the alterations in HSPA2 regulators.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d), then they were left without treatment during 2 months. At the end of experiment, the protein and mRNA expression was evaluated by western blotting and RT-qPCR: (A) Dnmt1 mRNA; (B) protein expression; (C) DNMT3a protein; (D) and mRNA expression; (E) DNMT3b protein; (F) mRNA expression; (G) BAG6 protein; (H) and mRNA expression. The data are presented as box and whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 16: Two months after adult exposure to flutamide recovery of the alterations in the HSPA2 regulators.

Adult male rats were exposed from day 66 to day 76 to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d), and then they were left without treatment during 2 months. At the end of experiment, the mRNA expression was evaluated by RT-qPCR: (A) Dnaja1; (B) Mov10L1; (C) Piwil2; (D) Spo11 and (E) Tdrd1 mRNA expression. The data are presented as box and

whiskers plots min to max (with the median as a band inside and the mean as +) of 16 animals.

Figure 17: Molecular signature of adult testicular long-lasting effects of flutamide at low doses after in utero exposure.

The 6 molecules belong to a same functional protein network involved in the testis phenotype of chronic adult germ cell death (string network).

Dose of flutamide (mg/kg/d)	0.001	0.01	0.1	1	10
Morphological Effects					
cryptorchidia (0% at 0 mg flutamide)	15%	16%	16%	5%	43%
Body weight	NS	NS	NS	NS	NS
Relative testis weight	NS	NS	NS	NS	NS
Relative prostate weight	NS	NS	NS	NS	95% D
Relative seminal vesicle weight	NS	NS	NS	NS	32% D
Sperm count	NS	NS	NS	NS	40% D
Sperm viability	NS	NS	NS	NS	30% D
Seminiferous tubule diameter	NS	NS	NS	NS	20% D
Cellular and molecular Effects					
Number of tunel positive cells	NS	NS	NS	I.7 I	2.2 I
Mcl1 protein level	NS	NS	NS	28% D	28% D
Mcl1 mRNA level	D	D	NS	NS	D
BCL2 mRNA level	58% D	D	D	D	D
XIAP protein level	46%D	D	D	D	D
CASP3 protein level	NS	NS	NS	I 1-4	I 1-4
Casp3 mRNA level	NS	NS	NS	I 1-8	I 1-8
BAX protein level	NS	NS	I 1-4	I	I
Bax mRNA level	NS	NS	NS	I 1-5	I
DIABLO protein level	I	NS	NS	I 1-6	I
Diablo mRNA level	NS	NS	NS	I 1-3	I
HSF1 protein level	I 1-4	NS	NS	I	I
Hsf1 mRNA level	NS	NS	NS	I	I
HSF2 protein level	NS	NS	NS	NS	D 29%
Hsf2 mRNA level	NS	NS	NS	NS	NS
HSPA2 protein level	D	D	D	D	D 60%
Hspa2 mRNA level	NS	NS	NS	NS	NS
ELAVL1 protein level	D	NS	D	D	D
Elavl1mRNA level	D	D	D	D	D
BAG6 protein level	NS	NS	NS	NS	D 30%
Bag6 mRNA level	NS	NS	NS	NS	NS
HSF1 regulated factors					
Tdrd1 mRNA level	NS	NS	NS	NS	NS
PiwiL2 mRNA level	NS	NS	NS	NS	NS
Dnaja1/Hsp40A1 mRNA level	NS	NS	NS	NS	NS
Spo11 mRNA level	NS	NS	NS	D	D
Mov10l1 mRNA level	D	D	D	D	D

Table 1. Summary of the data obtained in adult testes from rats exposed in utero to a dose-effect of the antiandrogen flutamide (NS : non significant, D : decreased expression, I : increased expression). The flutamide doses 1 and 10 mg/kg/d are the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) and the Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL), respectively.

dose mg/kg	Window of exposure	Route of exposure	Vehicle	Time of arrest	Flutamide effects on male reproductive tract	Models	Ref
0-6.25-12.5-25-50	GD12-21	SCI	corn oil	PND13,21, 38,95-105	Cryptochidism (0-0%; 6.25-20%; 12.5-25%; 25-45%; 50-46%). Decreased testis, épididymes, vesicle seminal and prostate weight (from 6.25). Decreased AGD at all doses. Retained nipples at all doses at PND3 and PND100"	CD1 rats	[562]
0-18-24-50-75-100-200-250-300	GD12-21	SCI	corn oil/ethanol	PND 60	Cryptorchidism : 46%. Decreased ventral prostate weight from 18mg.	SD rats	[563]
0-2-5-10-100	GD15.5-18.5 GD13.5-16.5	oral gavage	corn oil/2.5 % DMSO	PND 25	Decreased seminal vesicle w (10, 100 mg) and prostate weight (100 mg). Decreased penis length (10, 100 mg). Decreased AGD (10, 100 mg). No effect on testis weight.	Wistar rats	[671]
50	GD16, 17, 18 or 19	oral gavage	corn oil	PND 21	Decreased AGD at GD16, 17, 18 and 19. Retained nipples (at PDN13) for GD16 and GD17.	SD rats	[672]
100	GD15.5-17.7 17.5-19.5 19.5-21.5 15.5-21.5	oral gavage	corn oil/2.5 % DMSO	PND 25	Decreased prostate weight: +++ for GD15.5-21.5; ++ for GD15.5; + for GD17.5; no decrease for GD19.5. Decreased AGD: ++ for GD15.5-21.5; ++ for GD15.5; + for GD17.5; no decrease for GD19.5.	Wistar rats	[673]
0.15, 0.6, 2.5, 10, 100	GD14-PND3	oral gavage	methyl cellulose	PND60	Cryptorchidism: 40% at 10 mg, 58% at 100 mg. No morphological effects at all doses except 10 and 100 mg	souris	[679]
10 0.25	GD11-22 PND0-9	SCI	propandiol	PND0-140	Feminization of extern genitalia. No prostate development. Leucocytic infiltration of testes	SD rats	[680]
10	GD10-21 PND0-14	SCI	polyene glycol	Week 16-20	Cryptorchidism, feminized genitalia testis: spermatogenesis alterations	albino swiss rat	[674]

Table 2. Summary of the data from previous experimental studies with developmental exposure to flutamide. AGD : ano-genital distance. SD= Sprague Dawley. SCI : Sub-cutaneous injection. GD : gestational day.

REFERENCES

1. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health* 11 42 (2012).

2. Anderson HA, Wolff MS, Lilis R *et al*. Symptoms and clinical abnormalities following ingestion of polybrominated-biphenyl-contaminated food products. *Ann N Y Acad Sci* 320 684-702 (1979).

3. Hsu ST, Ma CI, Hsu SK *et al*. Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup. *Environ Health Perspect* 59 5-10 (1985).

4. Pesatori AC, Consonni D, Bachetti S *et al*. Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident". *Ind Health* 41(3), 127-138 (2003).

5. Li D, Zhou Z, Qing D *et al*. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum Reprod* 25(2), 519-527 (2010).

6. Queiroz EK, Waissmann W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad Saude Publica* 22(3), 485-493 (2006).

7. Villeneuve S, Cyr D, Lynge E *et al*. Occupation and occupational exposure to endocrine disrupting chemicals in male breast cancer: a case-control study in Europe. *Occup Environ Med* 67(12), 837-844 (2010).

8. Zoeller RT, Brown TR, Doan LL *et al*. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153(9), 4097-4110 (2012).

9. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB *et al*. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33(3), 378-455 (2012).

10. Omezzine A, Chater S, Mauduit C *et al*. Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. *Endocrinology* 144(2), 648-661 (2003).

11. Benbrahim-Tallaa L, Siddeek B, Bozec A *et al*. Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. *J Endocrinol* 196(1), 21-31. (2008).

12. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE *et al*. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* er20151010 (2015).

13. Siddeek B, Inoubli L, Lakhdari N *et al*. MicroRNAs as potential biomarkers in diseases and toxicology. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 764-765 46-57 (2014).

14. Wolf CJ, Leblanc GA, Ostby JS, Gray LE, Jr. Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. *Toxicol Sci* 55(1), 152-161. (2000).

15. Vandenberg LN. Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitam Horm* 94 129-165 (2014).

16. Meunier L, Siddeek B, Vega A *et al*. Perinatal Programming of Adult Rat Germ Cell Death After Exposure to Xenoestrogens: Role of microRNA miR-29 Family in the Down-Regulation of DNA Methyltransferases and Mcl-1. *Endocrinology* 153(4), 1936-1947 (2012).

17. Dix DJ, Allen JW, Collins BW *et al*. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8), 3264-3268 (1996).

18. Mori C, Nakamura N, Dix DJ *et al*. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. *Dev Dyn* 208(1), 125-136 (1997).

19. Nakai A, Suzuki M, Tanabe M. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J* 19(7), 1545-1554 (2000).

20. Widlak W, Benedyk K, Vydra N *et al*. Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific hst70 gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium. *Acta Biochim Pol* 50(2), 535-541 (2003).

21. Wang G, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF. Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. *Genesis* 36(1), 48-61 (2003).

22. Sasaki T, Marcon E, Mcquire T, Arai Y, Moens PB, Okada H. Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis. *J Cell Biol* 182(3), 449-458 (2008).

23. Chi MN, Auriol J, Jegou B *et al*. The RNA-binding protein ELAVL1/HuR is essential for mouse spermatogenesis, acting both at meiotic and postmeiotic stages. *Mol Biol Cell* 22(16), 2875-2885 (2011).

24. Zhao JL, Ying GG, Yang B *et al*. Screening of multiple hormonal activities in surface water and sediment from the Pearl River system, South China, using effect-directed in vitro bioassays. *Environ Toxicol Chem* 30(10), 2208-2215 (2011).

25. Imperato-Mcginley J, Sanchez RS, Spencer JR, Yee B, Vaughan ED. Comparison of the effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies. *Endocrinology* 131(3), 1149-1156 (1992).

26. Van Der Schoot P. Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide. *J Reprod Fertil* 96(2), 483-496. (1992).

27. Macleod DJ, Sharpe RM, Welsh M *et al*. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl* 33(2), 279-287 (2010).

28. Foster PM, Harris MW. Changes in androgen-mediated reproductive development in male rat offspring following exposure to a single oral dose of flutamide at different gestational ages. *Toxicol Sci* 85(2), 1024-1032 (2005).

29. Welsh M, Saunders PT, Fisken M *et al*. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 118(4), 1479-1490 (2008).

30. Mcintyre BS, Barlow NJ, Foster PM. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in

anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol Sci* 62(2), 236-249 (2001).

31. Kassim NM, Mcdonald SW, Reid O, Bennett NK, Gilmore DP, Payne AP. The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *J Anat* 190(Pt 4), 577-588 (1997).

32. Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M *et al*. Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J Androl* 35(3), 303-316 (2012).

33. Brieno-Enriquez MA, Garcia-Lopez J, Cardenas DB *et al*. Exposure to endocrine disruptor induces transgenerational epigenetic deregulation of microRNAs in primordial germ cells. *PLoS One* 10(4), e0124296 (2015).

34. Elzeinova F, Novakova V, Buckiova D, Kubatova A, Peknicova J. Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reprod Toxicol* 26(3-4), 231-238 (2008).

35. Kus-Liskiewicz M, Polanska J, Korfanty J *et al*. Impact of heat shock transcription factor 1 on global gene expression profiles in cells which induce either cytoprotective or pro-apoptotic response following hyperthermia. *BMC Genomics* 14 456 (2013).

36. Skinner MK, Anway MD. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on the development of disease and cancer. *Crit Rev Oncog* 13(1), 75-82 (2007).

37. Miyata K, Yabushita S, Sukata T *et al*. Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormones and androgen- dependent organs in F1 male rats. *J Toxicol Sci* 27(1), 19-33. (2002).

38. Van Der Schoot P. Androgens in relation to prenatal development and postnatal inversion of the gubernacula in rats. *J Reprod Fertil* 95(1), 145-158. (1992).

LEGENDS TO SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental data 1: Adult testis morphology after in utero exposure to flutamide.

Adult male rats were exposed in utero (gestational day (GD) 10 to 21) to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). A representative of testis morphology (hematoxylin/eosin staining) was shown for (A) vehicle, (B) 0.001, (C) 0.01, (D) 0.1, (E) 1, (F) 10 mg/kg/d of flutamide. (Scale bar for main photo = 500 µm, scale bar for inset =100 µm)

Supplemental data 2: In utero exposure to flutamide induced long-term apoptosis in adult rat testes.

Adult male rats were exposed in utero (GD 10 to 21) to vehicle (0) or flutamide (0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 mg/kg/d). Representative photos for TUNEL were shown. (Scale bar for main photo = 100 µm, scale bar for inset =50 µm). Blue staining for DAPI, green staining for TUNEL positive cells.

Supplemental data 3: Localization of pro-apoptotic molecules in the testes from flutamide in utero exposed rats.

Adult male rats were exposed in utero (GD 10 to 21) to vehicle (0) or flutamide (10 mg/kg/d). Representative photos for XIAP, DIABLO and active CASP3 were shown. (Scale bar for main photo = 100 µm, scale bar for inset =50 µm). Blue staining for DAPI, green staining for XIAP; red staining for DIABLO or aCASP3.

staining for TUNEL positive cells.

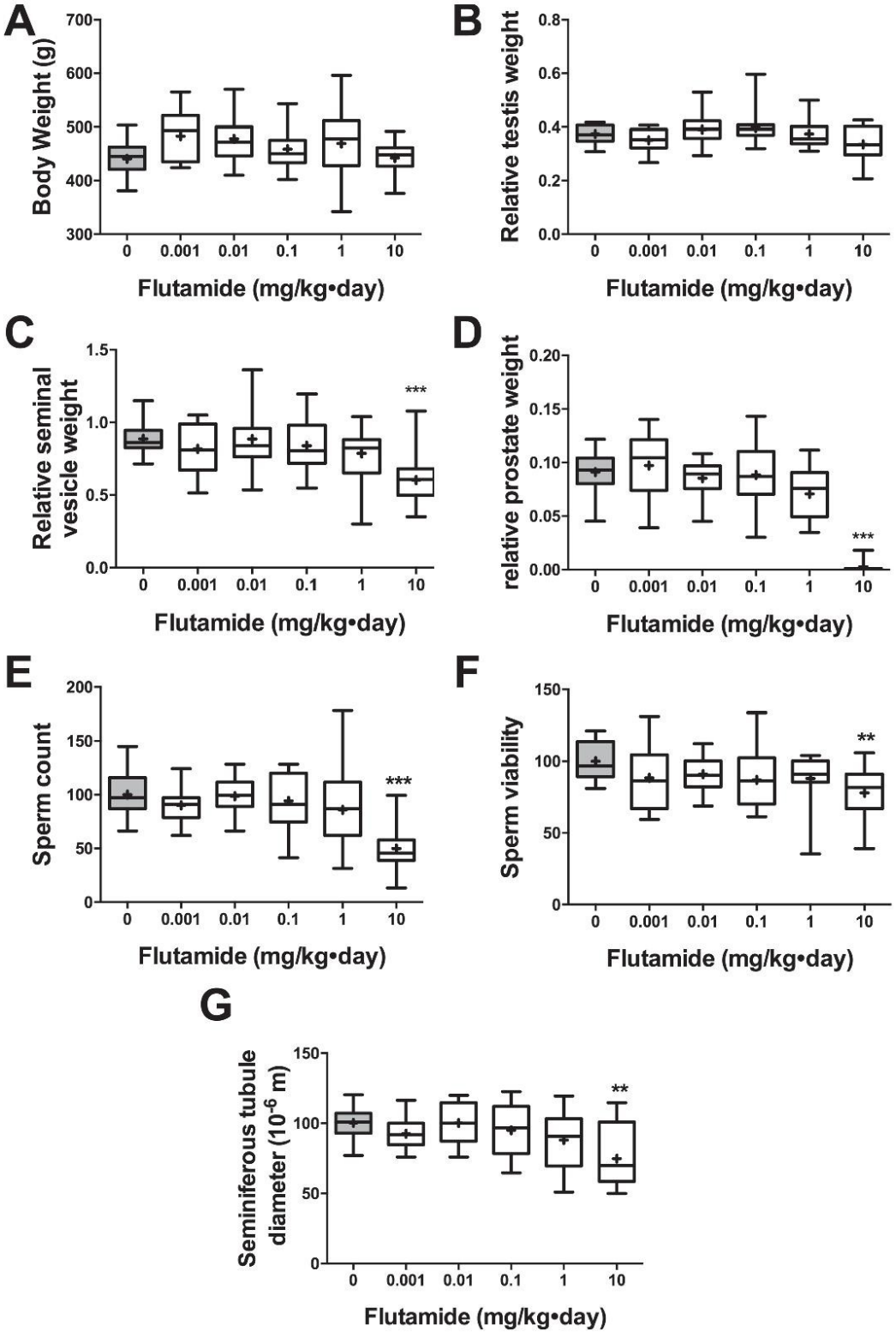

A
Body Weight (g)
700
600
500
400
300
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
B
Relative testis weight
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
C
Relative seminal vesicle weight
1.5
1.0
0.5
0.0
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
D
relative prostate weight
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
E
Sperm count
200
150
100
50
0
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
F
Sperm viability
150
100
50
0
**
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
G
Seminiferous tubule diameter (10^{-6} m)
150
100
50
0
**
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 1

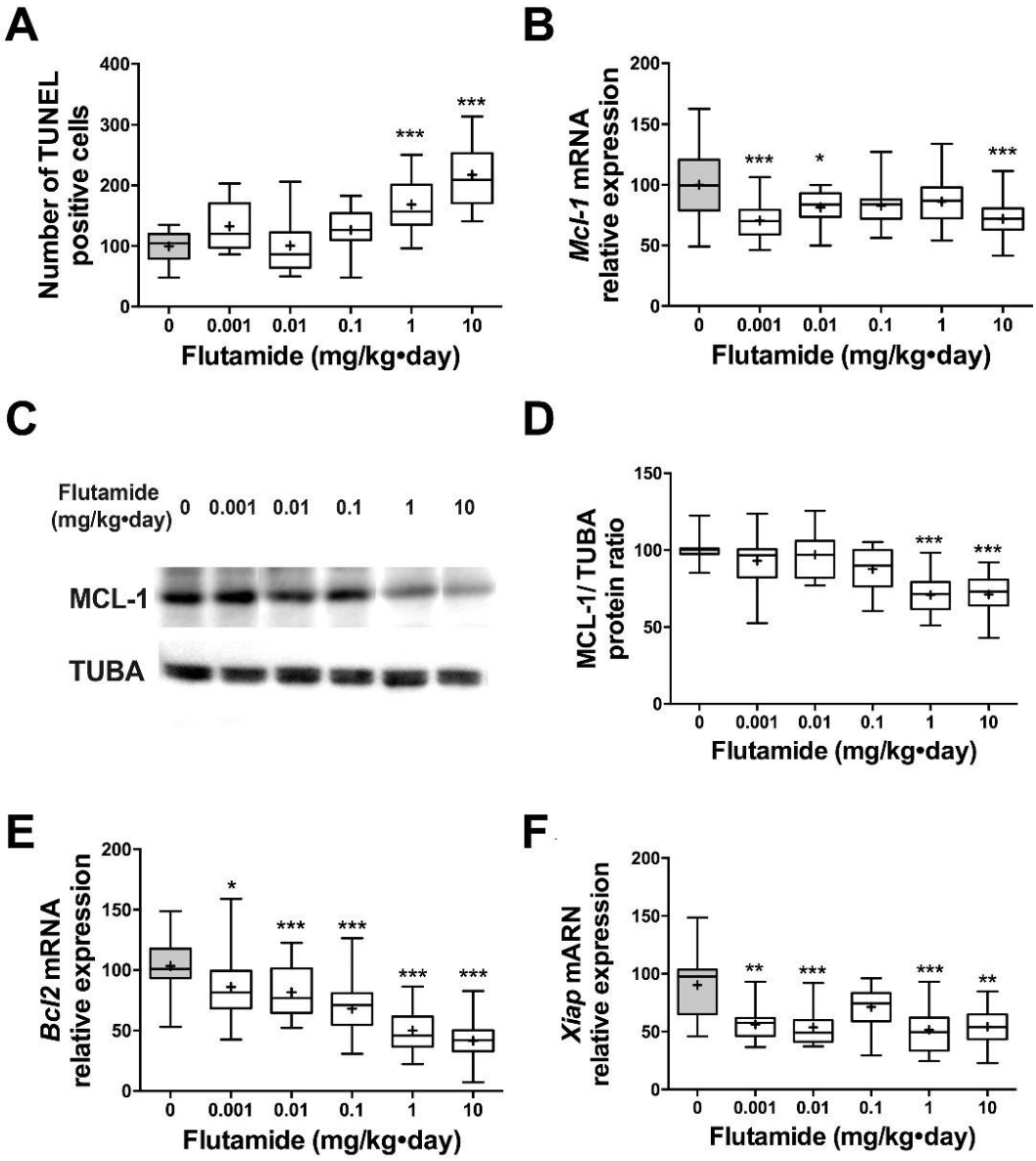

A
Number of TUNEL positive cells
400
300
200
100
0
***
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
B
Mcl-1 mRNA relative expression
200
150
100
50
0
***
*
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
C
Flutamide (mg/kg•day)
0
0.001
0.01
0.1
1
10
MCL-1
TUBA
D
MCL-1/TUBA protein ratio
150
100
50
0
***
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
E
Bcl2 mRNA relative expression
200
150
100
50
0
*
***
***
***
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
F
Xiap mARN relative expression
200
150
100
50
0
**
***
***
**
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 2

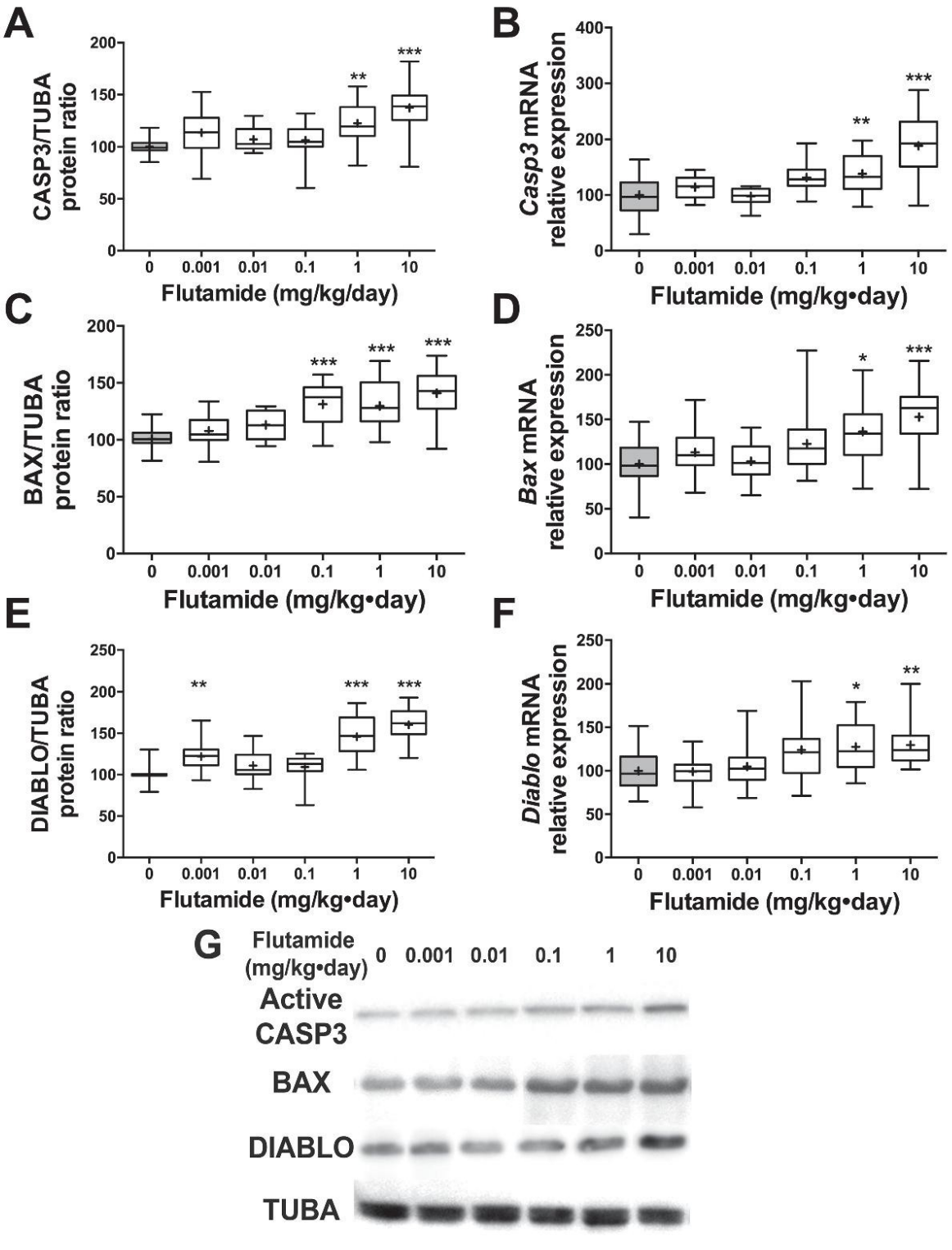

A
CASP3/TUBA protein ratio
Flutamide (mg/kg/day)
B
Casp3 mRNA relative expression
Flutamide (mg/kg•day)
C
BAX/TUBA protein ratio
Flutamide (mg/kg•day)
D
Bax mRNA relative expression
Flutamide (mg/kg•day)
E
DIABLO/TUBA protein ratio
Flutamide (mg/kg•day)
F
Diablo mRNA relative expression
Flutamide (mg/kg•day)
G
Flutamide (mg/kg•day)
0 0.001 0.01 0.1 1 10
Active CASP3
BAX
DIABLO
TUBA

Figure 3

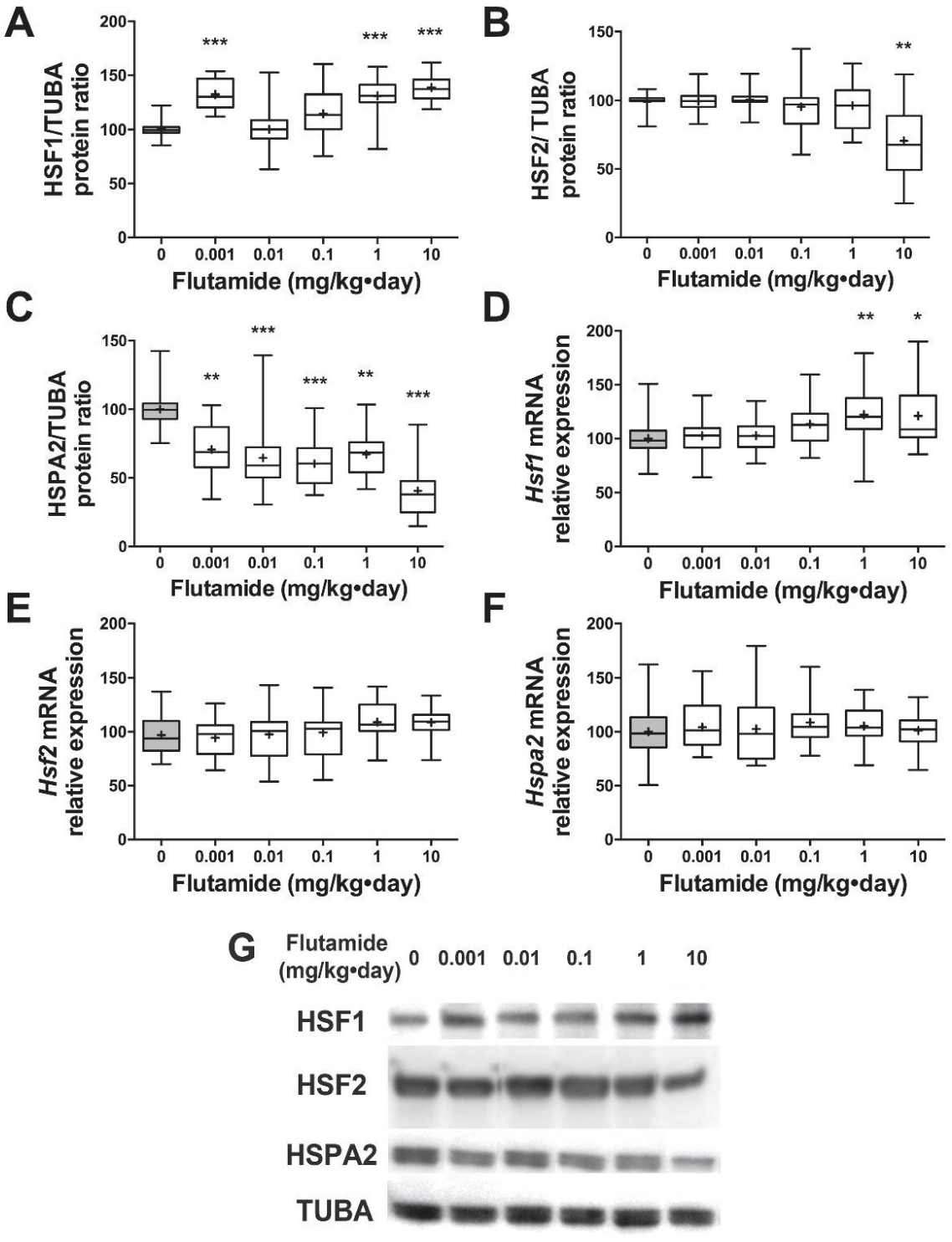

A
HSF1/TUBA protein ratio
Flutamide (mg/kg•day)
B
HSF2/ TUBA protein ratio
Flutamide (mg/kg•day)
C
HSPA2/TUBA protein ratio
Flutamide (mg/kg•day)
D
Hsf1 mRNA relative expression
Flutamide (mg/kg•day)
E
Hsf2 mRNA relative expression
Flutamide (mg/kg•day)
F
Hspa2 mRNA relative expression
Flutamide (mg/kg•day)
G
Flutamide (mg/kg•day)
0 0.001 0.01 0.1 1 10
HSF1
HSF2
HSPA2
TUBA

Figure 4

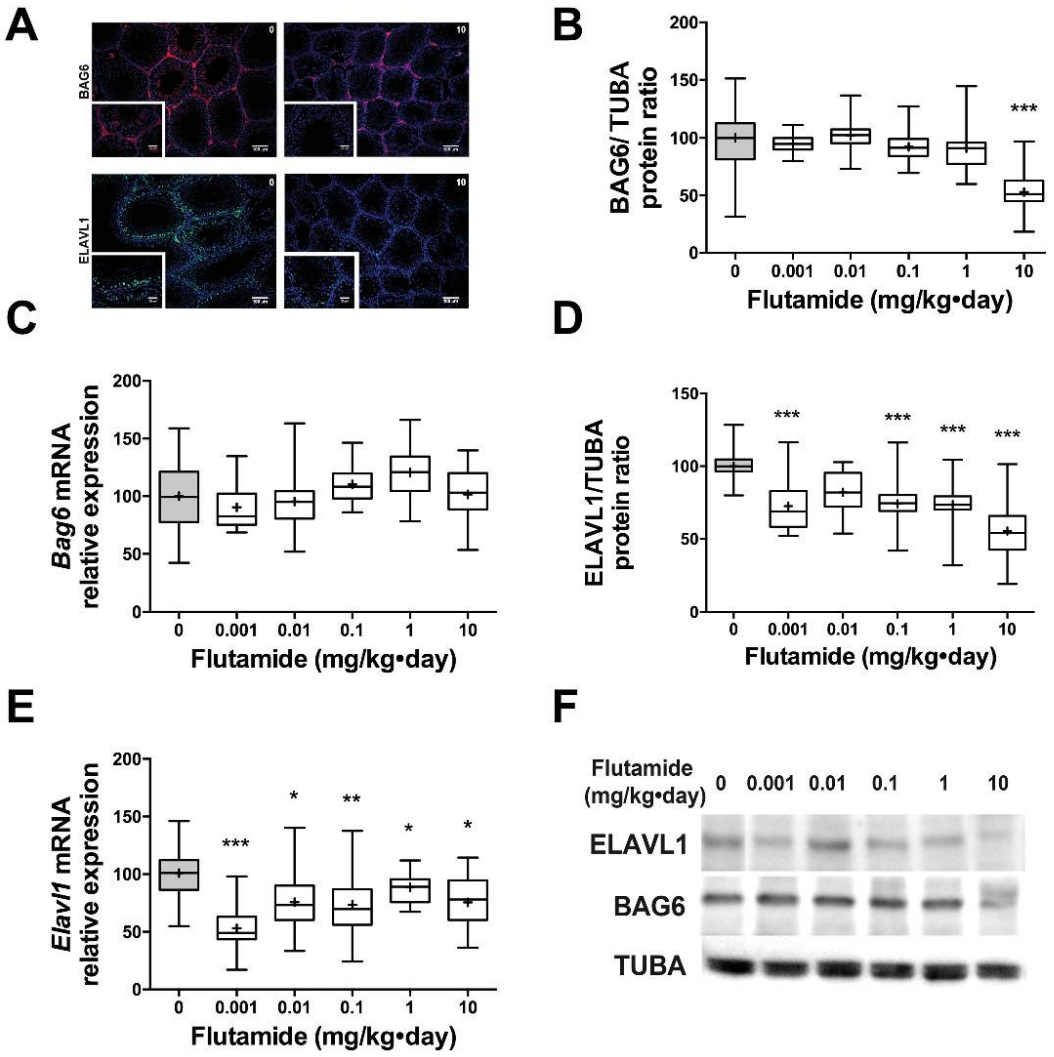

A
BAG6
ELAVL1
0
10
B
BAG6/ TUBA protein ratio
200
150
100
50
0
***
0 0.001 0.01 0.1 1 10
Flutamide (mg/kg•day)
C
Bag6 mRNA relative expression
200
150
100
50
0
0 0.001 0.01 0.1 1 10
Flutamide (mg/kg•day)
D
ELAVL1/TUBA protein ratio
150
100
50
0
***
***
***
***
0 0.001 0.01 0.1 1 10
Flutamide (mg/kg•day)
E
Elavl1 mRNA relative expression
200
150
100
50
0
***
*
**
*
*
0 0.001 0.01 0.1 1 10
Flutamide (mg/kg•day)
F
Flutamide (mg/kg•day)
0 0.001 0.01 0.1 1 10
ELAVL1
BAG6
TUBA

Figure 5

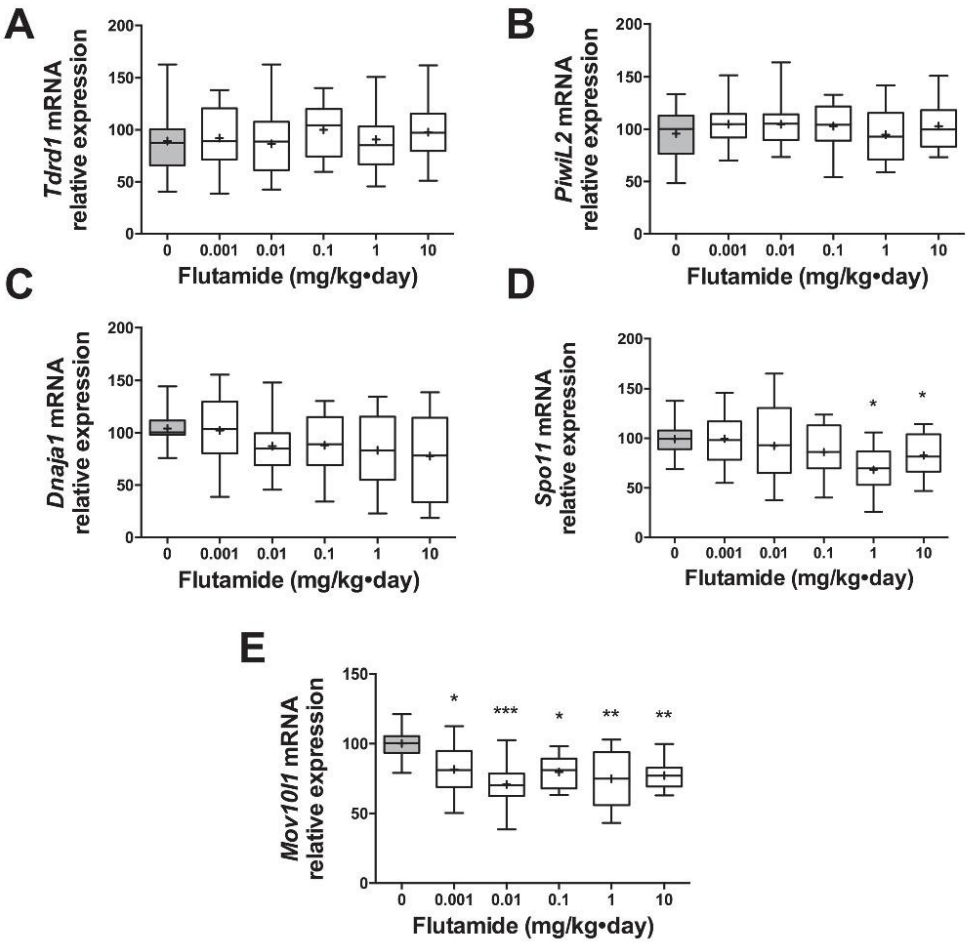

A
Tdrd1 mRNA relative expression
200
150
100
50
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
B
PiwiL2 mRNA relative expression
200
150
100
50
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
C
Dnaja1 mRNA relative expression
200
150
100
50
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
D
Spo11 mRNA relative expression
200
150
100
50
0
*
*
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
E
Mov10l1 mRNA relative expression
150
100
50
0
*
***
*
**
**
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 6

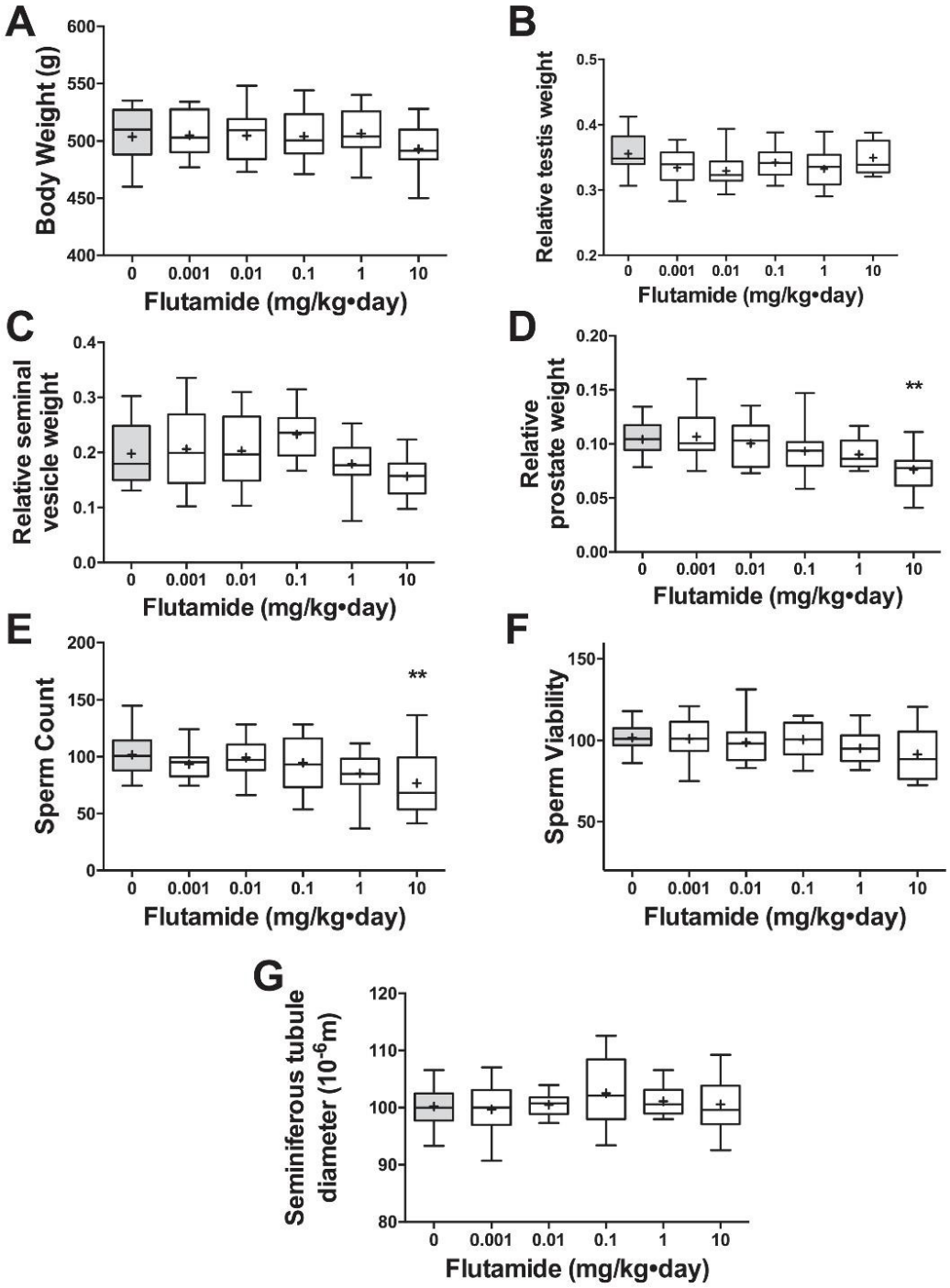

A
Body Weight (g)
600
550
500
450
400
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
B
Relative testis weight
0.5
0.4
0.3
0.2
Flutamide (mg/kg•day)
C
Relative seminal vesicle weight
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Flutamide (mg/kg•day)
D
Relative prostate weight
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
**
Flutamide (mg/kg•day)
E
Sperm Count
200
150
100
50
0
**
Flutamide (mg/kg•day)
F
Sperm Viability
150
100
50
Flutamide (mg/kg•day)
G
Seminiferous tubule diameter (10^{-6}m)
120
110
100
90
80
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 7

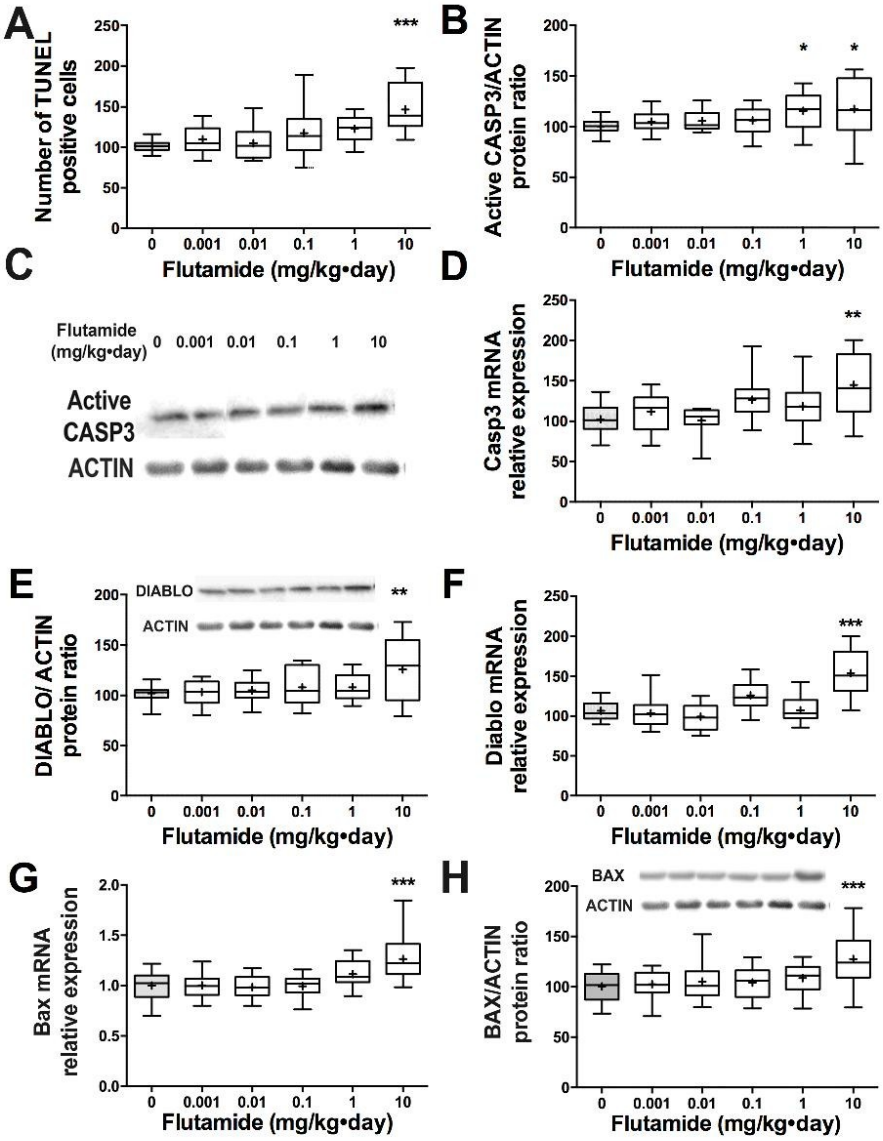
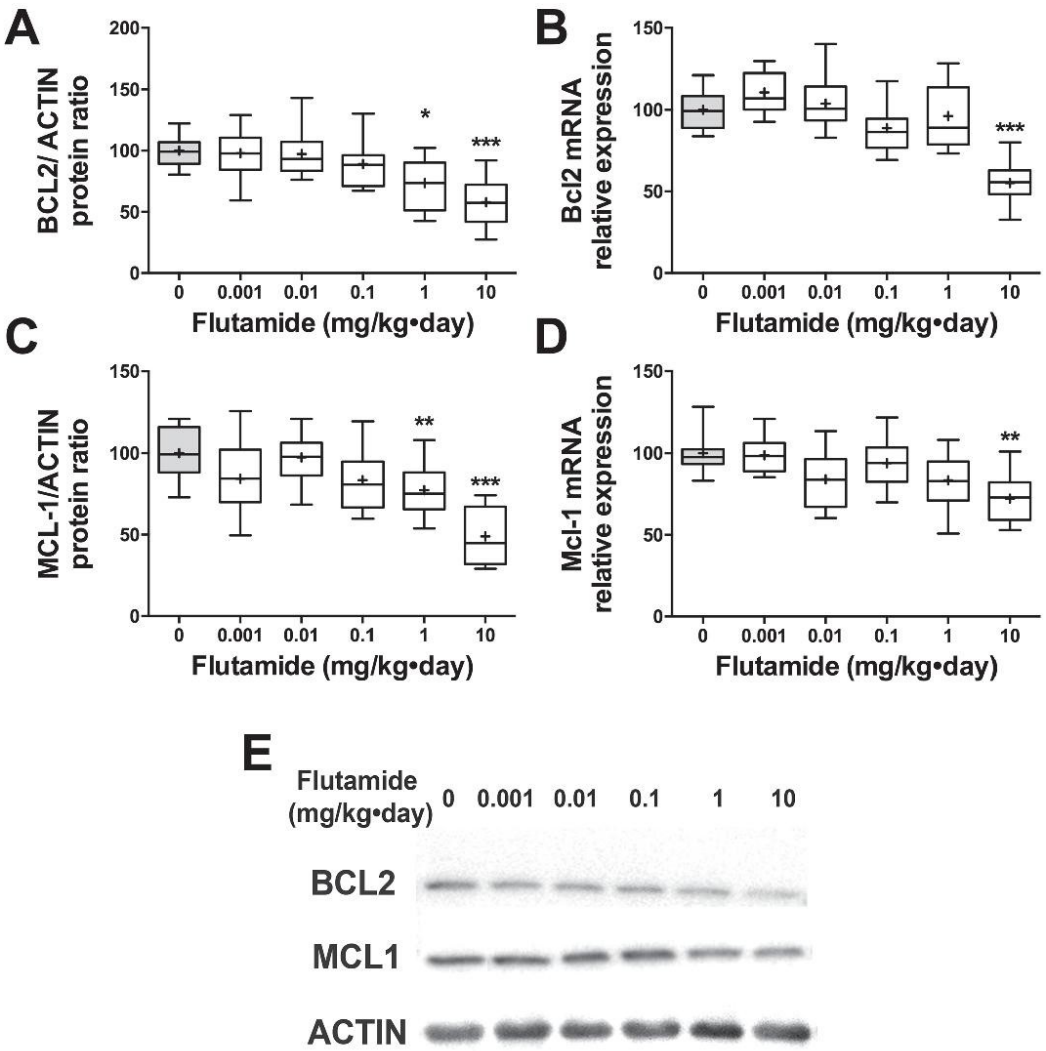

A
Number of TUNEL positive cells
***
Flutamide (mg/kg•day)
B
Active CASP3/ACTIN protein ratio
*
*
Flutamide (mg/kg•day)
C
Flutamide (mg/kg•day) 0 0.001 0.01 0.1 1 10
Active CASP3
ACTIN
D
Casp3 mRNA relative expression
**
Flutamide (mg/kg•day)
E
DIABLO/ACTIN protein ratio
DIABLO
ACTIN
**
Flutamide (mg/kg•day)
F
Diablo mRNA relative expression
***
Flutamide (mg/kg•day)
G
Bax mRNA relative expression
***
Flutamide (mg/kg•day)
H
BAX/ACTIN protein ratio
BAX
ACTIN
***
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 8


A
BCL2/ ACTIN protein ratio
200
150
100
50
0
*
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
B
Bcl2 mRNA relative expression
150
100
50
0
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
C
MCL-1/ACTIN protein ratio
150
100
50
0
**
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
D
Mcl-1 mRNA relative expression
150
100
50
0
**
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)

E
Flutamide (mg/kg•day)
0
0.001
0.01
0.1
1
10
BCL2
MCL1
ACTIN

Figure 9

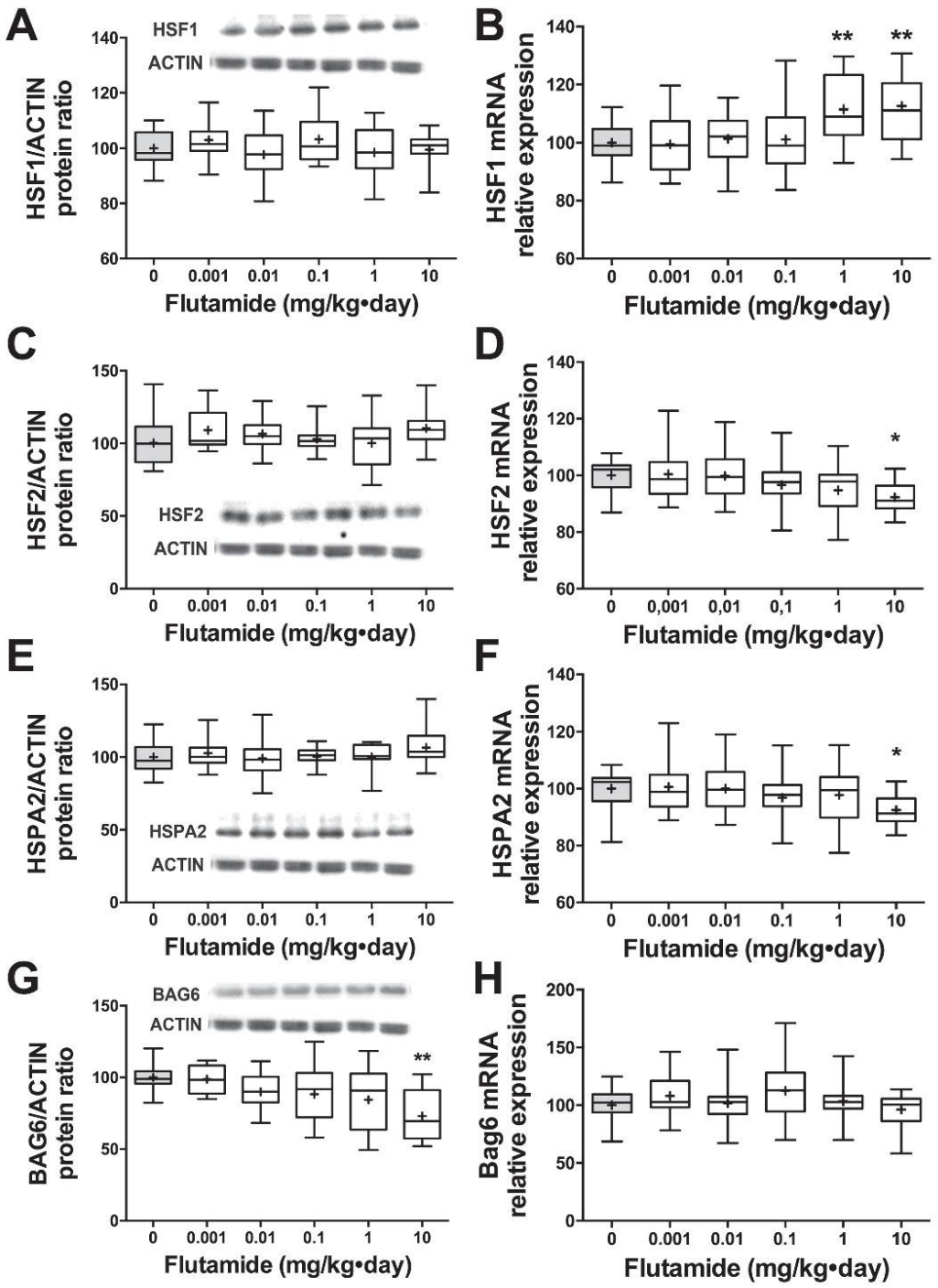

A
HSF1
ACTIN
HSF1/ACTIN protein ratio
Flutamide (mg/kg•day)
B
HSF1 mRNA relative expression
**
**
Flutamide (mg/kg•day)
C
HSF2/ACTIN protein ratio
HSF2
ACTIN
Flutamide (mg/kg•day)
D
HSF2 mRNA relative expression
*
Flutamide (mg/kg•day)
E
HSPA2/ACTIN protein ratio
HSPA2
ACTIN
Flutamide (mg/kg•day)
F
HSPA2 mRNA relative expression
*
Flutamide (mg/kg•day)
G
BAG6
ACTIN
BAG6/ACTIN protein ratio
**
Flutamide (mg/kg•day)
H
Bag6 mRNA relative expression
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 10

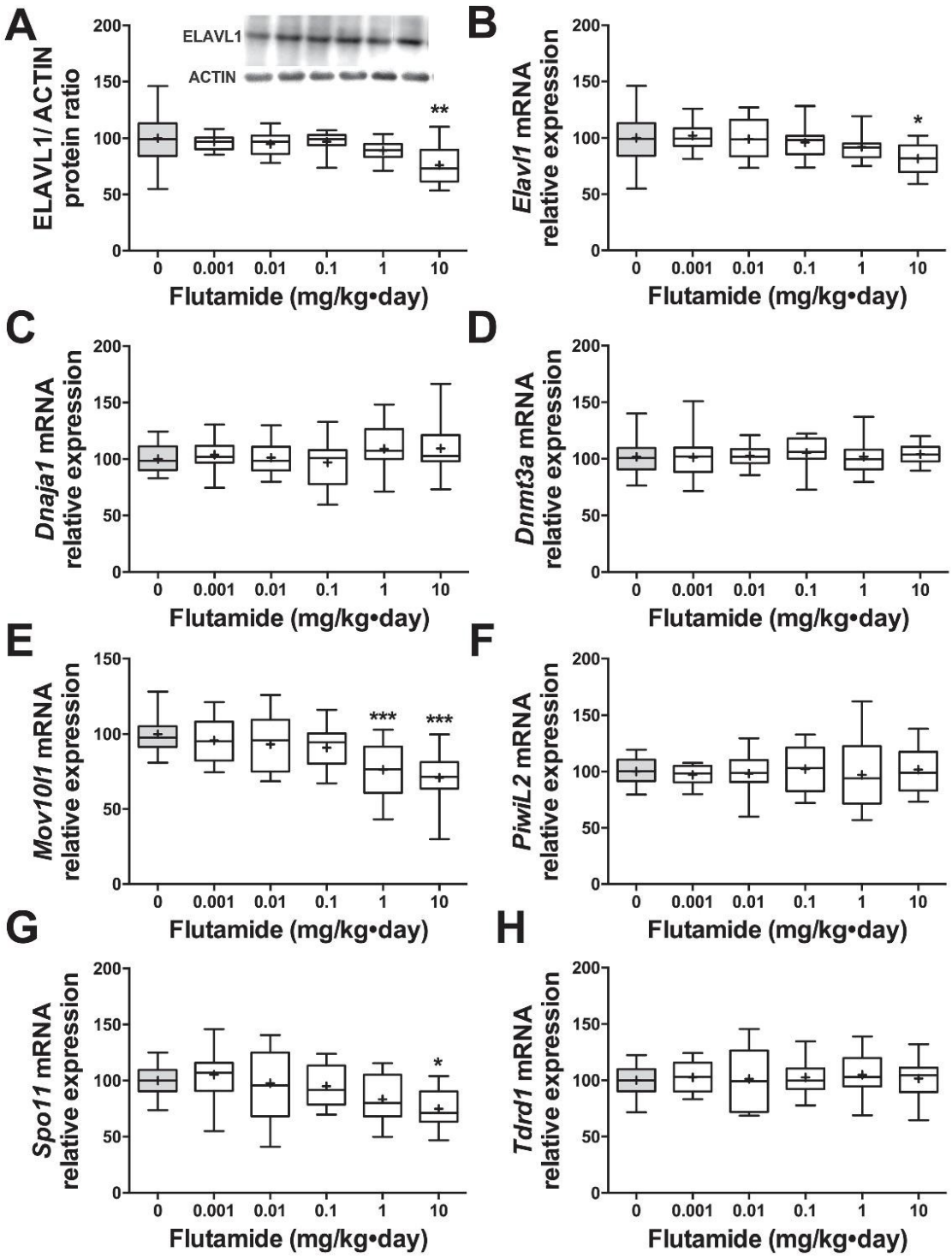

A
ELAVL1
ACTIN
ELAVL1/ ACTIN protein ratio
B
Elavl1 mRNA relative expression
C
Dnaja1 mRNA relative expression
D
Dnmt3a mRNA relative expression
E
Mov10l1 mRNA relative expression
F
PiwiL2 mRNA relative expression
G
Spo11 mRNA relative expression
H
Tdrd1 mRNA relative expression
0 0.001 0.01 0.1 1 10
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 11

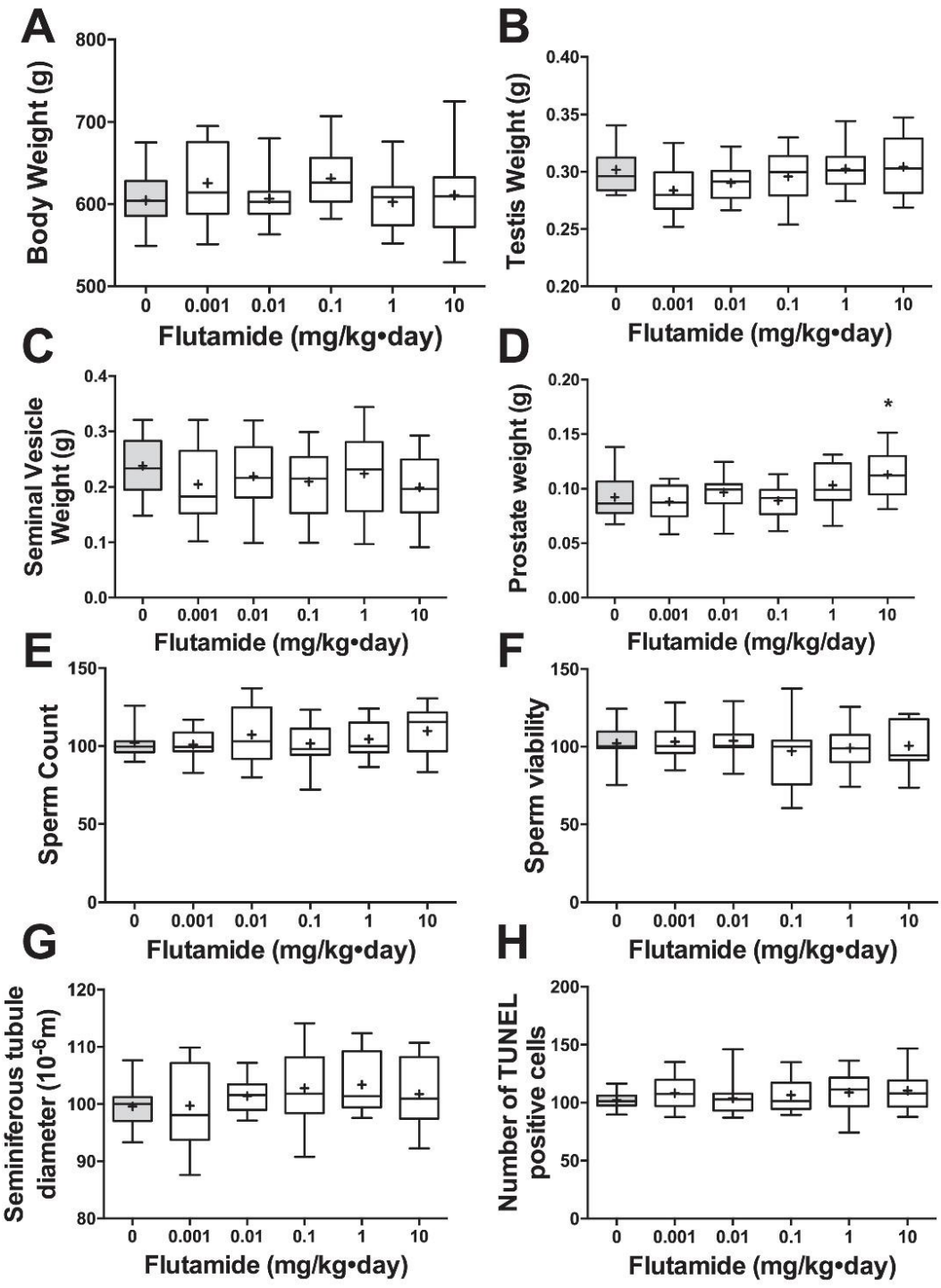

A
Body Weight (g)
800
700
600
500
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
B
Testis Weight (g)
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
Flutamide (mg/kg•day)
C
Seminal Vesicle Weight (g)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Flutamide (mg/kg•day)
D
Prostate weight (g)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
Flutamide (mg/kg/day)
E
Sperm Count
150
100
50
0
Flutamide (mg/kg•day)
F
Sperm viability
Flutamide (mg/kg•day)
G
Seminiferous tubule diameter (10^{-6}m)
120
110
100
90
80
Flutamide (mg/kg•day)
H
Number of TUNEL positive cells
200
150
100
50
0
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 12

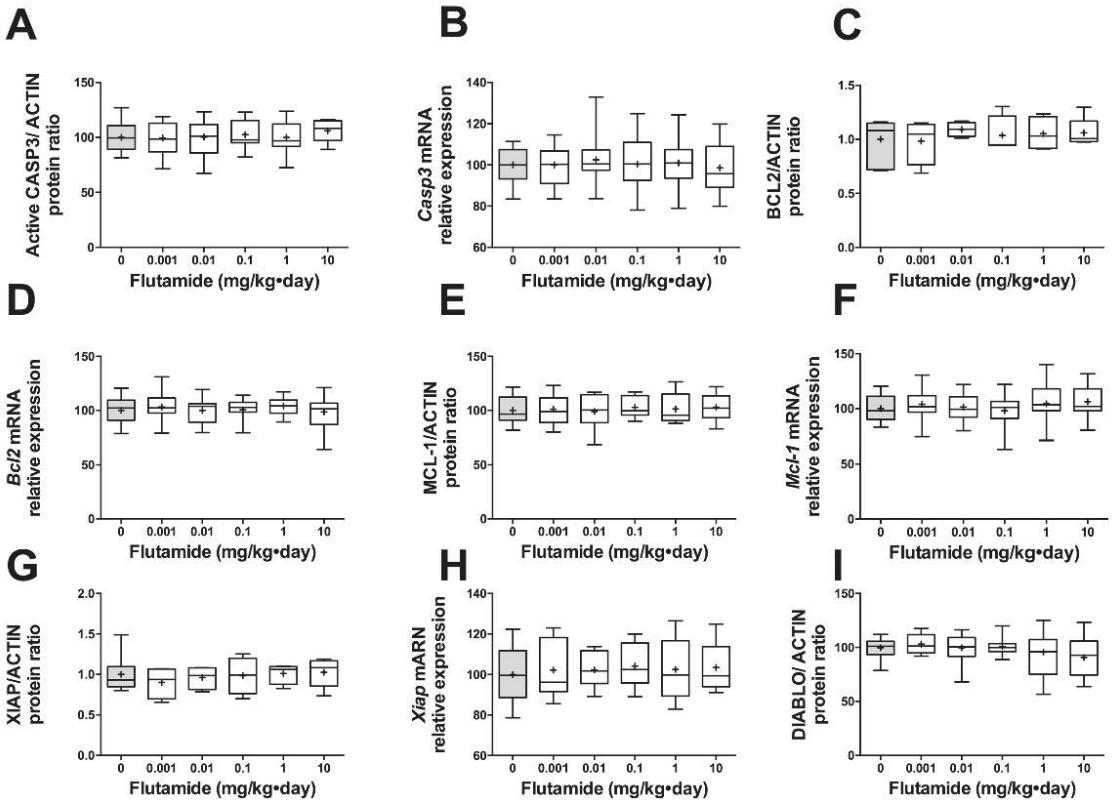

A
Active CASP3/ ACTIN protein ratio
B
Casp3 mRNA relative expression
C
BCL2/ACTIN protein ratio
D
Bcl2 mRNA relative expression
E
MCL-1/ACTIN protein ratio
F
Mcl-1 mRNA relative expression
G
XIAP/ACTIN protein ratio
H
Xiap mARN relative expression
I
DIABLO/ ACTIN protein ratio
0 0.001 0.01 0.1 1 10
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 13

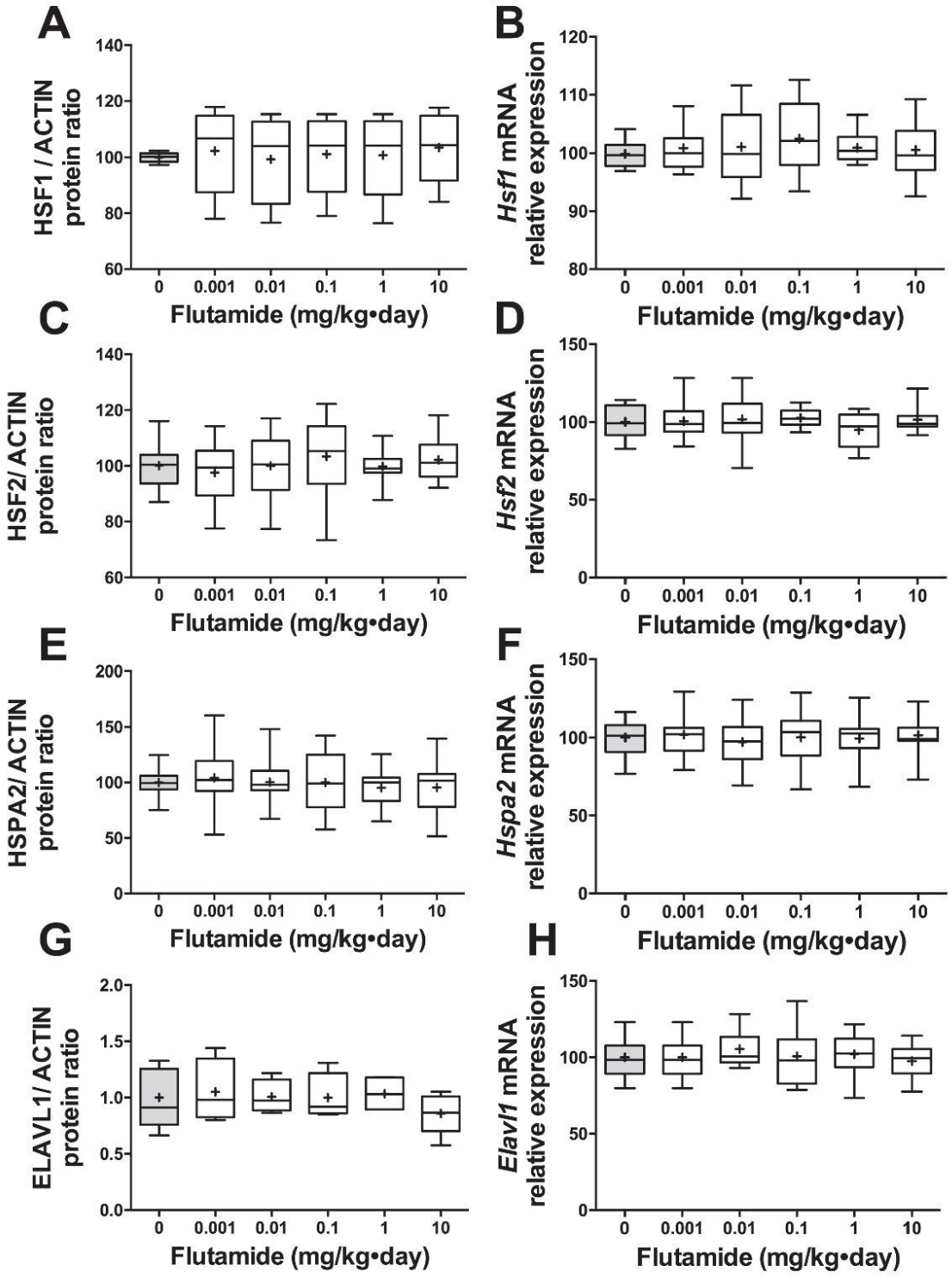

A
HSF1 / ACTIN protein ratio
B
Hsf1 mRNA relative expression
C
HSF2/ ACTIN protein ratio
D
Hsf2 mRNA relative expression
E
HSPA2/ ACTIN protein ratio
F
Hspa2 mRNA relative expression
G
ELAVL1/ ACTIN protein ratio
H
Elavl1 mRNA relative expression
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 14

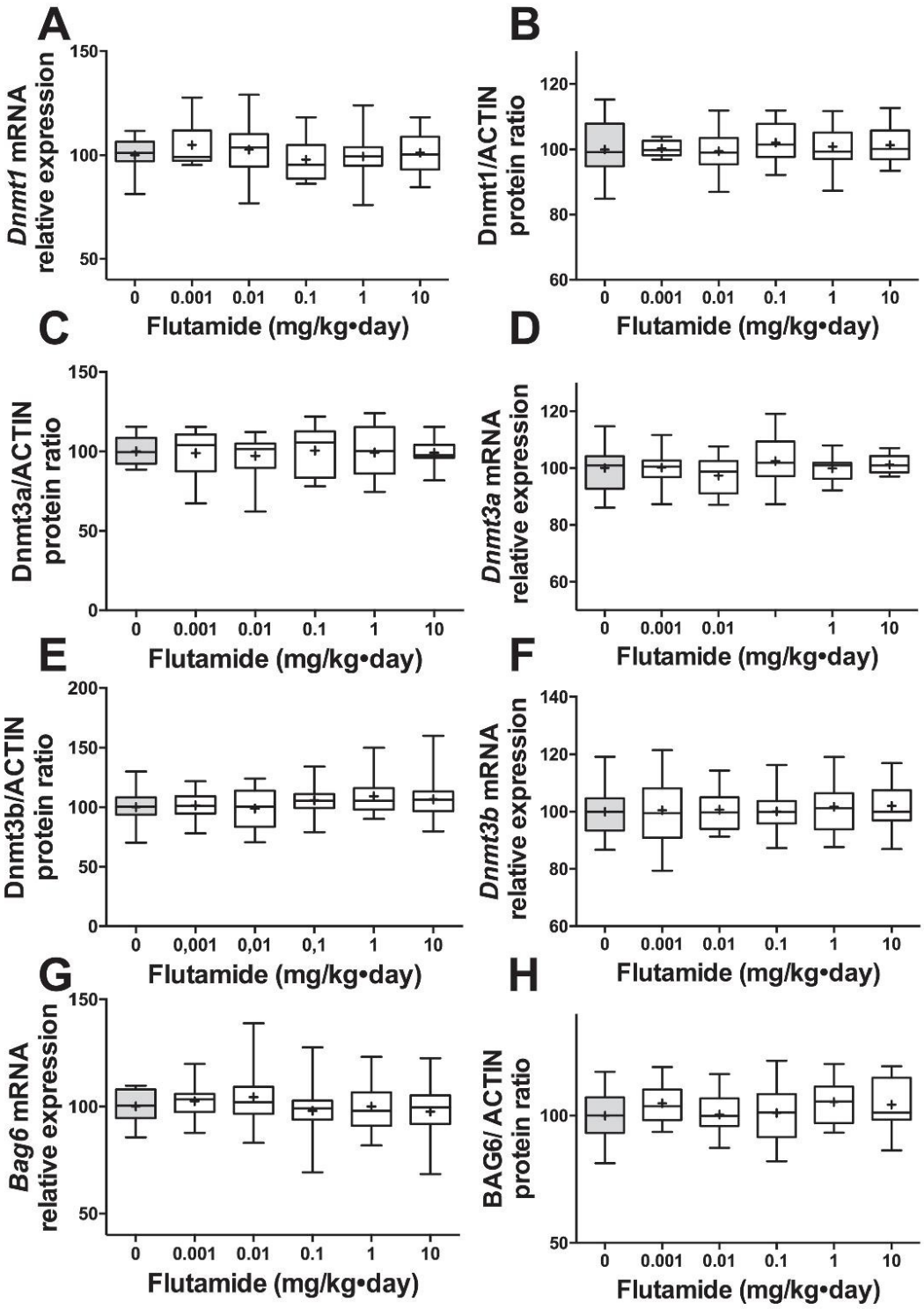

A
Dnmt1 mRNA relative expression
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
B
Dnmt1/ACTIN protein ratio
120
100
80
60
C
Dnmt3a/ACTIN protein ratio
D
Dnmt3a mRNA relative expression
E
Dnmt3b/ACTIN protein ratio
200
0,001
0,01
0,1
F
Dnmt3b mRNA relative expression
140
G
Bag6 mRNA relative expression
H
BAG6/ ACTIN protein ratio

Figure 15

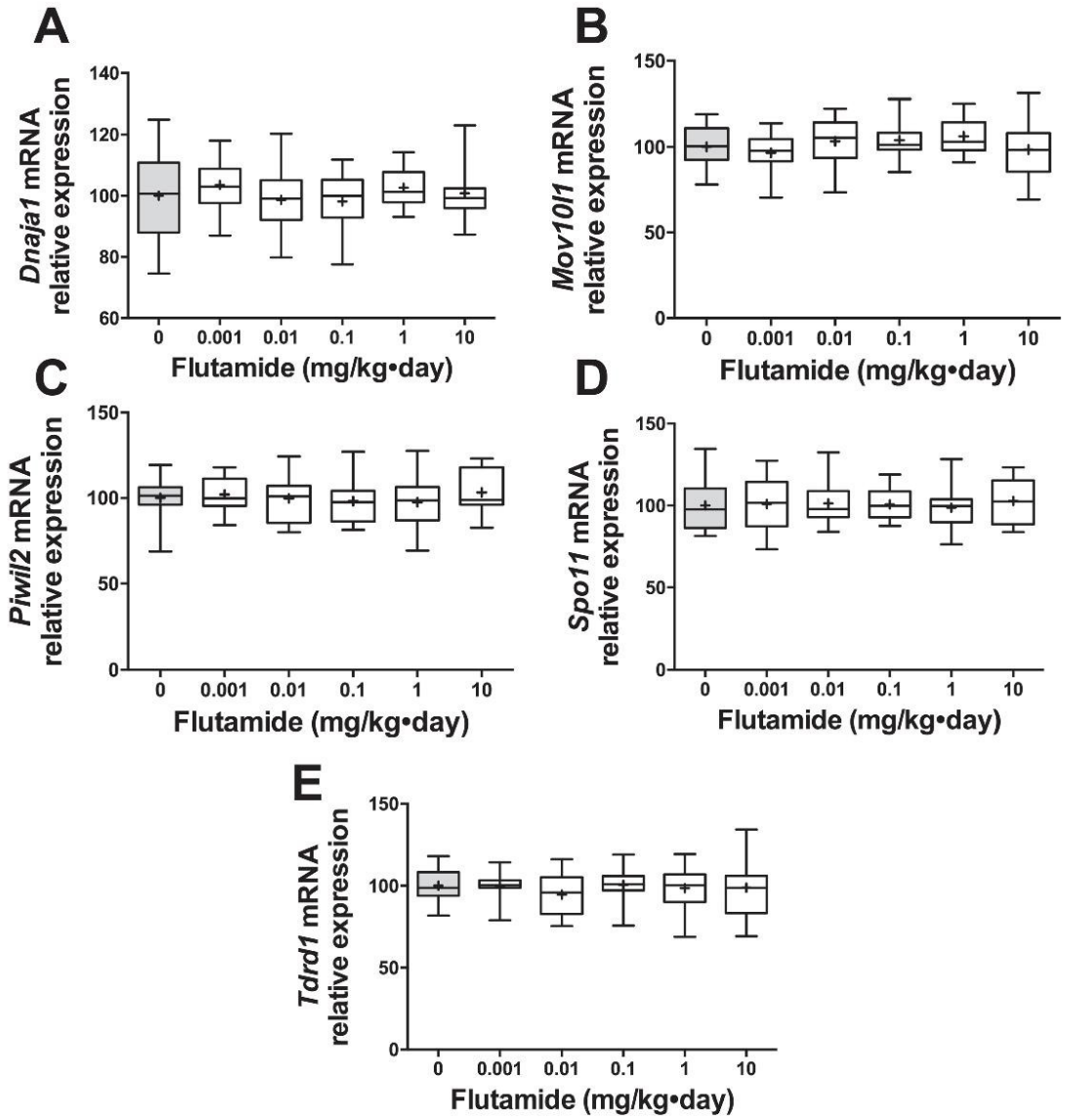

A
Dnaja1 mRNA relative expression
140
120
100
80
60
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
B
Mov10l1 mRNA relative expression
150
100
50
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
C
Piwil2 mRNA relative expression
150
100
50
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
D
Spo11 mRNA relative expression
150
100
50
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)
E
Tdrd1 mRNA relative expression
150
100
50
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Flutamide (mg/kg•day)

Figure 16

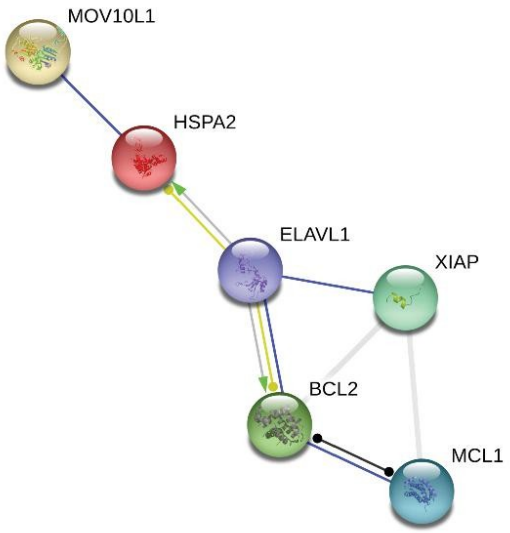
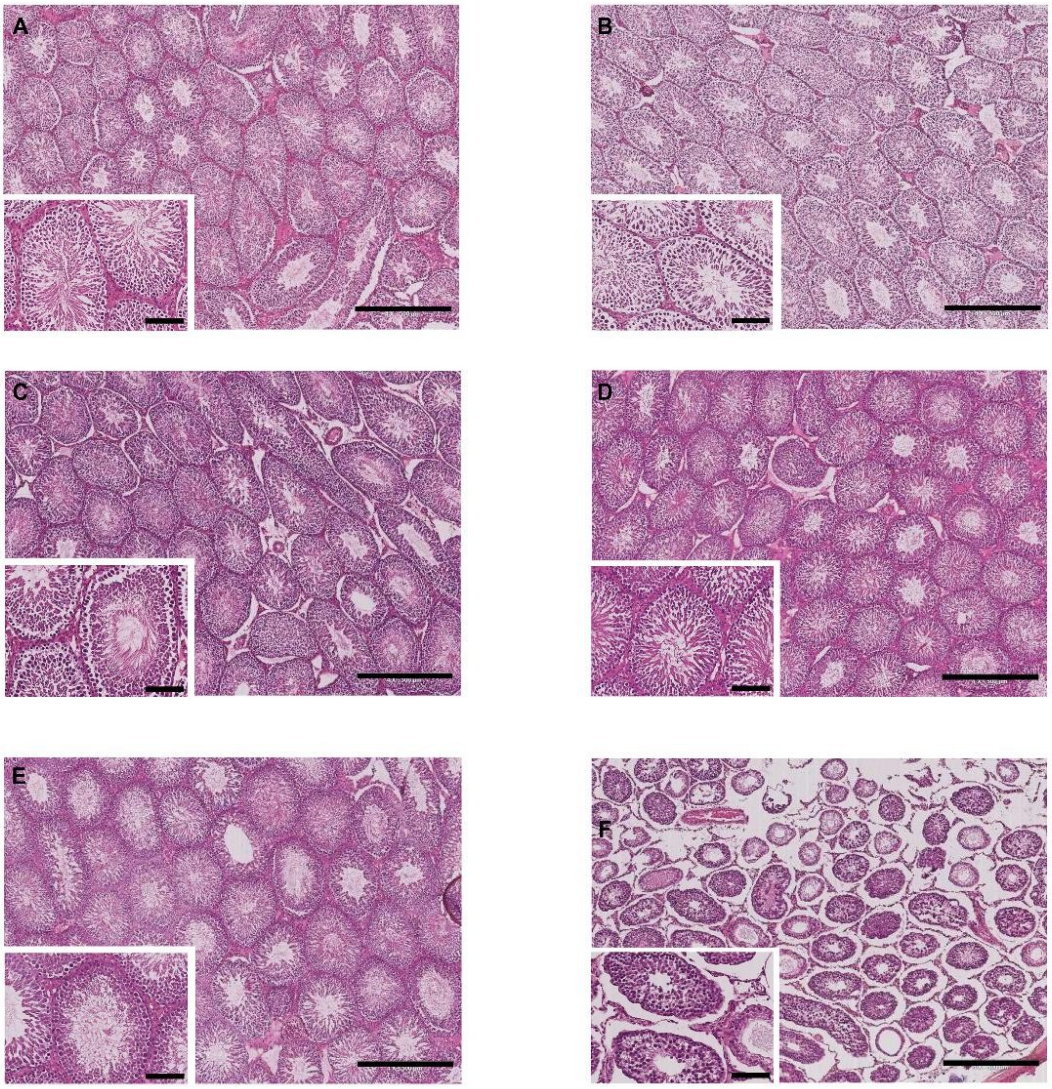
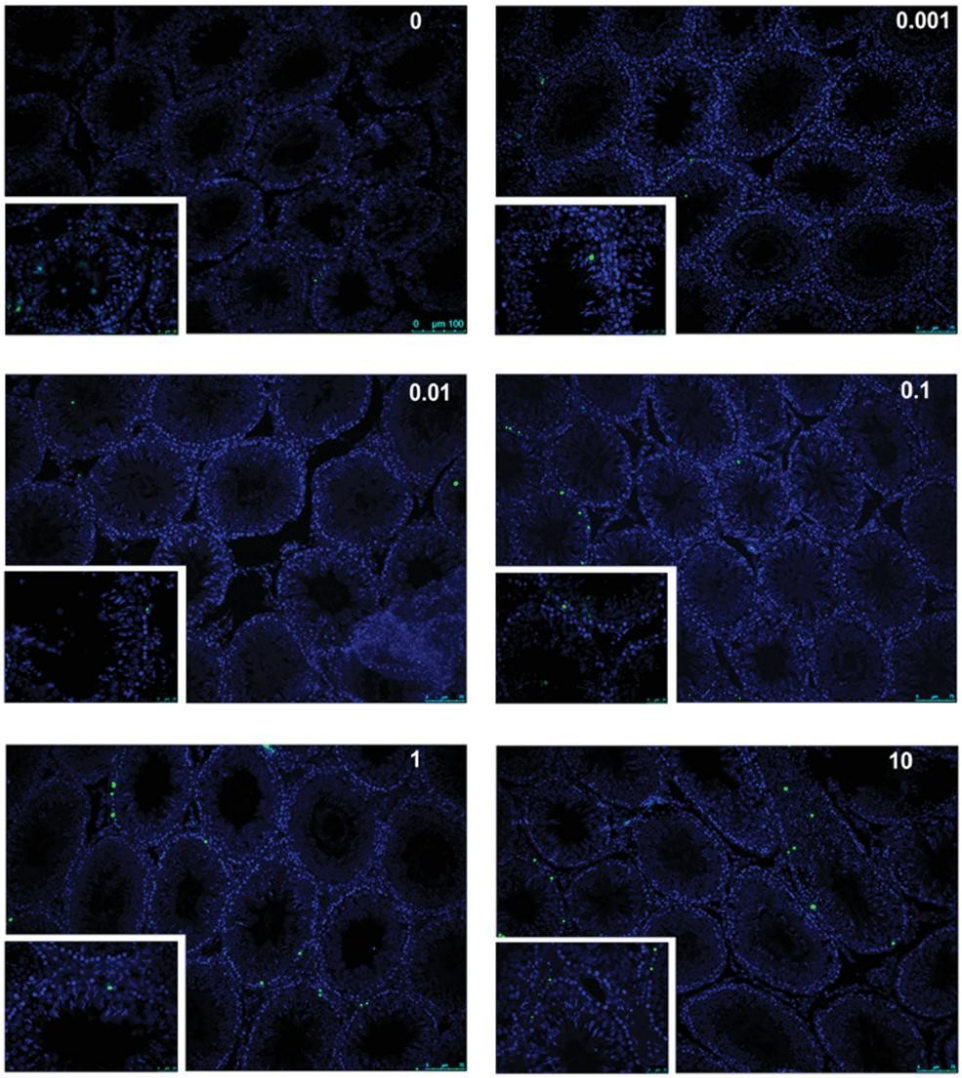


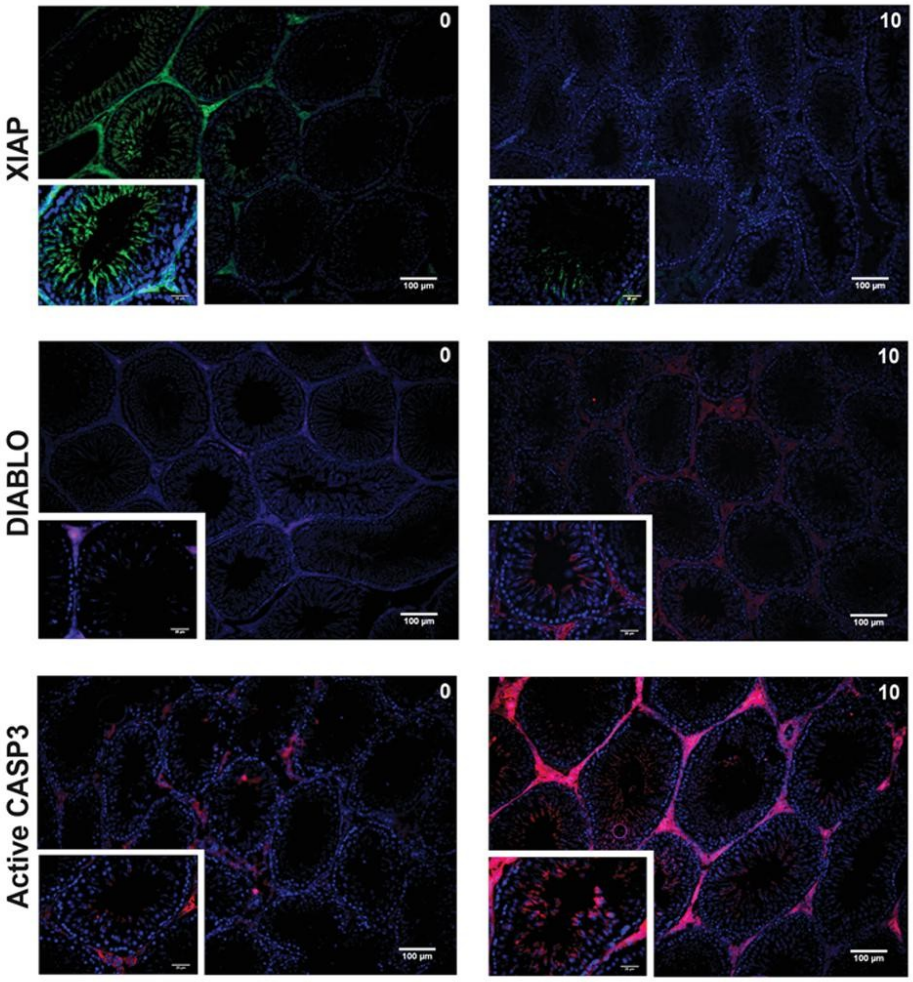
Figure 17



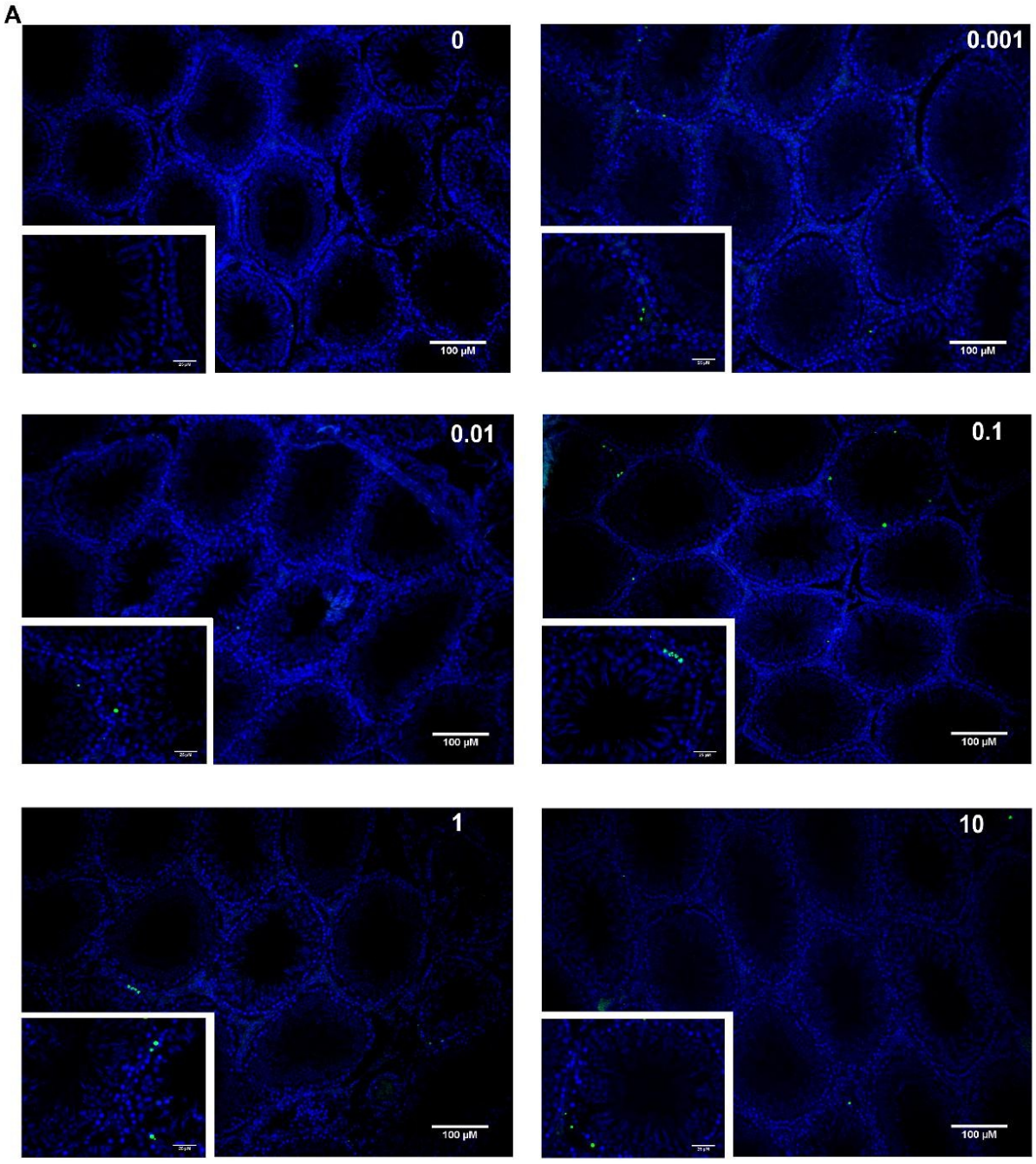
Supplemental data 1



Supplemental data 2



Supplemental data 3



Supplemental data 4

3- Résultats complémentaires à l'article: Régulation épigénétique de l'apoptose des cellules germinales par les miARNs lors d'une exposition fœtale aux faibles doses de flutamide:

Dans l'article soumis nous avons montré que lorsque le rat mâle est exposé durant sa vie fœtales à des faibles doses de flutamide (inférieures à la NOAEL), il développe à l'âge adulte une apoptose des cellules germinales. Cette apoptose se caractérise par un dérèglement de la balance des effecteurs anti et pro-apoptotiques sous l'effet des effecteurs de la voie de réponse au choc thermique. Plus précisément, à la plus faible dose testée (0.001mg/kg/j), une altération de l'expression protéique, de HSPA2 et de sa protéine régulatrice ELAVL1 est observée.

Du fait de l'altération de l'expression protéique, mais pas génomique, de HSPA2, nous avons évoqué un mécanisme de régulation de type épigénétique par miARs. La régulation par miARN intervenant post transcriptionnellement.

Nous avons dosé tout d'abord deux familles de miARNs connues pour réguler les HSFs. Les miARNs-29a, b et c qui régulent, indirectement HSF1 via les DNMTs, et le miARN-18a qui régule HSF2 (Leurs mécanismes sont détaillés dans l'article 2 en annexes).
Les résultats ont montré que l'expression des miARNs-29 n'est pas altérée après une exposition au flutamide (fig.46). Il en est de même pour l'expression des DNMTs (fig.47).
Le dosage du miARN-18a a été effectué par puce à miARNs dans le cadre d'un travail de notre équipe qui n'est pas encore publié. L'expression de ce miARN n'est altérée qu'aux fortes doses de flutamide et ne peut donc pas expliquer les effets que nous observons aux plus faibles doses (résultats non montrés).

Nous avons alors évoqué un autre miARN ciblant directement ELAVL1, le miARN-125a. Des analyses *in silico* confirment que ce miARN se fixe sur le 3'UTR d'ELAVL1. Le dosage de ce miARN montre une altération aux doses les plus fortes (1 et 10mg/kg/j) (fig.46).

En conclusion, les miARNs que nous avons dosés semblent peu ou pas impliqués dans la réponse aux **faibles doses** de flutamide dans le cadre d'une exposition *in utero*. Ils interviendraient plutôt aux doses les plus élevées aggravant ainsi les effets observés sur l'apoptose.

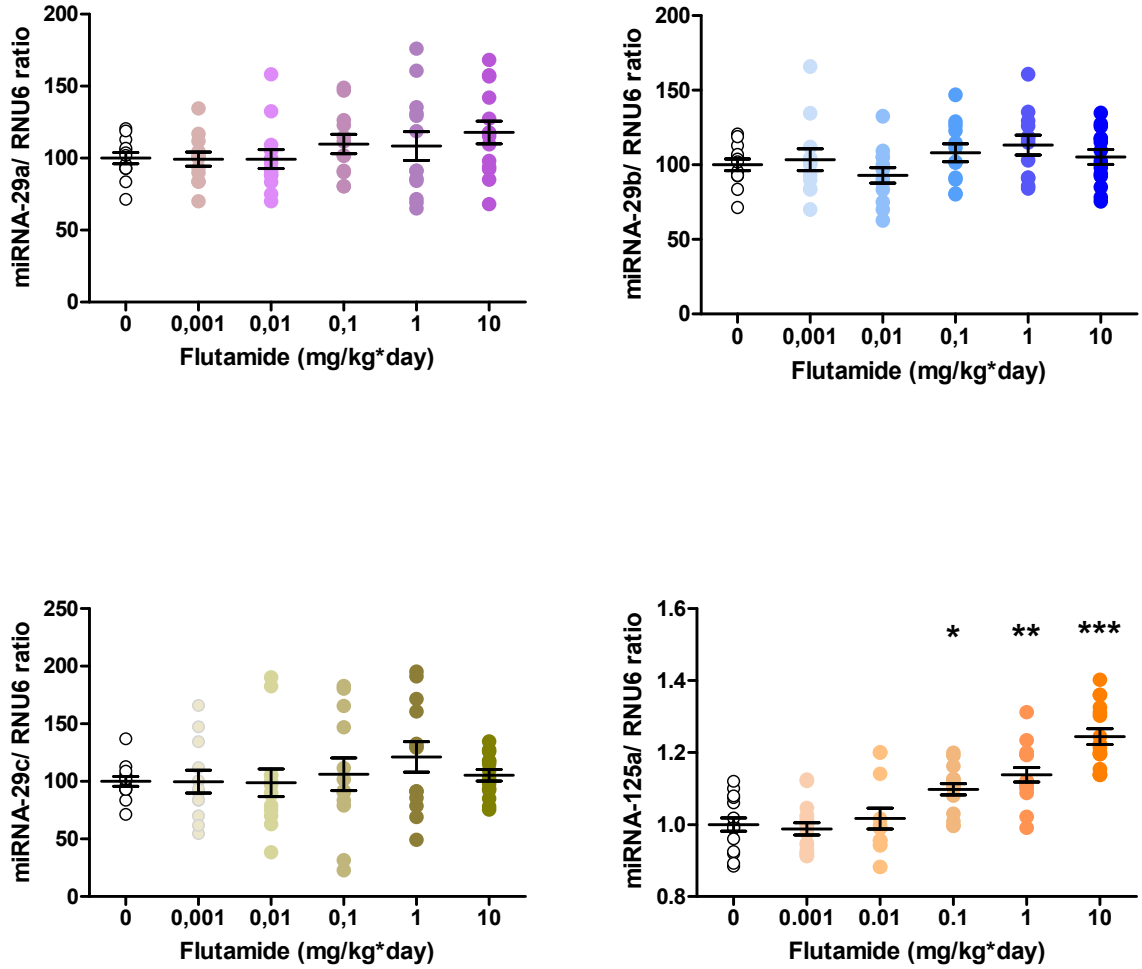


Figure 46: *Expression des miARNs-29a, b et c et du miARN-125a après exposition in utero au flutamide par rapport à l'expression du miARN de ménage RNU6.*

Les résultats sont présentés en variance, la moyenne est représentée par la ligne horizontale dans chaque nuage de point.

** p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001*

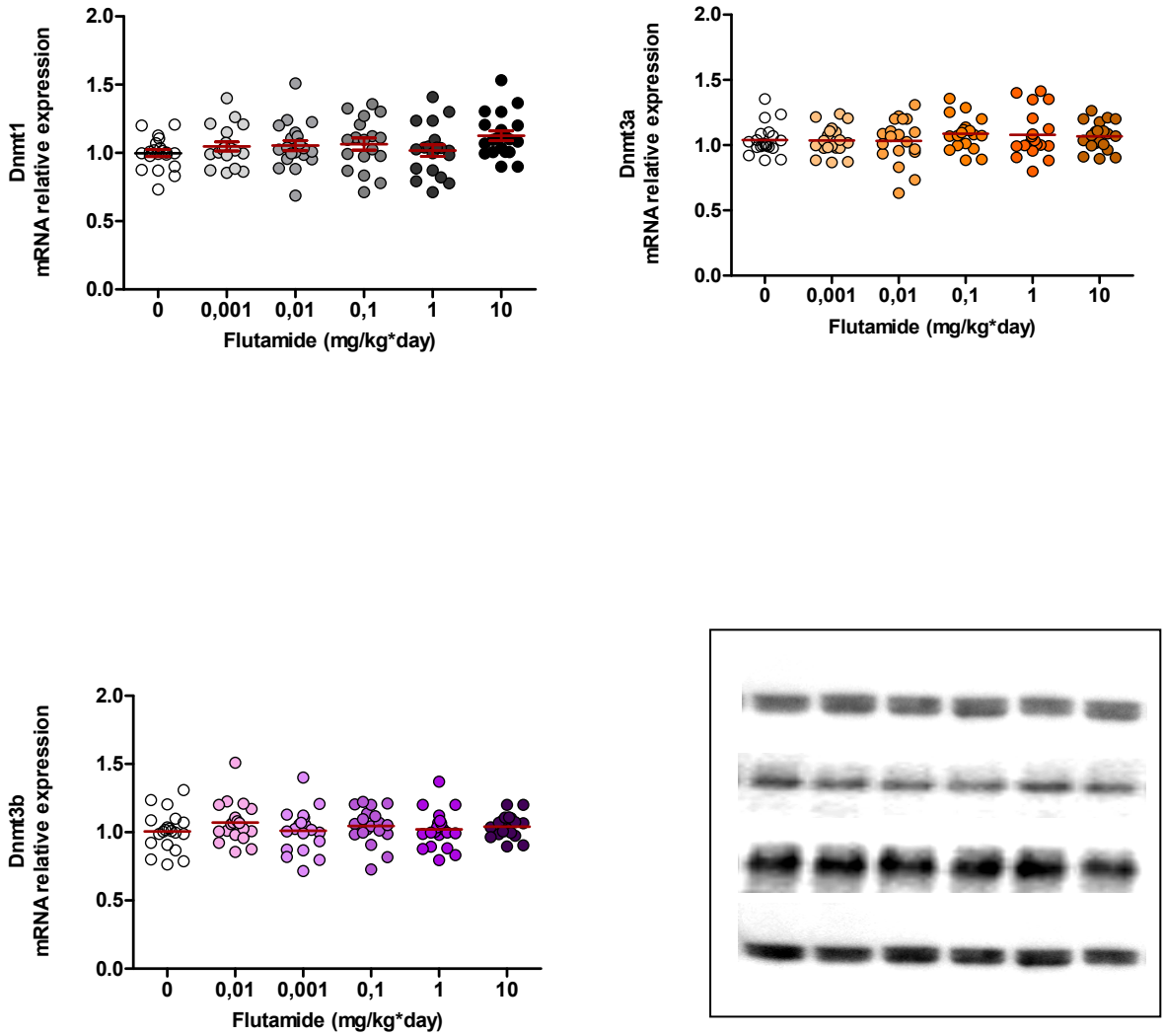


Figure 47: *Expression des DNMT a, b et c après exposition in utero au flutamide*

Les résultats sont présentés en variance, la moyenne est représentée par la ligne horizontale dans chaque nuage de point Les expressions protéiques sont représentées par les blots respectifs de dnmt1, dnmt3a, dnmt3b et de l'α-tubuline

DISCUSSION

Au cours des dernières décennies, des études épidémiologiques, ont mis en évidence une recrudescence des pathologies affectant le tractus génital mâle. Ces pathologies regroupées sous le terme de syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT) [70] englobent des malformations du tractus génital (hypospadias et cryptorchidies), une baisse de la qualité spermatique et des tumeurs germinales testiculaires. L'origine du SDT serait une exposition croissante de l'homme à des contaminants environnementaux naturels mais surtout chimiques qui altèrent le système endocrinien endogène. Il s'agit des perturbateurs endocriniens (PEs). Au début des années 2000, l'OMS a reconnu les effets potentiels des PEs sur des populations "à risque" telles que les femmes enceintes, le fœtus ou les enfants. En 2009, la «Endocrine Society» publiait le premier «Scientific Statement on EDCs» synthétisant sur les données épidémiologiques et expérimentales publiées sur les PEs [485] et listant une série de questions ouvertes.

A partir de ces éléments, pour le SDT, nous nous sommes focalisée sur deux aspects:

1- La notion de faibles doses. La grande majorité des études menées sur les effets des PEs sur la fonction de reproduction, utilisent des doses supérieures ou proches de la LOAEL ne reflétant pas l'exposition humaine. Une recherche dans Pubmed, avec pour mots clés "effet", "faibles doses" et "perturbateurs endocriniens", ressort 280 publications dont plus de la moitié issues des cinq dernières années. Ceci montre que la problématique des faibles doses est récente et insuffisamment documentée. En outre, seul un petit nombre d'études expérimentales associent les fenêtres d'exposition critiques (exposition péri-natale) et l'analyse des effets des faibles doses d'un PE (doses inférieures ou égales à la NOAEL). Or dans les documents de synthèse émanant de l'OMS ou de «l'Endocrine Society», les PEs ont contribué à la remise en question de la centralité de la dose au profit des vulnérabilités individuelles, des mélanges des substances, de la durée d'exposition ou de la dose elle même [589, 590].

2- Les mécanismes de programmation de l'infertilité masculine. Le SDT englobe des altérations visibles à la naissance (hypospadias, cryptorchidies) mais aussi des pathologies identifiées à l'âge adulte, soit de nombreuses années après l'exposition délétère; les molécules toxiques responsables ne sont alors plus détectables dans l'organisme. Cet état de fait nécessite des preuves plus nombreuses pour établir un lien entre la pathologie et l'exposition. Dans ce contexte, les études de DJ Barker en 1989 ont apporté un concept novateur dans la médecine moderne. L'analyse de différentes cohortes de patients a permis à ce chercheur de faire un lien entre exposition lors de la grossesse à un évènement délétère (la restriction

calorique) et pathologie chronique se déclarant à l'âge adulte (les maladies coronariennes) [681]. Ce concept s'applique aussi à l'exposition aux PEs comme l'ont montré les études sur les effets sur les enfants issues de mères à qui l'on avait administré du DES lors de la grossesse [472-476]. C'est pour cela qu'il nous semblait important d'apporter des preuves expérimentales, notamment mécanistiques, pour l'application de ce concept à la programmation de l'infertilité masculine.

Lors de mon travail de thèse. nous avons étudié l'effet, sur le **testicule de rat adulte**, d'une exposition à de **faibles doses** d'une molécule à activité antiandrogénique: le **flutamide**. Pour se faire, deux protocoles expérimentaux permettant l'analyse de deux fenêtres d'exposition (***in utero*** et à l'âge **adulte**) ont été mis en place.

La discussion des résultats obtenus lors de cette thèse s'articulera autours de quatre points essentiels: (1) la validation du modèle expérimental comme étant isomorphique, (2) l'identification de mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'exposition ***in utero*** aux **faibles doses** lors de flutamide, (3) la mise en évidence de la programmation développementale de l'hypospermatogenèse adulte via des mécanismes épigénétiques et enfin, (4) nous discuterons l'observation de courbes non monotone induite par les faibles doses d'anti-androgène lors de l'exposition *in utero*.

1- Génération d'un modèle isomorphique pour l'étude de l'exposition développementale aux PEs de type antiandrogènes:

Les PEs de type œstrogèno-mimétiques ou antiandrogènes sont les composés les plus fréquemment retrouvés dans notre environnement quotidien. Le tractus génital mâle étant largement sous le contrôle des androgènes, nous nous sommes focalisé sur les PEs de type antiandrogènes, et avons choisi comme molécule représentant ces PEs, le flutamide. Cette molécule est un antiandrogène utilisé dans le traitement du cancer de la prostate. Même si le flutamide n'est pas à proprement parler un antiandrogène environnemental tels que les pesticides (vinclozoline, prochloraz...) ou les plastifiants (phtalates...), l'étude de ses effets est pertinente à plus d'un point. En effet, dans la nature, nous somme exposés à un mélange de PEs. La combinaison de leurs effets est évaluée en mesurant, via des bioassays, la concentration équivalente de flutamide (FEQ) [553]. De plus, cet antiandrogène standard est

bien caractérisé au niveau de certains de ses effets adverses testiculaires (à 10mg/kg/j) et NOAEL (1 mg). Ainsi, les faibles doses de flutamide que nous avons choisies (3 dilutions de la NOAEL 0.1 (100); 0.01 (10); 0.001 (1) mg (µg)/kg/j), correspondent à une exposition humaine potentielle à un mélange de molécules antiandrogènes environnementales. Par exemple, l'eau de la rivière Shinjing en Chine contient de 103 à 935 µg/L de FEQ, représentant une exposition quotidienne à un mélange antiandrogène de 15µg/kg pour une femme enceinte [553]. Notre modèle évalue donc l'effet de faibles doses d'antiandrogènes, soit la résultante en bioactivité d'un mélange d'antiandrogènes présents dans l'environnement.

Pour mimer l'exposition développementale humaine, nous avons généré **un modèle d'exposition *in utero* du 10ème au 21ème jour de gestation**. Cette fenêtre d'exposition chez le rat correspond, chez l'homme, à la période particulièrement critique de la différenciation testiculaire (41ème jour post-conception), de l'organogenèse et de l'organisation du tractus génital mâle (8-14ème semaine de gestation) ainsi que de la descente testiculaire (3ème trimestre).

Depuis la fin des années 1990, avec les travaux pionniers de l'équipe de Gray L.E. Jr [682], les effets morphologiques des PEs de type antiandrogènes, dont le flutamide, avaient été identifiés à de fortes doses, égales ou supérieures à la LOAEL.

Comme attendu, une exposition *in utero* au flutamide induit des anomalies développementales majeures du tractus génital mâle à l'âge adulte. Une exposition *in utero* de 11 jours à 10mg de flutamide/kg/j induit une augmentation significative des cryptorchidies et une diminution du poids des vésicules séminales et de la prostate ventrale à l'âge adulte. Si le poids du testicule reste inchangé, nous observons néanmoins une diminution du compte spermatique et du diamètre des tubules séminifères signant un effet antiandrogène testiculaire. Nos données, résumées dans le tableau 16, sont en accord avec la littérature [569, 570, 573, 683, 684]. Il est intéressant de noter que la diminution du poids des organes androgéno-dépendants n'est pas liée à une diminution du taux de testostérone sérique [569, 683]. En d'autres termes, la testostérone plasmatique (mais aussi les gonadotrophines) ne sont pas des signatures de l'exposition développementale aux antiandrogènes. Cette observation souligne le manque de marqueurs, à l'âge adulte, de l'exposition périnatale aux PEs. Toutefois, si le niveau des hormones n'est pas altéré, l'exposition durant la vie fœtale au flutamide altérerait le signal androgène ce qui obère par exemple la fonction des cellules de Sertoli [573].

Dose de flutamide (mg/kg/j)	0.001	0.01	0.1	1	10
Effets Morphologiques					
cryptorchidie (0% à 0 mg flutamide)	15%	16%	16%	5%	43%
Poids total	NS	NS	NS	NS	NS
Poids relatif testiculaire	NS	NS	NS	NS	NS
Poids relatif de la prostate ventrale	NS	NS	NS	NS	95% D
Poids relatif des vésicules séminales	NS	NS	NS	NS	32% D
Compte spermatique	NS	NS	NS	NS	40% D
Sperme viabilité	NS	NS	NS	NS	30% D
Diamètre des tubes séminifères	NS	NS	NS	NS	20% D
Effets Cellulaires et moléculaires					
Nombre de cellules tunel positives	NS	NS	NS	A.7 A	2.2 A
Mcl1 taux protéique	NS	NS	NS	28% D	28% D
Mcl1 mRNA	D	D	NS	NS	D
BCL2 mRNA	58% D	D	D	D	D
XIAP taux protéique	46%D	D	D	D	D
CASP3 taux protéique	NS	NS	NS	A 1-4	A 1-4
Casp3 mRNA	NS	NS	NS	A 1-8	A 1-8
BAX taux protéique	NS	NS	A 1-4	A	A
Bax mRNA	NS	NS	NS	A 1-5	A
DIABLO taux protéique	A	NS	NS	A 1-6	A
Diablo mRNA	NS	NS	NS	A 1-3	A
HSF1 taux protéique	A 1-4	NS	NS	A	A
Hsf1 mRNA	NS	NS	NS	A	A
HSF2 taux protéique	NS	NS	NS	NS	D 29%
Hsf2 mRNA	NS	NS	NS	NS	NS
HSPA2 taux protéique	D	D	D	D	D 60%
Hspa2 mRNA	NS	NS	NS	NS	NS
ELAVL1 taux protéique	D	NS	D	D	D
Elavl1mRNA	D	D	D	D	D
BAG6 taux protéique	NS	NS	NS	NS	D 30%
Bag6 mRNA	NS	NS	NS	NS	NS
Autres facteurs régulés par HSF1					
Tdrd1 mRNA	NS	NS	NS	NS	NS
PiwiL2 mRNA	NS	NS	NS	NS	NS
Dnaja1/Hsp40A1 mRNA	NS	NS	NS	NS	NS
Spo11 mRNA	NS	NS	NS	D	D
Mov10l1 mRNA	D	D	D	D	D

Tableau 16: *Résumé des données obtenues sur les testicules de rats adultes traités in utero au flutamide.*

(NS : non significatif, D : diminution de l'expression, A : Augmentation de l'expression).

Une exposition *in utero* aux anti-androgènes (flutamide mais aussi phthalates, vinclozoline, prochloraz, procymidone, linuron, conazole et ppDDE) induit d'autres effets morphologiques, que nous avons pu observer mais que nous n'avons pas investigués, tels qu'une augmentation de la rétention des mamelons et une diminution de la distance ano-génitale [562, 569]. Cette dernière anomalie (observée à la naissance et/ou à la puberté) est considérée comme un bon marqueur des activités PEs antiandrogèniques pour identifier leurs LOAEL/NOAEL. De plus, la diminution de la distance ano-génitale est une anomalie précoce qui serait prédictive d'autres altérations du SDT comme la diminution du compte spermatique et le cancer testiculaire [671]. Toutefois, la mesure de la distance ano-génitale ne peut reconnaître les effets faibles doses.

Les altérations testiculaires macroscopiques sont liées à des anomalies cellulaires. En effet, l'hypospermatogenèse chez l'animal adulte est liée à une apoptose chronique des cellules germinales méiotiques et post méiotiques que nous avons observée dès la NOAEL (1mg/kg/j). Une exposition fœtale à un autre composé anti-androgène, la vinclozoline, induit aussi une apoptose des cellules germinales adultes chez la souris [677]. Les cellules somatiques quant à elles ne semblent pas affectées par le processus apoptotique. Nos résultats sont en corrélation avec ce qui a été observé dans la littérature pour une exposition de la même durée au flutamide [569]. Ainsi, à la dose maximale testée, l'hypospermatogenèse, objectivée par une diminution du compte spermatique, est associée à une augmentation significative de l'apoptose des cellules germinales, ce qui montre un effet délétère des antiandrogènes à cette dose. De nombreux arguments identifient une altération de la fertilité mâle lorsque l'apoptose des cellules germinales est élevée. Ainsi, des souris génétiquement modifiées pour des molécules pro (Bax) ou anti-apoptotiques (Bcl2, Hspa2, bclw...) sont stériles. Chez l'homme, l'augmentation de la fragmentation de l'ADN ou du marquage de la protéine pro-apoptotique FAS dans les spermatozoïdes sont associés à l'infertilité [685].

En somme, une exposition *in utero* à 10 mg/kg/j de flutamide induit des effets morphologiques à l'âge adulte, validant notre modèle expérimental par rapport à la littérature et comme modèle isomorphique d'une hypospermatogenèse ayant une origine développementale. De plus, une exposition *in utero* à cette dose (10 mg/kg/j) ou à la NOAEL (1 mg/kg/j) de flutamide induit une apoptose chronique des cellules germinales à l'âge adulte. Notre modèle expérimental nous permet d'identifier un phénotype morphologique et cellulaire à l'exposition *in utero* aux anti-androgènes. Nous observons un continuum permettant de conclure que l'apoptose est à l'origine de l'hypospermatogenèse adulte.

2- L'exposition *in utero* au flutamide induit une hypospermatogenèse irréversible à l'âge adulte: mécanismes moléculaires.

L'apoptose chronique des cellules germinales est corrélée à des anomalies moléculaires du système de mort cellulaire. Ainsi, l'exposition *in utero* au flutamide induit dans le testicule adulte une augmentation du taux des protéines pro-apoptotiques (aCASP3, BAX, DIABLO) à la NOAEL et une diminution des protéines anti-apoptotiques (MCL1, BCL2) dès la plus faible dose testée (NOAEL/1000). Ces données approfondissent des observations précédentes faites dans le laboratoire montrant une activation de la CASP3 dès la dose de 0,4 mg/kg/j [569]. L'exposition *in utero* à un autre antiandrogène, la vinclozoline, induit aussi une apoptose des cellules germinales qui a été associée à une augmentation de l'expression de TP53 et de P21 [677], molécules impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

De la même manière, et pour approfondir notre travail, nous avons cherché, en amont, quelles voies de signalisation étaient associées à la dérégulation de l'apoptose des cellules germinales.

La voie des protéines de choc thermique (HSR) semblait intéressante car elle est cruciale pour le développement et le fonctionnement normal de la gonade mâle et la survie des cellules germinales. En effet, une altération de cette voie chez les souris génétiquement modifiées, induit une mort massive des cellules germinales chez le mâle [278, 279, 293, 321]. La voie HSR, via ses facteurs de transcription HSF1 et HSF2, régule l'expression des protéines de choc thermique comme HSPA2 (anciennement HSP70-2). Chacun de ces effecteurs est indispensable à une spermatogenèse normale. Ainsi, par exemple, des souris mâles surexprimant HSF1 dans le testicule sont infertiles à cause d'une apoptose massive de cellules germinales [265, 276, 277]. L'exposition *in utero* au flutamide mime le modèle précédent puisque nous montrons une augmentation de l'expression d'HSF1 associée à la diminution de certains de ses gènes cibles (Spo11, Mov10L1) dont il represse l'expression. Spo11, qui intervient dans la recombinaison méiotique, et Mov10L1, dans la répression des éléments transposables (dont line-1), sont impliqués dans des processus majeurs pour la formation des gamètes mâles [278, 686].

L'exposition *in utero* aux antiandrogènes diminue aussi l'expression protéique d'HSPA2 à toutes les doses testées. La chute dramatique d'HSPA2 expliquerait en partie l'apoptose chronique des cellules germinales adultes puisque l'invalidation de HSPA2 induit une infertilité chez la souris mâle par apoptose des cellules germinales ainsi qu'une diminution de

la qualité du sperme [313]. De plus, le lien entre la voie HSR et l'altération de la spermatogenèse a aussi été démontré chez l'homme. En effet, le niveau d'HSPA2 est diminué dans le plasma de patients infertiles de même qu'une mutation non-sens (R502H) de HSF2 induit une perte de fonction a été identifiée chez des patients ayant une azoospermie idiopathique [288]. L'expression transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de HSPA2 est aussi régulée par HSF2, BAG6 et ELAVL1. Dans notre modèle, nous observons que la chute d'expression de HSPA2 est associée à celle de HSF2 et BAG6 uniquement à la plus forte dose, alors que l'expression d'ELAVL1 est diminuée à toutes les doses testées. Ces données suggèrent que l'exposition *in utero* au flutamide programme une dérégulation post-transcriptionnelle (via ELAVL1) d'HSPA2. L'infertilité des souris mâles cKO pour ELAVL1 associée à une chute d'expression de HSPA2 et une augmentation de l'apoptose des cellules germinales renforce nos conclusions [687].

Ainsi, notre modèle expérimental nous permet d'identifier un phénotype morphologique, cellulaire et moléculaire avec un continuum pour certaines anomalies depuis la dose de 10mg/kg/j (phénotype morphologique), via la NOAEL (phénotype cellulaire) jusqu'à la NOAEL/1000 (phénotype moléculaire). En effet, l'expression de MCL1, BCL2, XIAP (pour l'apoptose) et ELAVL1, HSPA2 et MOV10L1 (pour la voie HSR) est altérée jusqu'à la NOAEL/1000. Ces observations appellent deux conclusions:

1- Les six molécules dont l'expression est altérée dès la plus faible dose appartiennent à des voies majeures pour le fonctionnement de la spermatogenèse (l'apoptose et la voie de réponse au choc thermique). De plus, ces six molécules appartiennent à un même réseau fonctionnel (Fig.48).

2- Ces données définissent une nouvelle fois la pertinence de notre modèle par rapport à l'exposition humaine. A titre d'exemple, l'eau de la rivière Shingy en Chine contient 103 à 9035ug/L de FEQ [553]. Ces valeurs sont couvertes par la gamme de doses utilisée dans notre modèle. Il y a bien, selon notre environnement, une réalité d'exposition humaine fœtale chronique à des antiandrogènes qui programme des altérations moléculaires dans le testicule adulte; la révélation de ces altération au niveau cellulaire (hypospermatogenèse /infertilité) dépend de la susceptibilité génétique (Single Nucleotide Polymorphism, SNP, par exemple) et du mode de vie (tabac, alcool, stress, nutrition, activité physique ...) mais aussi d'un potentiel "second hit" aux PEs puisque l'exposition humaine est chronique [688].

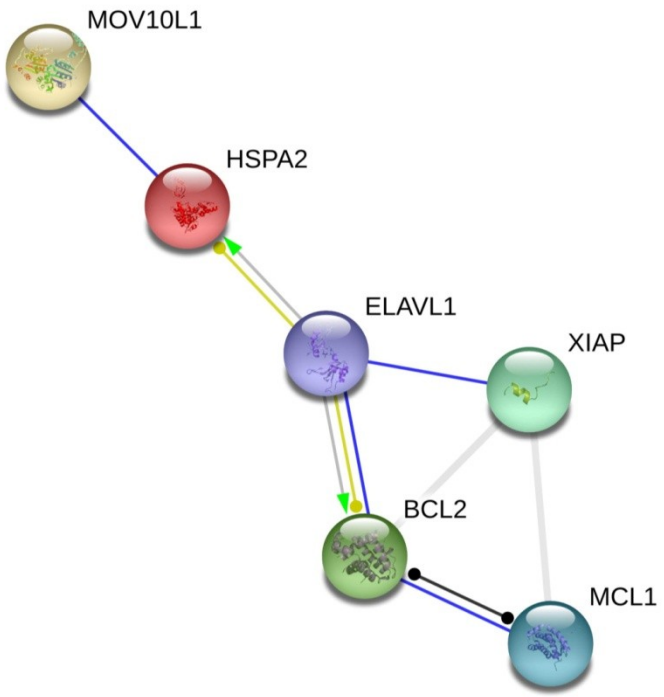


Figure 48: *Signature moléculaire des effets testiculaires persistants chez le rat adulte exposé in utero à de faibles doses de flutamide. (String network)*

Si nous avons décrypté ici des voies de signalisation qui étayent le phénotype d'infertilité/hypospermatogenèse induite par une exposition fœtale aux antiandrogènes, les mécanismes de cette programmation restent encore largement inconnus. Une hypothèse intéressante est la dérégulation des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, remodelage du code des histones, et plus largement régulation des ARNm par les petits ARNs non codants dont les microRNAs). Dans ce contexte, les travaux de l'équipe de McLachlan sur l'exposition fœtale au DES ont été précurseurs, en montrant qu'une exposition développementale aux PEs altère l'expression de gènes impliqués dans la régulation hormonale (EGF et lactoferrine) longtemps après la fin de l'exposition [689] et ce, par un mécanisme épigénétique de méthylation du promoteur [509, 690]. Depuis, plusieurs études ont montré les effets épigénétiques d'une exposition péri-natale aux PEs. Citons par exemple les études de Skinner et *al.* sur l'effet d'une exposition fœtale à la vinclozoline ou au méthoxyflor [336, 506, 508] et la modification des taux de méthylation dans les cellules germinales ou l'étude menée au sein de notre laboratoire sur l'effet d'une exposition néo-natale à l'EB et la modification du profil d'expression des DNMTs par la famille des miARNs-29 [154].

A partir de résultats précédents du laboratoire (article 2) nous nous sommes focalisé sur l'étude de microARNs qui réguleraient en amont HSF1 ou bien HSF2/HSPA2.

➢ **Voie: ↑miRNA-29 > ↓DNMTs > ↑HSF1 > apoptose accrue des cellules germinales.**

Les miRNAs-29 ciblent les DNMTs qui elles mêmes contrôlent la méthylation des promoteurs comme HSF1 ou MCL1 [236]. Toutefois, cette voie ne semble pas être mise en jeu dans notre modèle car l'expression des miRNA-29 a, b et c n'est pas affectée par l'exposition fœtale au flutamide, ni celle des DNMTs. En revanche, la dérégulation de la voie miR-29/DNMTs provoquant une hypométhylation du promoteur de HSF1, représenterait une voie de signalisation impliquée dans l'apoptose des cellules germinales conduisant à l'infertilité chez les rats adultes exposés pendant la période néonatale à un œstrogèno-mimétique (EB, résultats article 2, [154]).

➢ **Voie ↑miRNA-18a > ↓HSF2 > ↓HSPA2 > apoptose accrue des cellules germinales**

Durant la spermatogenèse, HSF2 est régulé post-transcriptionellement par le miR-18a appartenant au cluster de l'oncomiR-1 [691]. Le flutamide, contrairement à l'EB ne semble pas avoir un effet sur cette voie de signalisation. En effet, les résultats d'une puce à ADN, effectuée au sein de notre laboratoire, confirmés par RT-qPCR ne montrent aucune modification du miRNA-18a après une exposition périnatale au flutamide (résultats non présentés). En revanche, l'apoptose des cellules germinales induite par une exposition néonatale aux estrogéno-mimétiques mobilise cette voie (article 2).

L'ensemble de ces données suggère que les antiandrogènes et les œstrogéno-mimétiques induisent l'apoptose chronique des cellules germinales par des voies différentes.

➢ **Voie ↑miRNA-125> ↓ELAVL1 > ↓HSPA2 > apoptose accrue des cellules germinales**

L'expression de la protéine ELAVL1 est sous le contrôle du miARN-125a [692] dont l'expression semble sensible aux androgènes [693]. Une exposition fœtale au flutamide

augmente l'expression du miARN-125a dans le testicule adulte suggérant cette voie de signalisation comme mécanisme d'action potentiel du flutamide.

En somme, nous avons décrypté des mécanismes moléculaires liés à l'exposition fœtale aux antiandrogènes responsables du phénotype cellulaire (apoptose chronique des cellules germinales adultes/hypospermatogenèse) représentés par le schémas de la figure 49:

↑HSF1> ↓SPO11 (altération de l'assemblage des chromosomes, blocage de la progression vers le stade zygotène), ↓MOV10L1 (levée de la répression des rétrotransposons, arrêt de la spermatogenèse > apoptose

↑miR-125a> ↓ELAVL1> ↓HSPA2> apoptose

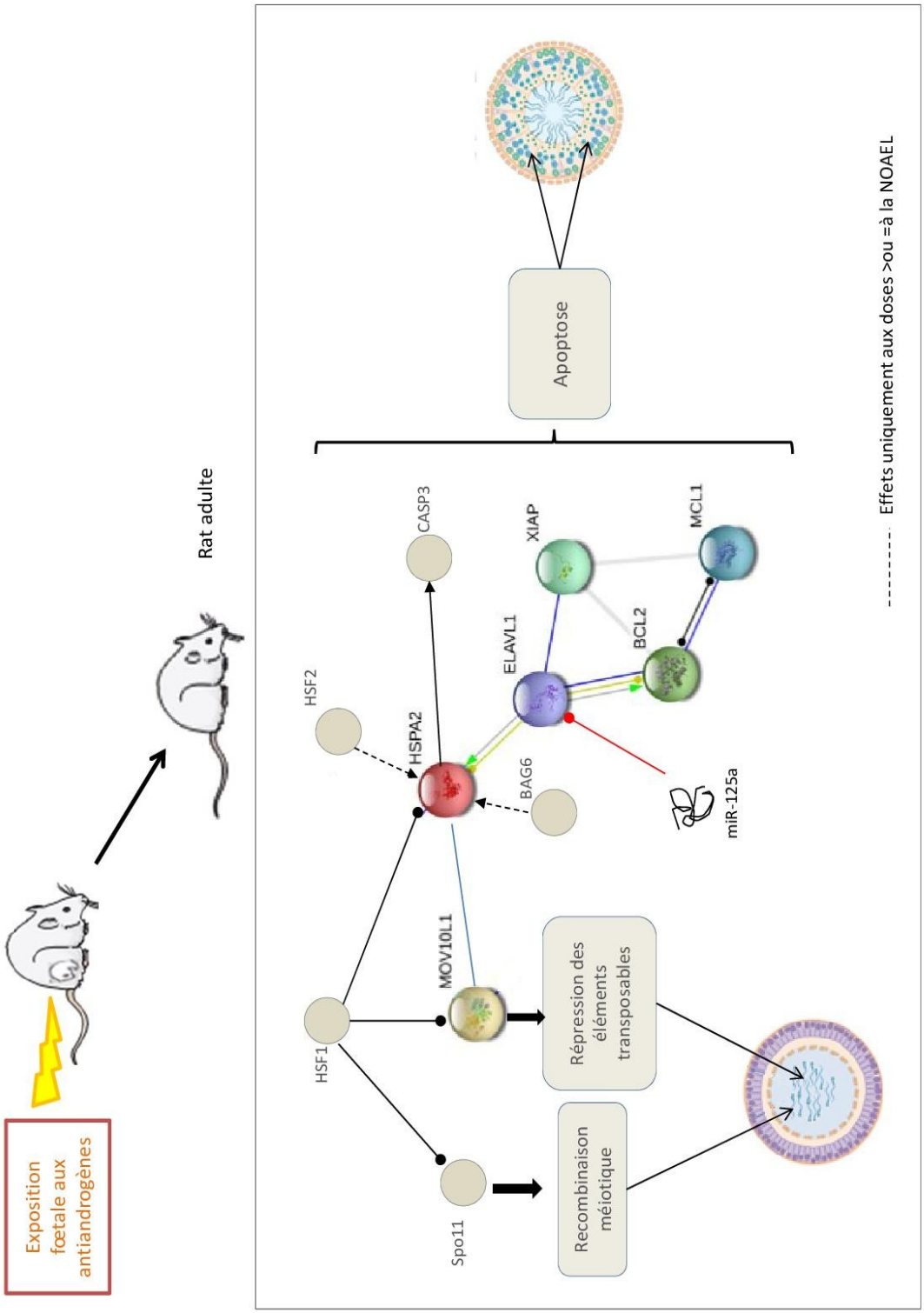


Figure 49: *Schémas Récapitulatif des voies de signalisations impliquées dans le phénotype d'hypofertilité chez le rat adulte exposé in utero aux faibles doses de flutamide.*
(Les traits en pointillés représentent des effets observés mais uniquement à partir de la NOAEL)

3- L'exposition au flutamide à l'âge adulte induit des effets réversibles: notion de programmation développementale d'une pathologie adulte

Le phénotype d'apoptose chronique des cellules germinales et d'hypospermatogenèse induit par une exposition fœtale aux antiandrogènes doit être envisagé comme la programmation développementale d'une pathologie adulte. En effet, nous montrons que les effets de l'antiandrogène sont irréversibles lorsque l'exposition a lieu *in utero* alors que les effets sont réversibles lors d'une exposition adulte puisque les altérations morphologiques, cellulaires et moléculaires ne sont plus observées deux mois après l'arrêt du traitement. Ces données confirment les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire [569] et les approfondissent en utilisant ici des faibles doses. L'étude de Vandenberg et *al*. en 2012 suggère que l'exposition à des PEs au cours du développement aurait des effets organisationnels généralement irréversibles se manifestant à retardement à l'âge adulte, alors que les effets sont réversibles avec l'arrêt de l'exposition lorsqu'elle a lieu après la puberté [589].

Les données que nous présentons sont des éléments supplémentaires pour englober certaines infertilités masculines idiopathiques dans le cadre des NCD (Non-Communicable Diseases) ayant une origine développementale. Le concept de DOHaD (de l'anglais Developmental Origins of Health and Diseases) est suggéré pour différentes maladies chroniques comme le diabète, l'allergie, les maladies cardiovasculaires et certaines formes de cancer [694-697]. L'impact de diverses molécules comme le BPA pour les PEs [698], les analgésiques [168] ou encore les déséquilibres alimentaires [699] a été mis en évidence dans la programmation des NCDs.

La comparaison des données obtenues lors de l'exposition fœtale et adulte montre aussi la différence de sensibilité des organismes. Lors de l'exposition adulte, les effets morphologiques et cellulaires sont observés à la dose de 10mg/kg/j tandis que les effets moléculaires (observés sur un nombre de paramètres plus restreint: CASP3, BCL2, MCL1 et MOV10L1) ne sont identifiés qu'à partir de la NOAEL. Ces données soulignent l'importance de la fenêtre de sensibilité et de la nécessité de protocoles expérimentaux spécifiques de l'âge pour déterminer les LOAEL et NOAEL des molécules toxiques.

4- Exposition *in utero* aux antiandrogènes, notion de seuil d'activité: Courbes monotones et non monotones.

Une question centrale en toxicologie et particulièrement dans le champ des PEs est: y-a-t-il une dose seuil des effets délétères? Un nombre croissant d'études fait part de courbes doses-réponses à allure non-monotonique (NMDRs) et tente de les caractériser. Il s'agit en effet d'une problématique épineuse dans le sens où de point de vue toxicologique, une NMDR ne peut pas garantir une dose sans effet (NOAEL) ni un seuil d'activité à une molécule donnée (LOAEL) et par conséquent ne peut garantir une dose sans risque pour l'exposition humaine [589].

Dans notre modèle d'exposition au flutamide à l'âge adulte, toutes les courbes effet-dose obtenues après exposition des rats adultes au flutamide ont montré un aspect monotone. Seules les doses supérieures ou égales à la NOAEL (1 et 10 mg/kg/j) permettaient d'observer des effets sur la fonction de reproduction. En d'autres termes, il est possible de déterminer une dose seuil pour l'exposition adulte aux antiandrogènes. Nos résultats sont en accord avec ceux observés dans la thèse d'A. Sarabay qui a été menée en parallèle de notre étude avec les mêmes doses de flutamide mais sur des rats Wistar et sur une exposition sub-chronique de 28 jours [700].

L'observation globale des données d'exposition *in utero* au flutamide suggère la mise en place de manière dépendante de la dose des effets testiculaires. Les effets morphologiques (sur le poids des organes sexuels, le compte et la viabilité spermatiques) ne sont observés qu'à la dose de 10mg/kg/j, les effets cellulaires (sur le diamètre des tubules séminifères et le nombre de cellules en apoptose) à la dose de 1mg/kg/j (NOAEL) tandis que certains effets moléculaires sont observés à la dose la plus faible (NOAEL/1000). Cette observation globale suggère une mise en place progressive (monotone) des effets des antiandrogènes sur la spermatogenèse. Toutefois, nous avons identifié dans notre étude d'exposition *in utero* au flutamide, cinq paramètres présentant une NMDR: le nombre de rats cryptorchides à l'âge adulte, l'expression protéique de DIABLO et de HSF1(effet aux doses 0.001; 1 et 10mg/kg/j) et l'expression des ARNm de XIAP et MCL1 (pas d'effet à la dose 0.1mg/kg/j). Ces paramètres représentent environ 10% des paramètres analysés dans cette étude. Comme nous avions des paramètres ayant une réponse monotone et d'autres une réponse non-monotone, nous avons cherché à savoir quelle était l'allure globale de nos résultats. En nous basant sur

les travaux de Lagarde et *al.* [701], nous avons associé à chaque résultat, dose par dose, le chiffre 1 en présence d'un effet significativement différent du contrôle et le chiffre de 0 en l'absence d'effet. Puis nous avons fait la somme pour chaque dose et tracé une courbe (Fig.50).

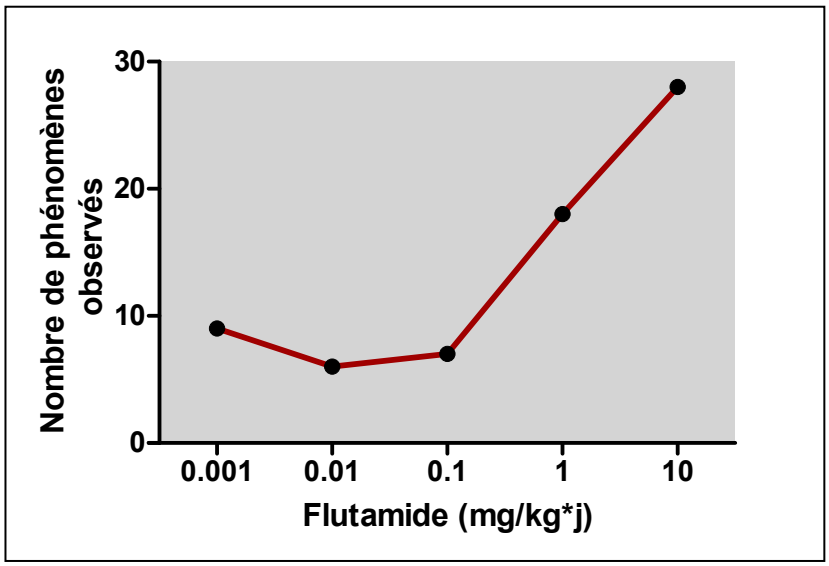


Figure 50: *Courbe dose réponse représentant le nombre de phénomènes observés à chaque dose de flutamide testée pour l'exposition in utero.*

Le graphique montre une courbe légèrement en U, soit une courbe non monotone. A partir de deux travaux récents [701, 702], nous avons évalué la "plausibilité" de la courbe que nous avons tracé. Selon les critères décrits dans les Tableaux 17 et 18, notre modèle d'étude présente un score de 19 à 21, ce qui correspond à une plausibilité modérément élevée à élevée pour la courbe NMDR tracé.

Une autre méthode de calcul très récente (juin 2017) [703] a été proposée pour estimer la plausibilité d'une courbe NMRD. Cette méthodologie est basée sur : (1) l'échantillonnage de données récapitulatives afin de couvrir toutes les possibilités pouvant être présentées par les paramètres mesurés pour chaque dose et ce, dans le but d'obtenir une nouvelle base de données brutes, (2) l'analyse statistique de chaque courbe dose-réponse pour caractériser les pentes et leurs signes. C'est à dire que l'on donne la valeur +1 à un marqueur qui augmente, 0 à un marqueur qui n'est pas modifié et -1 à un marqueur qui diminue (non pas uniquement 1

Number of doses below ZEP (excluding the control)		Score A
1		1
2		2
3		3
4		4
≥5		5
Experimental determination of ZEP		**Score B**
Yes		1
No		0
Number of doses statistically different from control		**Score C**
1		2
2		4
3		8
≥4		16
Reproducibility of the dose-response relationship		**Score D**
Yes		3
No		0
Magnitude of response (percentage control value)		**Score E[a]**
Inverted-U curve	**U curve**	
≥100%, ≤125%	≤97%, ≥92%	0,5
>125%, ≤150%	<92%, ≥84%	1
>150%, ≤200%	<84%, ≥68%	2
>200%, ≤400%	<68%, ≥5%	3
>400%	<5%	4

Tableau 17: *Résumé des critères d'analyse avec leurs valeurs associées utilisés lors de l'évaluation de la plausibilité statistique d'une relation NMDR. D'après [701] et [702].*

Total score[a]	Plausibility of an NMDR relationship
1–2	No–low
>2–8	Low
>8–12	Low–moderate
>12–16	Moderate
>16–20	Moderate–high
>20	High

Tableau 18: *Résumé du score total pour évaluer la plausibilité statistique d'une relation NMDR. D'après [701] et [702].*

ou 0 comme les précédentes études) et (3) la caractérisation de ces courbes dose-réponse en fonction de la variation du signe dans la pente. Elle mériterait d'être testée sur nos résultats

L'identification d'un nombre important d'évènements délétères à la NOAEL/1000 suggère que lors d'exposition *in utero* aux antiandrogènes, il n'existe pas de dose seuil. Cette donnée pose la question du mode d'action des PEs antiandrogènes à faible dose. Dans le cadre du métabolisme hormonal, il faut garder en mémoire que les récepteurs hormonaux sont «modélisés» pour détecter de très faibles concentrations d'hormones et que les relations sont souvent non-linéaires entre concentration d'hormones, nombre de récepteurs liés à l'hormone et puissance de l'effet observé.

Dans le cadre de la réglementation et de l'analyse des molécules à potentiel PE, nos données apportent un nouvel éclairage. Même si certaines procédure de l'OCDE pour tester les molécules chimiques prennent en compte la période péri-conceptionnelle (essais 414, 415, 416, 421, 422, 426) aucune ne fait d'observation de la descendance mâle adulte ni d'analyse cellulaire et moléculaire de la spermatogenèse.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Mon travail de thèse vient s'intégrer dans le cadre des débats qui bousculent depuis quelques années la communauté scientifique quant à l'adéquation du système actuel d'évaluation de la sécurité des produits chimiques à évaluer les effets d'une exposition à de faibles doses de PEs et aux choix de la fenêtre d'exposition dans cette évaluation.

Notre travail a permis de générer un modèle expérimental isomorphique pour l'étude de la programmation développementale de l'infertilité mâle.

Nos données permettent d'objectiver l'action des faibles doses d'antiandrogènes à des doses pertinentes avec l'exposition environnementale quotidienne.

D'autre part, notre travail a permis d'identifier une signature moléculaire des effets faibles dose des PEs à activité antiandrogénique (NOAEL/1000). Ce qui nous a permis la mise en évidence de deux voies de signalisation qui donnent naissance au phénotype cellulaire (apoptose des cellules germinales) et morphologiques (altérations du tractus génital et des compte et viabilité spermatique).

Enfin, l'enseignement à tirer des données comparatives des deux fenêtres d'exposition étudiées (fœtale et adulte) est dans le domaine de la prévention chez la femme enceinte et le jeune enfant. En l'absence de dose seuil, une éviction la plus large possible des PEs potentiels devrait être conseillée lors de la grossesse, et plus largement, lors des mille premiers jours de l'enfant afin de préserver le capital santé de l'individu.

Il serait intéressant de poursuivre ce travail par une étude comparée des faibles doses d'œstrogèno-mimétiques et d'antiandrogènes, les deux types de PEs qui programment l'infertilité mâle, afin d'identifier les voies et les signatures similaires et spécifiques.

ANNEXES

Annexes 1: article2

NEONATAL PROGRAMMING OF ADULT GERM CELL DEATH DISEASE AFTER EARLY EXPOSURE TO AN ENDOCRINE-DISRUPTING COMPOUND: INVOLVMENT OF MIRNA-HEAT SHOCK RESPONSE PATHWAYS.

Neonatal programming of adult germ cell death disease after early exposure to an endocrine

Nadjem Lakhdari[1, 2], Bénazir Siddeek[1, 2], Lilia Inoubli[1, 2], Rachel Paul Bellon[1, 2], Véronique Isnard[3], Daniel Chevalier[2, 4], Agnes Paquet[5], Emanuela Repetto[2, 6], Michele Trabucchi[2, 6], Jean-François Michiels[7], Catherine Yzydorczyk[8], Umberto Simeoni[8], Michel Urtizberea[9], Claire Mauduit[1, 10, 11], and Mohamed Benahmed[1, 2, 12, *].

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Team 5, Nice F-06204, France,

[2]Université de Nice Sophia-Antipolis, Unité de Formation et de Recherche (UFR) Médecine, Nice F-06000, France,

[3]Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle de Digestif-Obstétrique, Centre de Reproduction, Nice F-06202, France,

[4]Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle d'Urologie, Service d'Urologie Nice F-06202, France,

[5]CNRS and University of Nice Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Sophia Antipolis, F-06560 Sophia Antipolis, France,

[6]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Team 10, Nice F-06204, France

[7]Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle de Biologie, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Nice F-06202, France,

[8]Division of Pediatrics & DOHaD Laboratory, CHUV & University of Lausanne, CH-1011, Switzerland

[9]BASF Agro, Ecully F-69130, France,

[10]Université Lyon 1, UFR Médecine Lyon Sud, Lyon F-69921, France,

[11]Hospices Civils de Lyon, Hopital Lyon Sud, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Pierre-Bénite F-69495, France,

[12]Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Département de Recherche Clinique et d'Innovation, Nice F-06001.

ABBREVIATED TITLE: miRNA heat shock response in germ cell death

KEYWORDS: Endocrine disrupting compounds, epigenetic mechanisms, testes infertility.

WORD COUNT: 4394

NUMBER OF FIGURES AND TABLES: 5

*Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:

Dr. Mohamed Benahmed, MD, PhD

Inserm U1065, Team 5, Bâtiment Universitaire Archimed, C3M, 151 Route Saint-Antoine Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 3, France. E-mail: mohamed.benahmed@unice.fr

GRANTS: This work was supported by INSERM, University Nice-Sophia-Antipolis, ANRT and BASF Agro (CIFRE doctoral grant to N.L.), CEFIC-LRI and BASF Agro (fellowships to B.S.), ANR (Grant ANR-06-SEST-13), PNRA (Grant ANR-07-PNRA-016-, PNRPE (Grant PNRPE-2009-12), the Nord Pas-de-Calais region (SER-2007) and MEDDTL (Grant 11-MRES-PNRPE-1-CVS-027 2011).

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare that they have no actual or potential competing financial interests.

ABSTRACT

The Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) hypothesis suggests that exposure to chemical toxicants or nutritional imbalances during perinatal life induces changes that enhance the risk of developing non-communicable diseases in adulthood. The underlying cellular and molecular mechanisms of DOHaD remain largely unknown. Here, we used an experimental model with an adult chronic germ cell disease phenotype resulting from neonatal exposure to environmental toxicants to identify an altered epigenetic pathway involved in the deregulation of the heat shock response (HSR) caused by increased upstream miRNA expression (miR-29s and miR-18a). Rats that were neonatally exposed to the xenoestrogen estradiol benzoate exhibited adult germ cell disease mediated by two altered miRNA HSR pathways: (i) increased miR-29s levels that induced decreases in DNA methyltransferase (DNMT3A, 3B) levels and resulted in DNA heat shock factor 1 (HSF1) hypomethylation and increased expression and (ii) increased miR-18a levels that induced a decrease in HSF2 and HSPA2 levels. These data were validated in vitro; transfection of a miR-18a mimic in a germ cell line decreased HSF2 and HSPA2 levels and increased cell apoptosis, whereas transfection of a miR-29a or miR-29c mimic decreased the DNA methyltransferase protein levels associated with increased HSF1 expression and cell apoptosis. The miRNA levels were also increased in the rat plasma, suggesting that these miRNAs were potential non-invasive circulating biomarkers of the adult germ cell death phenotype. In conclusion, the deregulation of miR18a-HSF2 and miR-29-DNMT-HSF1 represents a novel epigenetic mechanism explaining an adult germ cell death disease with developmental and environmental origins.

Introduction

Currently, there is an increasing worldwide trend in the burden of non-communicable diseases (NCDs) with developmental origins, and these diseases represent major public health problems, such as cardiovascular disease, obesity, diabetes, asthma and allergy, immune and autoimmune disease, neurodevelopmental and neurodegenerative disease, precocious puberty, infertility, and certain cancer types [658, 704]. Epidemiological studies across a wide range of countries and over many years have clearly indicated that early human development affects the risk of developing NCDs in later life [705]. This field is now recognized as the Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD, see http://www.dohadsoc.org) [681, 705]. The risk of developing NCDs is affected by a variety of chemical and nutritional imbalances during fetal and early post-natal life, which can potentially activate or inhibit the enzymes and pathways involved in DNA methylation, chromatin remodeling and non-coding RNAs, thus ultimately regulating gene expression via epigenetic mechanisms. These epigenetic regulatory mechanisms are likely targets for the effects of nutriments and environmental toxicants and are highly sensitive during the perinatal periods, when these mechanisms undergo profound changes [706, 707]. Based on these observations, additional investigations on the potential epigenetic mechanisms and small non-coding RNA species related to the induction of disease risk are required, particularly on the early critical windows of development.

A growing number of human epidemiological and experimental studies have reported the potential involvement of environmental toxicants, which can affect the endocrine and metabolic systems and interfere with important developmental processes in humans and wildlife, such as endocrine-disrupting compounds (EDCs) [708]. Exposure to EDCs has been reported to potentially play a role in the increased incidence observed for different diseases, including reproductive/endocrine disease, breast/prostate cancer, endometriosis, infertility, diabetes/metabolic syndrome, early puberty, obesity, immune/autoimmune disease, cardiopulmonary disease and brain system disease [708]. Whether environmental exposure to EDCs with estrogenic and/or androgenic-disrupting properties during critical vulnerable developmental periods (fetal and early post-natal) can induce adverse health effects in humans remains a matter of debate [709-711]. Clinical, epidemiological and experimental studies support the existence of fetal determinants of male infertility [712]. Specifically, in the field of male reproductive health, exposure to EDCs or xenoestrogens has been associated with male infertility, which is related to an increase in testicular germ cell death [154, 562, 569], cryptorchidism, hypospadias, and testicular germ cell tumors [708].

Cells exposed to environmental stresses induce the expression of many proteins, such as heat shock proteins (HSPs) [713, 714]. The heat shock response (HSR) regulates heat shock proteins, such as HSP70, at the transcriptional level through heat shock factors (HSFs). The HSR is crucial for the normal development and function of male gonads, and it is especially important for germ cell survival and function. Alteration of the HSR induces massive germ cell death that leads to male infertility in experimental models. The models are primarily based on genetically modified mice, such as HSPA2/HSP70-2 [313, 670] and HSF2 [287, 715] knock-out (KO) mice, which display increased apoptotic germ cell death with reduced quality sperm. Transgenic mice expressing active HSF1 in the testes are infertile because of a block in spermatogenesis resulting from increased germ cell apoptosis [265, 277]. In addition to the use of animal models, clinical studies have noted the potential role of HSR in human male infertility. In this context, HSPA2 levels are decreased in the

seminal plasma from infertile patients [315, 716], and a missense mutation (R502H) leading to a loss of HSF2 function has been reported in patients with idiopathic azoospermia [717].

Therefore, the objectives of the present work were as follows: (i) generate an experimental model (designed according to the DOHaD (http://www.mrc-leu.soton.ac.uk/dohad/index.asp) and NCD concepts) exhibiting an adult germ cell death phenotype (leading to male infertility) induced by neonatal exposure to EDCs; (ii) determine whether the adult germ cell death process is related to HSR alterations in this model; and (iii) identify the upstream molecular epigenetic mechanisms (specifically the small non-coding mRNA (miRNA) pathways) involved in the potential deregulation of the HSR.

Materials and Methods

Animals. The animal experiments were performed in accordance with EU legislation (Directive 2010/63/EU) and approved by a local animal care and use committee (Comité Institutionnel d'Éthique Pour l'Animal de Laboratoire -CIEPAL-Azur- Agreement number: NCE-2013-109). Pregnant Sprague Dawley rats at gestational day (GD) 15 (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were individually housed in temperature-controlled rooms with 12-h light/12-h dark cycles and ad libitum access to water and feed. Estradiol benzoate (EB, Sigma Aldrich, Lyon, France) at doses of 0, 0.75, 1.25, 2.5, 12.5, or 25 µg/d was administered subcutaneously to male neonatal rats from postnatal day (PND) 1 to PND 5 (Protocol No. 2008-43). The EB doses were chosen according to previous experiments [154]. A maximum of ten animals from four litters was included in the untreated and treated groups. Animals were sacrificed on PND 90. In the adult exposure protocol, EB at doses of 0 or 250 µg/kg/d was administered subcutaneously to male adult (PND 90) rats for 5 days (Protocol No. 2012-73). At the end of the treatment, 8 rats in each group were euthanized. The remaining 8 rats in each group were left without treatment for 2 months and then euthanized (PND 150).

Histology, immunohistochemistry, and in situ apoptosis detection.

Hematoxylin and eosin staining, immunohistochemistry, and TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL) approaches were performed on at least five animals per group [154]. Antibodies raised against HSF1, HSF2, and HSPA2 were diluted 1:50, and the anti-BAX antibody was diluted 1:100. The secondary antibody (either donkey anti-rabbit (Amersham, Piscataway, NJ, USA), rabbit anti-mouse, or swine anti-rabbit (Dako, Glostrup, Denmark) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) or Texas Red) was diluted 1:30.

Western blotting analysis.

Frozen testicular tissue was ground in liquid nitrogen to obtain tissue powder. Aliquots (~20 mg) of powder were homogenized in ice-cold hypotonic buffer (25 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, and 1% protease inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich, Meylan, France). Tissue homogenates were sonicated (10 sec at 80 Watts). The protein concentration was determined with a bicinchoninic acid assay as previously described [667]. Antibodies raised against HSF1, HSPA2, BAX, PUMA (Cell Signaling, St Quentin en Yvelines, France), HSF2, HSP60/HSPD1, HSP90, BCL2, BCL-XL (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), MCL-1 (Rockland, Gilbertsville, PA, USA), and ACTIN (1:10,000; Jackson's Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were diluted 1:1,000 unless otherwise noted and used for immunoblotting.

Membranes were scanned with a luminescent image analyzer 3000 CCD camera (Fujifilm, Dusseldorf, Germany) and quantified with the software MultiGauge (Fujifilm).

RNA isolation.

Total RNA was isolated from frozen testicular powder using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) coupled with column purification of RNA using an RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and DNase treatment. The RNA quantity was evaluated with BioTek's Synergy 2 Alpha microplate reader (Bio Tek, Colmar, France).

Real-time quantitative PCR for mRNA expression.

Complementary DNA was synthesized from tissue total RNA (1 µg) as previously described [153]. A 1:20 dilution of the reverse-transcribed product was used for real-time PCR analysis with SYBR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described [154]. The primer sequences were as follows: *Hsf1*, 5'CCCTGAAGAGTGAGGACATAA3' (forward), 5'GCTGGAGATGGAGCTGAGTA3' (reverse); *Hsf2*, 5'TAAATGGCTCCTCCAACCTG3' (forward), 5'CCAACAGCTCAACCTTTCCTA 3' (reverse); *Hspa2*, 5'AGACGCAGACCTTCACTAC3' (forward), 5'TTTTGTCCTGCTCGCTAATC3' (reverse); and *ActB*, 5'AGCCTCGCCTTTGCCG3' (forward), 5'CTGGTGCCTGGGGCG3' (reverse). The data were normalized to the *ActB* levels.

Real-time qPCR analysis of microRNA expression.

A total of 12.5 ng of total RNA was reverse transcribed using the stem–loop method (Applied Biosystems) as previously described [154]. For the qPCR, 2.5 µl of the reverse transcribed product (1:20 dilution for PND 21, PND 30, and PND 90 and 1:5 dilution for PND 6) was assayed using TaqMan Universal PCR Master Mix and TaqMan miRNA primers/probes (18a, 29a, 29b, and 29c, Applied Biosystems). The data were normalized to SnoRNA202 expression.

Detection of DNA methylation by MeDIP-qPCR.

DNA was isolated from frozen testicular powder using a DNeasy® blood and tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Six micrograms of DNA was digested with 24 U of Mse I enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) supplemented with 100 ng/µl of bovine serum albumin overnight at 37°C. The reaction was stopped by heating the samples for 20 min at 65°C and then purified using a QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). MseI-digested DNA was run on a 2% agarose gel to verify the fragment size of 200-1,000 bp. MseI-digested DNA was defined as the input DNA. One microgram of MseI-digested DNA was incubated with magnetic beads coupled with MBD2 protein (EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment kit, Clontech, Mountain View, CA, USA). The beads were washed to remove non- and hypo-methylated DNA. The enriched methylated DNA fraction was eluted with high salt buffer and purified by precipitation according to the manufacturer's instructions. This fraction was defined as MeDIP DNA. Five nanograms of input and MeDIP DNA were subjected to qPCR as described above. The methylated DNA levels were calculated according to the following formula: 2^[(Ct (Input)–Ct (MeDNA-IP))]. The sequences of the primers used were as follows: *Hsf1*, 5'CGCGCCGGCTACCGATTTAC3' (forward), 5'GTGCGCAGGCGCTGTGATCT3' (reverse); *Line1*, 5'CCTGGTGAGCTTGGGACA3' (forward), 5'CTCAGGAGTGCCCACCTGAC3' (reverse); and *H19*, 5'AACTCGAGGAGAGCGATCCG3' (forward), 5'ACCTGTATCGGGGTACGACCGA3' (reverse).

Cell culture and transfection.

The GC-1 cell line (which exhibits features of type B spermatogonia and primary spermatocytes) provided by Pr Chambon (IGBMC, Strasbourg, France) was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium/Glutamax medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) at 37°C in a humidified CO_2-controlled (5%) incubator. Synthetic miRNAs (50 nM each; miR-18a -UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG-, miR-29a -UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-, miR-29b –UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-, miR-29c -UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA-, or a scrambled negative control (Ambion/Life Technologies, Saint-Aubin, France)) or small interfering RNAs (siRNA, 50 nM each; *Hsf1*, *Hsf2* –GGAAGAUUGUCCAGUUUAU- (Sigma-Aldrich) or *Hspa2* –GCGUGAUCGCCGGUCUAAA- (Sigma-Aldrich) or a scrambled negative siRNA (Dharmacon/Thermo-Scientific, Illkirch, France)) were transiently transfected into cells cultured in 12-well plates with INTERFERin reagent (Polyplus, Strasbourg, France) according to the manufacturer's protocol. The cells were harvested after transfection for 16 h (flow cytometry) or 48 h for protein or RNA isolation, respectively.

Flow cytometry analysis.

Transfected GC-1 cells were harvested with Accutase (Sigma-Aldrich). After centrifugation, the cells were stained with a FITC-labeled Annexin V/Propidium Iodide (PI) Apoptosis kit (Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach, Germany) and analyzed on a MACS Quant instrument. At least 10,000 events were analyzed per tube.

Statistics. Data were analyzed using GraphPad software (version 4.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and the values were expressed as the mean ± SEM (standard error of the mean) to account for variations among samples and animals within a dataset. Student's *t*-test was performed for single comparisons and an ANOVA (analysis of variance) was performed for multiple comparisons to determine whether there were significant differences between groups ($p<0.05$). For values of $p<0.05$, the ANOVA was followed by the Bonferroni post-hoc test to determine the significance of the differences between pairs of groups.

Results

Neonatal exposure to the estrogenic analog EB at the highest doses (12.5 and 25 µg/day) induced severe atrophy of adult testes (PND 90) with massive germ cell loss (S1). At the 2.5 µg/d EB dose, minor histological alterations in the seminiferous tubules were observed (S1), whereas alterations were not observed at the lower doses (0.75 and 1.25 µg/d). Neonatal exposure to EB induced apoptosis, on the basis of significant increases in the levels of pro-apoptotic proteins, such as BAX (but not PUMA, Fig. 1A), and decreases in the levels of anti-apoptotic proteins, such as BCL2, BCL-XL, and MCL1 (Fig. 1A). This long-term germ cell death process was visualized (Fig. 1B) and quantified by monitoring the BAX protein level and was identified in adult testes (PND 90) but not immature (PND 6) or juvenile testes (PND 21 and PND 30) (Fig. 1C).

Neonatal exposure to EB induced an increase in the HSF1 and a decrease in the HSF2 protein levels in adult testes in a dose-dependent manner (Fig. 2A). Both of these alterations were associated with a dramatic and dose-dependent decrease in the HSPA2 protein level, whereas HSP60/HSPD1 and

HSP90 expression was not affected (Fig. 2A). Similarly to the apoptotic phenotype, changes in HSF1, HSF2, and HSPA2 protein expression were observed only in adult testes but not in immature or juvenile testes (Fig. 2B). This deregulation of protein levels was associated with alterations in the HSF1 and HSPA2 mRNA levels in adult testes (but not immature or juvenile testes) (Fig. 2B), thus suggesting that neonatal programming caused these alterations. The HSF2 mRNA levels were unaffected (Fig. 2B). HSF1, HSF2, and HSPA2 protein expression was detected in adult germ cells (i.e., spermatocytes and spermatids, Fig. 2C). Neonatal exposure to EB increased the intensity of HSF1 and HSPA2 immunostaining in adult testicular germ cells and decreased the intensity of HSF2 immunostaining (Fig. 2C).

Although *Hsf2* mRNA expression was unchanged following neonatal exposure to EB, its protein level was down regulated. This pattern of expression suggested potential regulation by microRNAs. Using a target prediction program (TargetScan), an alignment of rat *Hsf2* with miR-18a revealed a putative target site at positions 116-122 of the *Hsf2* 3'UTR (Fig. 3A). This site is located in a conserved region of the *Hsf2* 3'UTR of several species, including rats (Fig. 3A). Conversely, the TargetScan analysis excluded the possibility that miR-18a directly targeted HSPA2. In our model, neonatal exposure to EB increased miR-18a expression in the adult testes but not the juvenile testes, and miR-18a expression was moderately although significantly decreased in the immature (PND6) testes (Fig. 3B). However, the decrease in miR-18a might not be functionally relevant because the protein levels of its target HSF2 were not affected in the immature testes (Fig. 2B). Furthermore, in vitro transfection of a rodent testicular germ cell line (GC-1) with a synthetic miR-18a mimic increased the apoptotic rate (identified by Annexin V and active CASP3, Fig. 3C, D) and was associated with significantly reduced HSF2 and HSPA2 protein levels (Fig. 3D).

Because HSF1 mRNA and protein expression were up regulated in our model, we hypothesized that transcriptional regulation was involved. Bioinformatics tools were used to identify and characterize the presence of CpG islands in the HSF1 gene promoter sequence. A 5,465 bp region was analyzed with the software Methyl Primer Express. A CpG island spanning positions −812 to +899 relative to the transcription start site was detected with a GC content of 58% and an observed/expected CpG ratio of 0.71 (Fig. 4A). Neonatal exposure to EB decreased the methylation status of the HSF1 promoter in adult testes, as assessed by MeDIP qPCR (Fig. 4B). This phenomenon occurred in the context of a decrease in the global genome methylation status, as determined by an evaluation of Line-1 and H19 (Fig. 4B). We have previously reported that this hypomethylation is likely to be related to decreased DNMT1, 3A, and 3B protein levels in testes from adults neonatally exposed to xenoestrogens [154]. Indeed, knockdown of DNMT3A and DNMT3B increased the HSF1 protein level (Fig. 4C) and apoptotic rate (DNMT3A, Fig. 4D), whereas knockdown of DNMT1 by siRNA did not modify HSF1 expression in the GC1 cell line (Fig. 4C). Overall, our data suggest that these DNMTs are the upstream regulators of HSF1. MicroRNAs such as miR-29a, b, and c target DNMTs [154, 718-720], and these microRNAs were identified in the testis throughout postnatal life. miR-29a was highly expressed from PND 6 to PND90, and miR-29b and c expression steadily increased from PND 6 to PND 90 (Fig. 4E). The high levels of these microRNAs in adult testes indicated that they might be predominantly expressed in adult (spermatocytes and spermatids) germ cells. Neonatal exposure to

EB induced an increase in miR-29a, b, and c expression in adult testes but not in immature or juvenile testes (Fig. 4E). The increased expression of HSF1 together with the decreased DNMT3a and 3b protein levels in GC1 cells after transfection of a synthetic miR-29a, b, and c mimic suggested that the miR-29 family members might be involved in the increased expression of HSF via alterations of DNMTs (Fig. 4F). Finally, an *in vitro* validation indicated that the miR-29s–DNMTs–HSF1 pathway led to germ cells apoptosis, because transfection of GC1 cells with miR-29 (Fig. 4D) or siDNMT3A (Fig. 4D) increased apoptosis.

Our data suggested that neonatal exposure to EB induced long-term germ cell apoptosis/hypospermatogenesis that was linked to alterations in two miRNA pathways, thereby leading to deregulated HSF1 and HSF2 protein expression. Assuming that HSF1 expression was also controlled by the HSPA protein [721], we investigated whether increased HSF1 expression was related to the decreased HSPA2 level. Indeed, knockdown of HSPA2 in GC1 cells significantly increased the HSF1 protein level, whereas HSF2 knockdown did not modify the HSF1 level (Fig. 4G). The alteration in the miR/HSR pathways induced infertility in adult testicular tissues from rats neonatally exposed to EDCs. Interestingly, we found that the changes in miRNA tissue levels were reflected in the blood levels. Indeed, neonatal exposure to EB induced an increase in miR-18a and miR-29c in blood plasma from adult rats, whereas the miR-29a and miR-29b levels remained unchanged (Fig. 5A). Next, we addressed whether the effect remained irreversible when the rats were exposed only during adulthood.

Rats (PND 90) exposed during adulthood to EB displayed apoptosis (TUNEL) in the same germ cells (spermatocytes and spermatids) that observed according to the neonatal exposure protocol (Fig. 5B). Alterations in HSR with increases in the HSF1 level and decreases in the HSF2 and HSPA2 levels (Fig. 5C) were linked to increased miRNA-18a, 29a, 29b, and 29c expression (Fig. 5D). However, germ cell apoptosis reverted 60 days (PND 150) after exposure (Fig. 5B), and the HSF/HSPA2 protein/microRNAs expression alterations were no longer observed (Fig. 5B-D).

Discussion

In this work, a pathophysiological model of (irreversible) male infertility was generated according to the DOHaD and NCD concepts, and it was characterized by adult germ cell death induced by neonatal exposure to EDCs. A causal link between increased adult germ cell death following early exposure to a toxicant and HSR deregulation was determined. HSR deregulation resulted from upstream alterations of two miRNA-HSR pathways: miR-18a-HSF2-HSPA2 and miR-29s-DNMTs-HSF1. Thus, mir-29s and miR18a represent potential tissue and circulating biomarkers of the adult germ cell death process.

One of the original findings in this work was the identification of miRNA expression deregulation as an upstream mechanism involved in the impaired balance of HSF/HSP in neonatally programmed adult germ cell death. miRNAs are small (approximately 18-25 nucleotides) non-coding RNAs that are endogenous physiological regulators of gene expression in virtually all eukaryotic organisms [722]. miRNAs regulate development, differentiation, apoptosis, cell proliferation and metabolism by

simultaneously controlling the expression levels of many genes [373, 722, 723]. In addition, miRNAs are highly conserved, with close to 90% sequence homology among humans, mice and rats [722, 724]. Here, we identified two miRNA pathways (miR-29-DNMTs-HSF1 and miR18a-HSF2) that are involved in the altered HSF/HSP balance and led to changes in HSPA2 expression and programmed adult germ cell death.

The involvement of the miR-29–DNMTs-HSF1 pathway in germ cell death was supported by the following observations: (i) the increased expression of miR-29s together with the decreased levels of their target (DNMTs) in vivo [154] and in vitro (the present study) resulted in HSF1 hypomethylation and its subsequent overexpression; and (ii) the increased expression of HSF1 in a germ cell line transfected with pre-miR-29 or siDNMT led to increased germ cell death. Decreased DNMT levels have been demonstrated to induce germ cell apoptosis, on the basis of the genetic invalidation of these enzymes [725]. However, the intermediate gene cascade that is targeted by the enzymes and involved in the cell death process is unknown. The present report shows that HSR alterations (particularly deregulation of HSF1 expression) may represent this intermediate step between cell death and upstream DNMT decreases and subsequent global genome hypomethylation, as assessed by increased expression of the Line-1 retro-transposon.

Although the involvement of the second miR18a-HSF2 pathway in normal germ cell maturation has been suggested [691], it is unclear whether its alteration could induce a pathological phenotype (i.e., germ cell death) leading to infertility. Neonatal exposure to xenoestrogens clearly disrupted this pathway and resulted in increased miRNA-18a expression which led to decreased HSF2 protein levels and a subsequent reduction in HSPA2 levels with increased germ cell death. This deregulation contributes to an adult apoptotic germ cell phenotype comparable to the phenotype observed in genetically invalidated HSF2 [287, 715] and HSPA2 KO mice [313, 670]. The alteration of the miR-18a–HSF2 pathway leading to germ cell death was also functionally validated here; we observed a down regulation of HSF2 (and HSPA2) protein levels in germ cell lines transfected with miR-18a, which induced increased germ cell apoptosis.

The two miRNA–HSR pathways are likely to be interconnected in the induction of germ cell apoptosis because the concomitant alteration of HSF1 and HSF2 expression might mediate a dramatic reduction in the HSPA2 level. HSF2 has been suggested to play a role in the heritability of a decondensed chromatin status on the *HspA2* gene, in a process referred to as “bookmarking” [283]. This process helps to maintain *Hsp* genes in a transcription-competent state, thus allowing for the rapid and robust activation of the gene by HSF1 [726]. Therefore, the decreased HSPA2 levels might have been caused by a reduction in the HSF2 levels, which may have rendered HSF1 unable to exert its stimulatory effect on HSPA2 expression. As a result, the inability of HSF1 to increase HSPA2 levels may explain the inability of HSF1 to protect against germ cell death. Paradoxically, the sustained activation of HSF1 in male germ cells has also been reported to induce male infertility resulting from either direct HSF1 action on germ cell death [265, 276, 277] (via deregulation of the Bcl2 family proteins, TP53, or death receptor interacting proteins [276]) or decreased HSPA2 expression [277]. Recently, HSF1-dependent induction of apoptosis in spermatocytes has been reported to be related to the repression of several target genes crucial for spermatogenesis, including DNAJA1, CELF1, SPO11, PIWIL2, TDRD1, and Mov1d1 [278]. The repressed expression of these genes results in the derepression of retrotransposons (primarily Line-1) [727-729], a result consistent with the increased expression of Line-1 and HSF1 observed in our study in the adult germ cells from rats with neonatal

exposure to EDCs. The decreased HSPA2 levels resulting from the interaction between the miR-29 and miR-18a miRNA pathways may also contribute to the permanent overexpression of HSF1. Indeed, HSPA2 has been shown to inhibit HSF1 expression by directly binding to its promoter [for a review, see [721]], an observation consistent with the present results in which the knockdown of HSPA2 in a germ cell line resulted in increased HSF1 expression. Together, these results suggest that increased HSF1 expression may result from its demethylated promoter status via the altered miR-29-DNMTs-HSF pathway as well as from the decreased level of HSPA2 via the impaired miR-18a–HSF2–HSPA2 pathway. The adult germ cell death phenotype induced by deregulation of the miR-29 and miR-18a pathways should be viewed in the context of adult disease programming because it is irreversible only when hormonal disruption occurs during the neonatal (but not adult) period. Determining the cellular and molecular mechanisms underlying the irreversible process linking early exposure to the late effect remains a key scientific challenge in NCD development.

Several miRNAs previously identified in tissues have also been found in extracellular fluids, such as plasma [730-732]. Because miRNAs are upstream regulators of germ cell death, the question remains as to whether the altered levels of miR-29 and miR-18a in testicular tissue are reflected in blood plasma. Rats neonatally exposed to xenoestrogens exhibit significantly increased plasma levels of the two miRNAs (miR-18a and miR-29c). This is the first report indicating that changes in the miRNA levels in adult tissue that occur following neonatal exposure to xenobiotics and lead to an adult (germ cell) disease are translated at the plasma level.

This study clearly established an upstream causal link (i.e., two entirely altered functional miRNA pathways) between neonatal exposure to a toxicant and adult germ cell death that potentially leads to male infertility. Therefore, this study provides a new pathophysiological basis for adult germ cell disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the C3M Imaging Core Facility (Microscopy and Imaging platform Côte d’Azur, MICA) and the C3M animal room facility.

REFERENCES

1. Hanson MA, Low FM, Gluckman PD 2011 Epigenetic epidemiology: the rebirth of soft inheritance. Ann Nutr Metab 58 Suppl 2:8-15

2. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ 2012 Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. Environ Health 11:42

3. Heindel JJ, Balbus J, Birnbaum L, Brune-Drisse MN, Grandjean P, Gray K, Landrigan PJ, Sly PD, Suk W, Cory Slechta D, Thompson C, Hanson M 2015 Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences. Endocrinology 156:3416-3421

4. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ 1989 Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. Lancet 2:577-580

5. Bernal AJ, Jirtle RL 2010 Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 88:938-944

6. Marsit CJ 2015 Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. J Exp Biol 218:71-79

7. Becher G, Bergman Å, Bjerregaard P, Bornman R, Brandt I, Heindel JJ, Iguchi T, Jobling S, Kidd KA, Kortenkamp A, Muir DCG, Ochieng R, Skakkebæk NE, Toppari J, Woodruff TJ, Zoeller RT 2013 State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization. In; 296 pp

8. Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, Mandrup KR, Axelstad M, Christiansen S, Vinggaard AM, Taxvig C, Kortenkamp A, Hass U 2014 Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters. Reproduction 147:465-476

9. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT 2015 EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. Endocr Rev 36:E1-E150

10. Zoeller RT, Vandenberg LN 2015 Assessing dose-response relationships for endocrine disrupting chemicals (EDCs): a focus on non-monotonicity. Environ Health 14:42

11. Juul A, Almstrup K, Andersson AM, Jensen TK, Jorgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Toppari J, Skakkebaek NE 2014 Possible fetal determinants of male infertility. Nat Rev Endocrinol 10:553-562

12. McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM 2001 Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. Toxicol Sci 62:236-249

13. Omezzine A, Chater S, Mauduit C, Florin A, Tabone E, Chuzel F, Bars R, Benahmed M 2003 Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. Endocrinology 144:648-661

14. Meunier L, Siddeek B, Vega A, Lakhdari N, Inoubli L, Bellon RP, Lemaire G, Mauduit C, Benahmed M 2012 Perinatal Programming of Adult Rat Germ Cell Death After Exposure to Xenoestrogens: Role of microRNA miR-29 Family in the Down-Regulation of DNA Methyltransferases and Mcl-1. Endocrinology 153:1936-1947

15. Lindquist S 1986 The heat-shock response. Annu Rev Biochem 55:1151-1191

16. Richter K, Haslbeck M, Buchner J 2010 The heat shock response: life on the verge of death. Mol Cell 40:253-266

17. Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, Eddy EM 1997 Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. Dev Dyn 208:125-136

18. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM 1996 Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. Proc Natl Acad Sci U S A 93:3264-3268

19. Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo TP, Rallu M, Gitton Y, Pirkkala L, Loones MT, Paslaru L, Larney S, Hiard S, Morange M, Sistonen L, Mezger V 2002 Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. EMBO J 21:2591-2601

20. Wang G, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF 2003 Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. Genesis 36:48-61

21. Nakai A, Suzuki M, Tanabe M 2000 Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. EMBO J 19:1545-1554

22. Widlak W, Benedyk K, Vydra N, Glowala M, Scieglinska D, Malusecka E, Nakai A, Krawczyk Z 2003 Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific hst70 gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium. Acta Biochim Pol 50:535-541

23. Motiei M, Tavalaee M, Rabiei F, Hajihosseini R, Nasr-Esfahani MH 2013 Evaluation of HSPA2 in fertile and infertile individuals. Andrologia 45:66-72

24. Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, Ortiz V, Oehninger S 2006 Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. Hum Reprod 21:1791-1794

25. Mou L, Wang Y, Li H, Huang Y, Jiang T, Huang W, Li Z, Chen J, Xie J, Liu Y, Jiang Z, Li X, Ye J, Cai Z, Gui Y 2013 A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia. Hum Genet 132:159-165

26. Benbrahim-Tallaa L, Siddeek B, Bozec A, Tronchon V, Florin A, Friry C, Tabone E, Mauduit C, Benahmed M 2008 Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. J Endocrinol 196:21-31.

27. Volle DH, Decourteix M, Garo E, McNeilly J, Fenichel P, Auwerx J, McNeilly AS, Schoonjans K, Benahmed M 2009 The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. J Clin Invest 119:3752-3764

28. Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, Fabbri M, Volinia S, Tsao T, Zanesi N, Kornblau SM, Marcucci G, Calin GA, Andreeff M, Croce CM 2009 MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. Blood 114:5331-5341

29. Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y, Mano H 2009 Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. RNA 15:1507-1514

30. Veeck J, Esteller M 2010 Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. J Mammary Gland Biol Neoplasia 15:5-17

31. Anckar J, Sistonen L 2011 Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. Annu Rev Biochem 80:1089-1115

32. He L, Hannon GJ 2004 MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet 5:522-531

33. Bartel DP 2004 MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116:281-297

34. Plasterk RH 2006 Micro RNAs in animal development. Cell 124:877-881

35. Kim VN, Nam JW 2006 Genomics of microRNA. Trends Genet 22:165-173

36. Takashima S, Takehashi M, Lee J, Chuma S, Okano M, Hata K, Suetake I, Nakatsuji N, Miyoshi H, Tajima S, Tanaka Y, Toyokuni S, Sasaki H, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T 2009 Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. Biol Reprod 81:155-164

37. Bjork JK, Sandqvist A, Elsing AN, Kotaja N, Sistonen L 2010 miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. Development 137:3177-3184

38. Xing H, Wilkerson DC, Mayhew CN, Lubert EJ, Skaggs HS, Goodson ML, Hong Y, Park-Sarge OK, Sarge KD 2005 Mechanism of hsp70i gene bookmarking. Science 307:421-423

39. Ostling P, Bjork JK, Roos-Mattjus P, Mezger V, Sistonen L 2007 Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. J Biol Chem 282:7077-7086

40. Vydra N, Malusecka E, Jarzab M, Lisowska K, Glowala-Kosinska M, Benedyk K, Widlak P, Krawczyk Z, Widlak W 2006 Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells. Cell Death Differ 13:212-222

41. Kus-Liskiewicz M, Polanska J, Korfanty J, Olbryt M, Vydra N, Toma A, Widlak W 2013 Impact of heat shock transcription factor 1 on global gene expression profiles in cells which induce either cytoprotective or pro-apoptotic response following hyperthermia. BMC Genomics 14:456

42. Zheng K, Xiol J, Reuter M, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, Stark A, Sachidanandam R, Pillai RS, Wang PJ 2010 Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 107:11841-11846

43. De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, Antony C, Moreira PN, Enright AJ, O'Carroll D 2011 The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. Nature 480:259-263

44. Vagin VV, Wohlschlegel J, Qu J, Jonsson Z, Huang X, Chuma S, Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Aravin AA 2009 Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. Genes Dev 23:1749-1762

45. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J 2009 Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. Anal Biochem 387:303-314

46. Boon RA, Vickers KC 2013 Intercellular transport of microRNAs. Arterioscler Thromb Vasc Biol 33:186-192

47. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Zen K, Zhang CY 2008 Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. Cell Res 18:997-1006

Figure Legends

Figure 1. Neonatal exposure to EB induces a germ cell apoptotic phenotype in adult testes. (A) Bax, Puma, Bcl2, Bcl-xL, and Mcl1 protein levels in adult rat testes from unexposed (0) or 0.75, 1.25, or 2.5 µg/d EB-exposed rats were quantified by western blotting analyses. Protein levels are expressed as a percentage of the ratio (target protein/ACTIN) in the untreated group. (B) Representative micrographs of BAX-stained testes from 90-d-old rats neonatally exposed to the vehicle (0) or EB (2.5 µg/d). The red fluorescence signal corresponds to BAX-positive cells. (C) Bax protein levels in immature (PND 6), juvenile (PND 21 and PND 30), and adult (PND 90) rats unexposed (Ct) or exposed neonatally to EB (2.5 µg/d) were quantified by western blotting analyses. Results are expressed as the mean ± SEM, n=5-7 (* $p<0.05$).

Figure 2. Neonatal exposure to EB induces long-term alterations in HSF1, HSF2, and HSPA2 levels. (A) Immunoblots of HSF1, HSF2, HSPD1, HSPA2, and HSP90 performed on protein extracts from rat testes unexposed (0) or exposed to 0.75, 1.25, or 2.5 µg/d of EB. Protein levels are expressed as a percentage of the ratio (target protein/ACTIN) in the untreated group. Results are expressed as the mean ± SEM, n=7, (* $p<0.05$). (B) Immunoblots of HSF1, HSF2, and HSPA2 performed on immature (PND 6), juvenile (PND 21 and PND 30), and adult (PND 90) rats testes exposed neonatally to the vehicle (Ct) or EB (2.5 µg/d). (C) HSF1, HSF2, and HSPA2 mRNA levels in adult rat testes from unexposed (0) and 2.5 µg/d EB-exposed rats were determined by real-time RT-PCR. Results are expressed as the mean ± SEM, n=5-7, (* $p<0.05$). (D) HSF1-, HSF2-, and HSPA2-stained testes (PND90) from untreated (0) and EB-treated (2.5 µg/d) rats (red fluorescence signal for HSF1or HSPA2, green fluorescence signal for HSF2, and blue signal for nuclei).

Figure 3. miR-18a is an upstream regulator of the HSF2/HSPA2 pathway. (A) In silico analysis of the Hsf2 3'UTR shows the likely formation of a duplex between Hsf2 and miR-18a. The binding site is conserved among several mammalian species. The seed recognition site is marked in bold. (B) Mature miR-18a levels in immature (PND 6), juvenile (PND 21 and PND 30), and adult (PND 90) rat testes from unexposed (Ct) or EB-exposed (2.5 µg/d) rats were quantified by qRT-PCR. Relative miRNA levels were normalized to small nucleolar RNA levels. Results are expressed as the mean ± SEM, n=7-8, (* $p<0.05$). (C) Apoptotic rate in a testicular germ cell line (GC1) was determined by flow cytometry after transient transfection (16 h) with a scrambled miRNA mimic (scrambled) or a miR-18a mimic. The total number of apoptotic (Annexin V plus Annexin V and PI-positive) cells was taken into account. (D) GC1 cells were transiently transfected (16 h for CASP3 and CLEAVED-CASP3 and 48 h for HSF2 and HSPA2) with a scrambled miRNA or a miR-18a mimic before evaluation of the protein levels. Data are presented as the mean ± SD from three independent experiments (n=4 for each experiment; * $p<0.05$) (C, D).

Figure 4. miR-29 family members induce germ cell apoptosis by reducing DNMT expression, thus resulting in increased HSF1 expression. (A) CpG sites (vertical bars) and islands (pink box) around the transcription start site of the Hsf1 gene were predicted (RGD: 620913, chr7: 114,523,000…114,528,464) using Methyl Primer Express (Applied Biosystems). The primer set used to amplify the CpG island upstream of the transcription start site was designed using Primer3 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). (B) The methylation status of HSF1, Line-1, and H19 was assessed by comparing the expression between MeDIP DNA and input DNA by real-time PCR in the testes from untreated (0) or EB-treated (2.5 µg/d) adult rats. Results are expressed as the mean ± SEM, n≥7 (*

p<0.05). (C) HSF1 protein levels in GC-1 cells transiently transfected (48 h) with a siRNA directed against DNMT1, 3a, or 3b. The HSF1 protein level is expressed as a percentage of the ratio (HSF1 protein/ACTIN) detected in cells incubated with the scrambled (siCTRL) or DNMT siRNA. (D) Apoptotic rate in GC-1 cells was visualized by Annexin V-FITC/PI flow cytometry after transfection with the control miRNA (scrambled) or a miRNA mimic for miR-29a or c. At least 10,000 events were counted. (C, D) Results are expressed as the mean ± SEM determined from three independent experiments, with n=4 for each experiment (*p<0.05). The apoptotic rate was analyzed similarly after transfection with the control siRNA (siRNA0) or siRNA raised against DNMT3A (siDNMT3A). (E) Mature miR-29a, b, and c levels in PND 6, 30, or 90 testes from untreated rats were quantified by real-time PCR (left). Mature miR-29a, b, and c levels were determined in the testes (PND 6, 21, 30, and 90) from untreated (Ct) rats or rats exposed to EB (2.5 µg/d, EB) (right). MiRNA levels were normalized to the snRNA levels. Results are expressed as the mean ± SEM, n=7-8 (* p<0.05). (F) HSF1, DNMT3B, and DNMT3A protein levels were determined in GC-1 cells transiently transfected (48 h) with the scrambled miRNA (scrambled) or a miRNA mimic for miR-29a, b, or c. Protein levels are expressed as a percentage of the ratio (target protein/ACTIN) detected in the scramble-treated control cells. (G) GC1 cells were transiently transfected (48 h) with the control siRNA (siRNA0) or siRNA against HSPA2 or HSF2. The HSF1 protein levels were analyzed by western blotting. (F, G) Results are expressed as the mean ± SEM from three independent experiments (n=4 for each experiment; *p<0.05). The effectiveness of the siRNA knockdown and miR-29 mimic experiments is shown in supplemental data S2.

Figure 5. Plasma miR-18a and miR-29 relevant for hypospermatogenesis and adult exposure to EB induce reversible germ cell death through miRNA deregulation.

(A) Mature miR-18a, 29a, 29b, and 29c levels were quantified in the blood from adult rats unexposed (0) or exposed to EB during the neonatal period (2.5 µg/d). The miRNA levels were normalized to the cel-miR-39 level and expressed as the mean ± SEM, n=7-8 (*, p<0.05).

Adult rats (PND90) were untreated (0) or treated for 5 days with EB (2.5 µg/kg/d, EB). Animals were sacrificed just after treatment (PND 90) or maintained without additional treatment until PND 150. (B) TUNEL-positive cells (green fluorescent signal, arrow) per 100 seminiferous tubules are expressed as the mean ± SEM, n=6 (* p<0.05). (C) HSF1, HSF2, and HSPA2 protein levels are expressed as a percentage ratio (target protein/ACTIN) detected in untreated rats. Results are expressed as the mean ± SEM, n=9 (* p<0.05). (D) Mature miR-18a, miR-29a, b, and c levels were normalized to the small nucleolar RNA levels. Results are expressed as the mean ± SEM, n=9 (* p<0.05).

Supplemental data

Supplemental Data 1. Neonatal exposure to EB induces a germ cell apoptotic phenotype in adult testes. (A) Testes, (B) H&E-stained testes, and (C) TUNEL-stained testes from 90-d-old rats exposed from PND 1 to PND 5 to the vehicle (0) or EB (2.5, 12.5, or 25 µg/d). The green fluorescence signal corresponds to TUNEL-positive (apoptotic) cells. The nuclei were counterstained with DAPI (blue signal).

Supplemental Data 2. Effectiveness of the siRNA knockdown and miR-29 mimic in vitro. GC1 cells were transiently transfected for 48 h with siRNA raised against DNMT1 (A), DNMT3A (B), DNMT3B (C), HSPA2 (D) HSF2 (E) or with a miR-29 mimic (F) prior to the evaluation of the protein levels. Data are presented as the mean ± SD from three independent experiments (n=4 for each experiment).

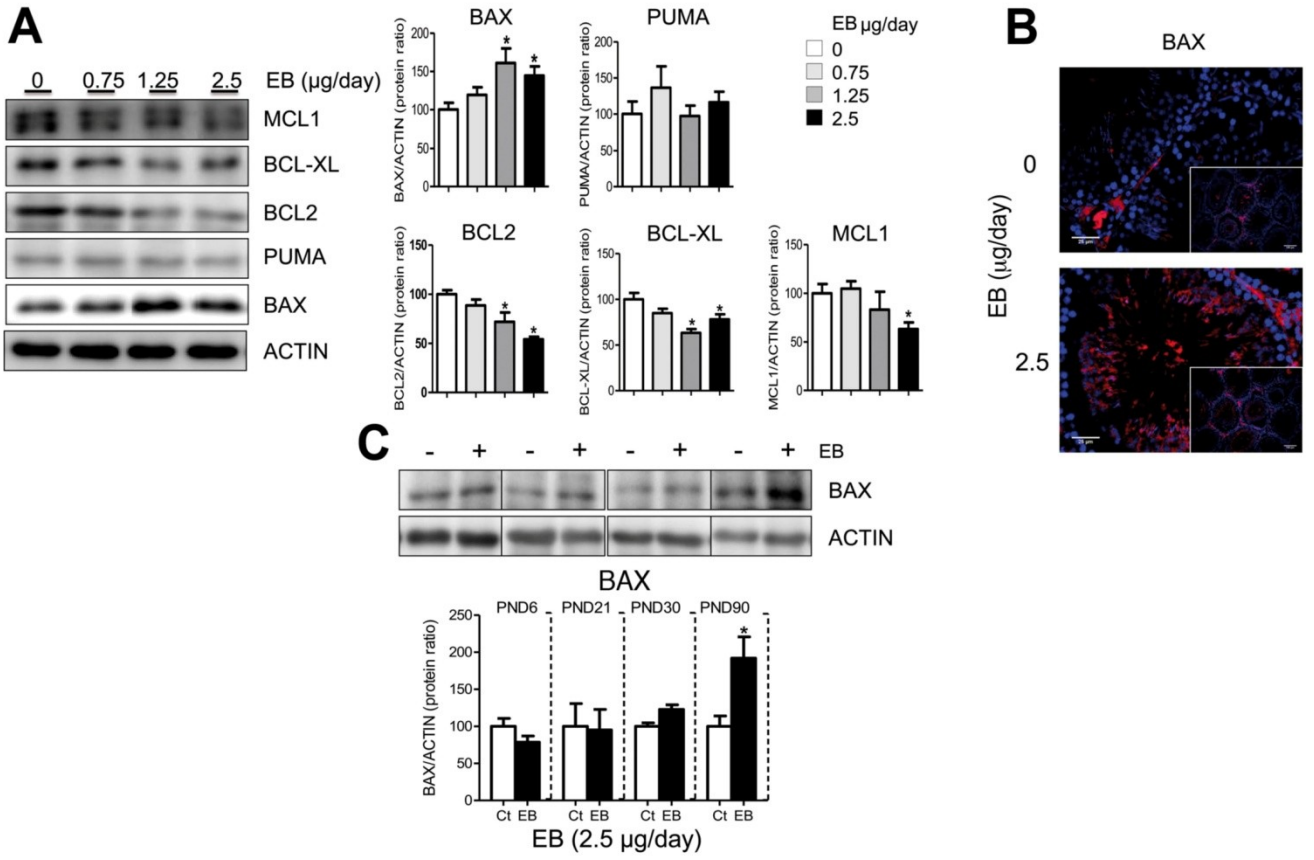

A
0
0.75
1.25
2.5
EB (µg/day)
MCL1
BCL-XL
BCL2
PUMA
BAX
ACTIN
BAX
PUMA
EB µg/day
0
0.75
1.25
2.5
BAX/ACTIN (protein ratio)
PUMA/ACTIN (protein ratio)
BCL2
BCL-XL
MCL1
BCL2/ACTIN (protein ratio)
BCL-XL/ACTIN (protein ratio)
MCL1/ACTIN (protein ratio)
B
BAX
0
2.5
EB (µg/day)
C
- + - + - + - + EB
BAX
ACTIN
BAX
PND6
PND21
PND30
PND90
BAX/ACTIN (protein ratio)
Ct EB Ct EB Ct EB Ct EB
EB (2.5 µg/day)

Figure 1

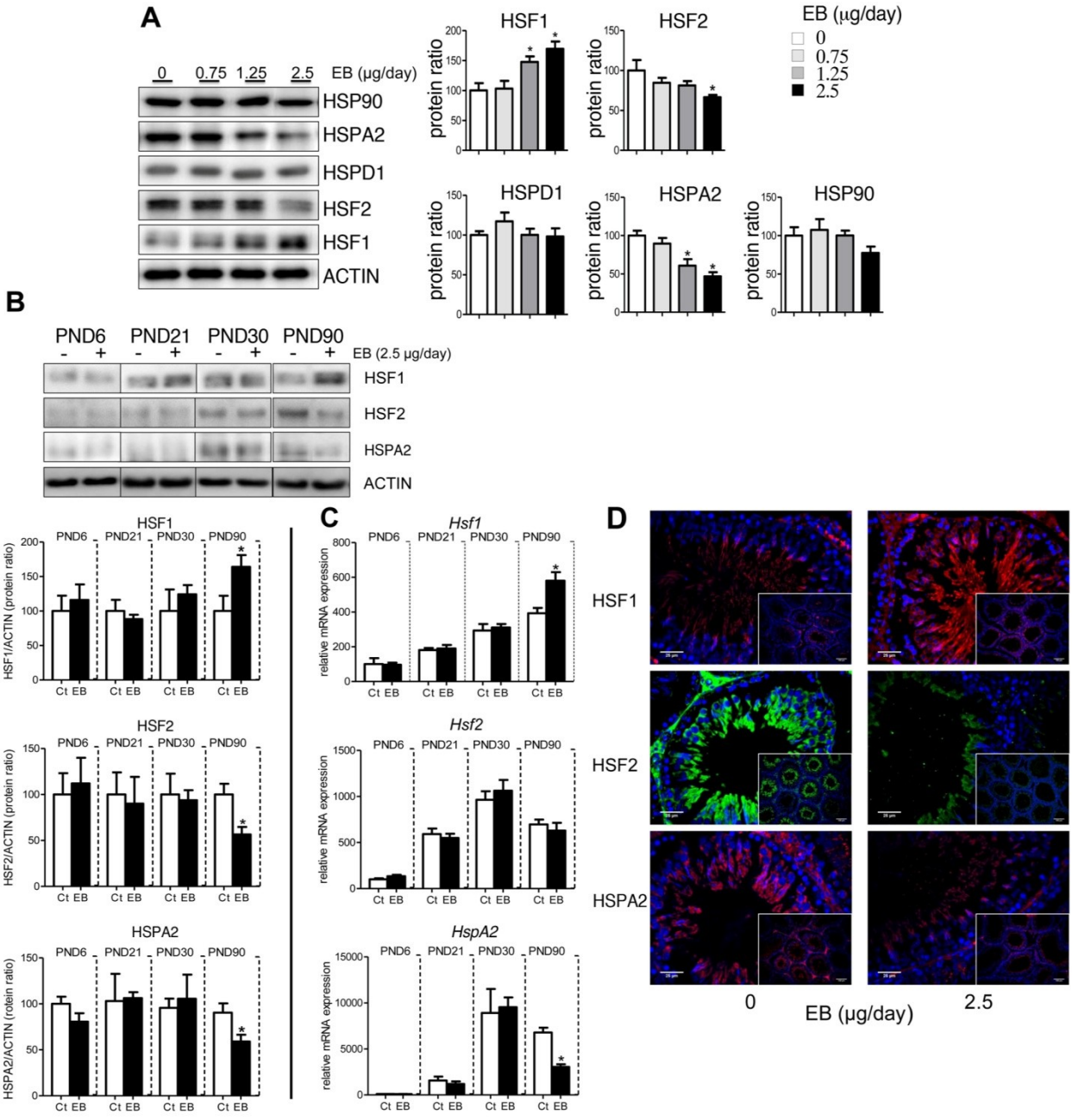

A
0
0.75
1.25
2.5
EB (µg/day)
HSP90
HSPA2
HSPD1
HSF2
HSF1
ACTIN
HSF1
HSF2
HSPD1
HSPA2
HSP90
protein ratio
EB (µg/day)
0
0.75
1.25
2.5
B
PND6
PND21
PND30
PND90
EB (2.5 µg/day)
HSF1
HSF2
HSPA2
ACTIN
HSF1
HSF2
HSPA2
HSF1/ACTIN (protein ratio)
HSF2/ACTIN (protein ratio)
HSPA2/ACTIN (rotein ratio)
Ct EB
C
Hsf1
Hsf2
HspA2
relative mRNA expression
D
HSF1
HSF2
HSPA2
0
2.5
EB (µg/day)

Figure 2

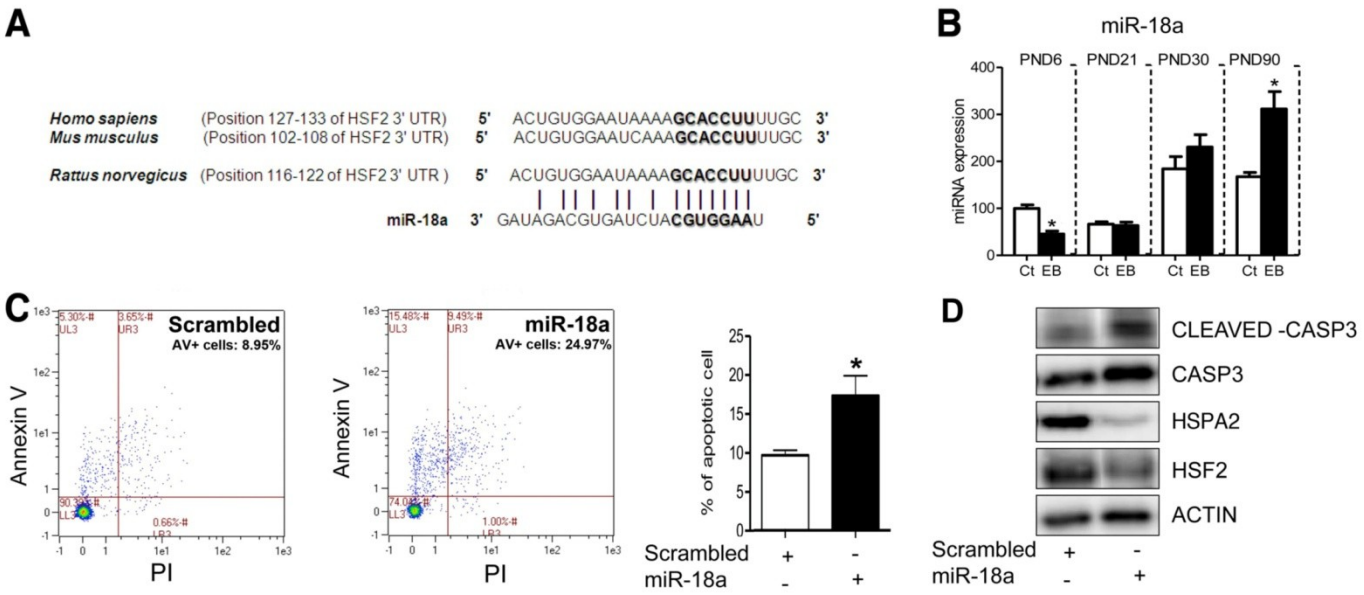

A
Homo sapiens (Position 127-133 of HSF2 3' UTR) 5' ACUGUGGAAUAAAAGCACCUUUUGC 3'
Mus musculus (Position 102-108 of HSF2 3' UTR) 5' ACUGUGGAAUCAAAGCACCUUUUGC 3'
Rattus norvegicus (Position 116-122 of HSF2 3' UTR) 5' ACUGUGGAAUAAAAGCACCUUUUGC 3'
miR-18a 3' GAUAGACGUGAUCUACGUGGAAU 5'
B
miR-18a
PND6
PND21
PND30
PND90
miRNA expression
Ct EB Ct EB Ct EB Ct EB
C
Scrambled
AV+ cells: 8.95%
miR-18a
AV+ cells: 24.97%
Annexin V
PI
% of apoptotic cell
Scrambled + -
miR-18a - +
D
CLEAVED -CASP3
CASP3
HSPA2
HSF2
ACTIN
Scrambled + -
miR-18a - +

Figure 3

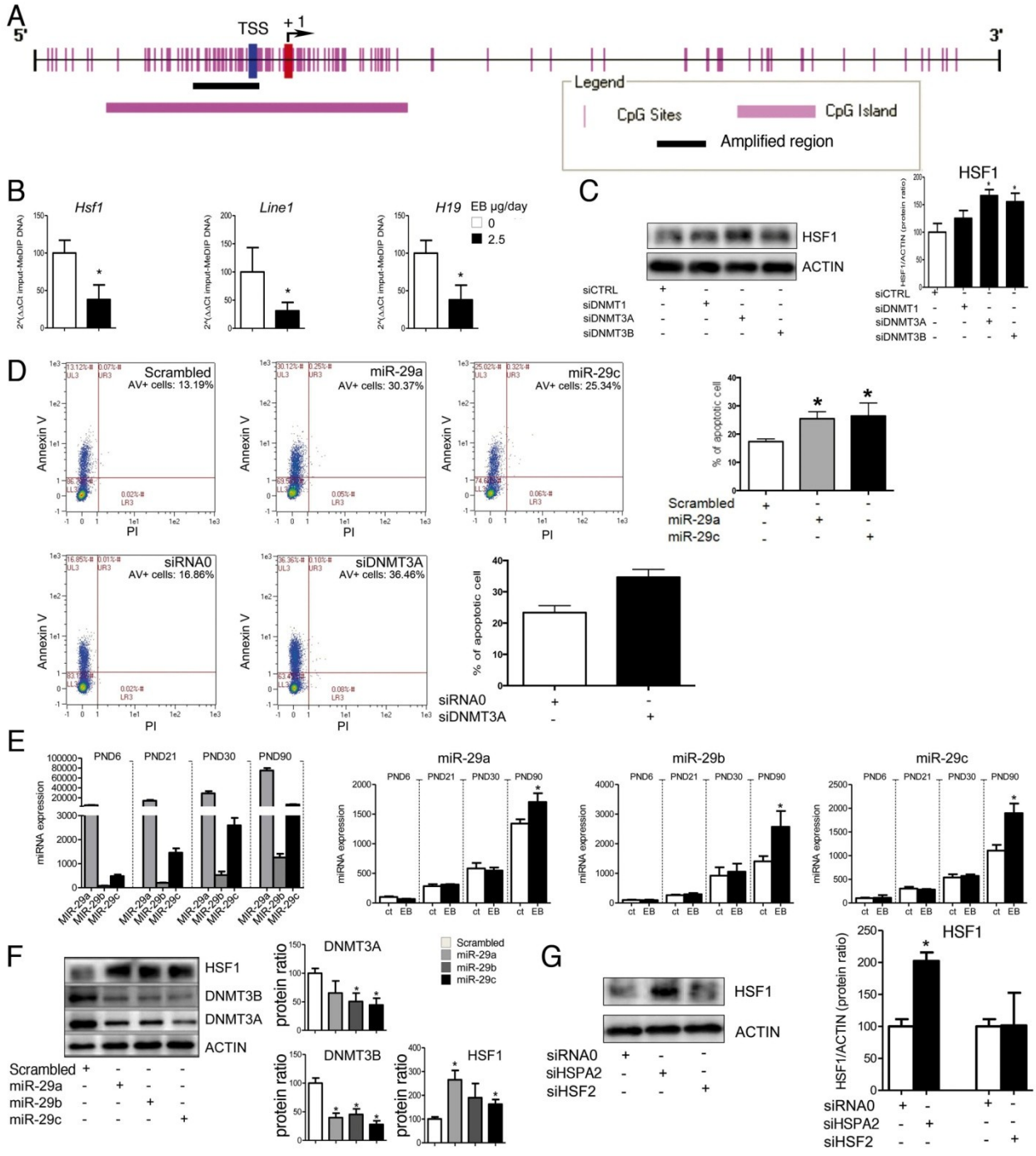

A
5'
TSS
+1
3'
Legend
CpG Sites
CpG Island
Amplified region
B
Hsf1
Line1
H19
EB µg/day
0
2.5
2^(-ΔΔCt imput-MeDIP DNA)
C
HSF1
ACTIN
siCTRL
siDNMT1
siDNMT3A
siDNMT3B
HSF1/ACTIN (protein ratio)
D
Scrambled
AV+ cells: 13.19%
miR-29a
AV+ cells: 30.37%
miR-29c
AV+ cells: 25.34%
siRNA0
AV+ cells: 16.86%
siDNMT3A
AV+ cells: 36.46%
Annexin V
PI
% of apoptotic cell
Scrambled
miR-29a
miR-29c
siRNA0
siDNMT3A
E
PND6
PND21
PND30
PND90
miRNA expression
MIR-29a
MIR-29b
MIR-29c
miR-29a
miR-29b
miR-29c
ct
EB
F
HSF1
DNMT3B
DNMT3A
ACTIN
Scrambled
miR-29a
miR-29b
miR-29c
protein ratio
G
HSF1
ACTIN
siRNA0
siHSPA2
siHSF2
HSF1/ACTIN (protein ratio)

Figure 4

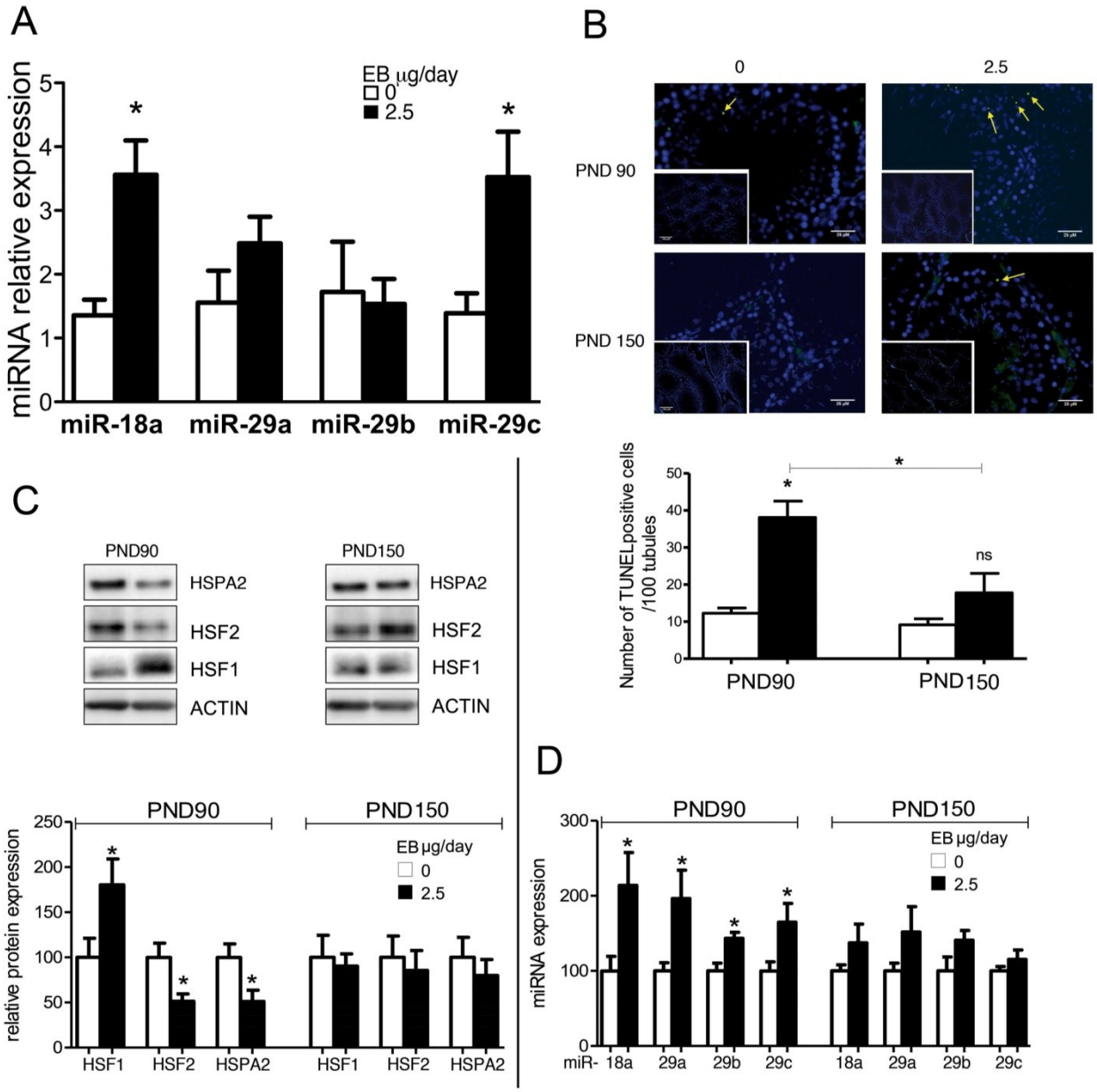
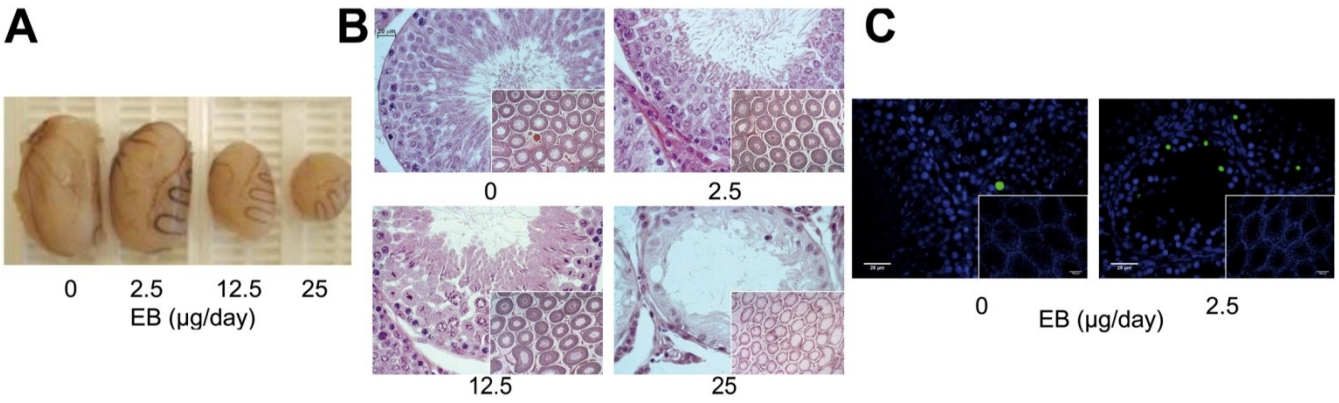
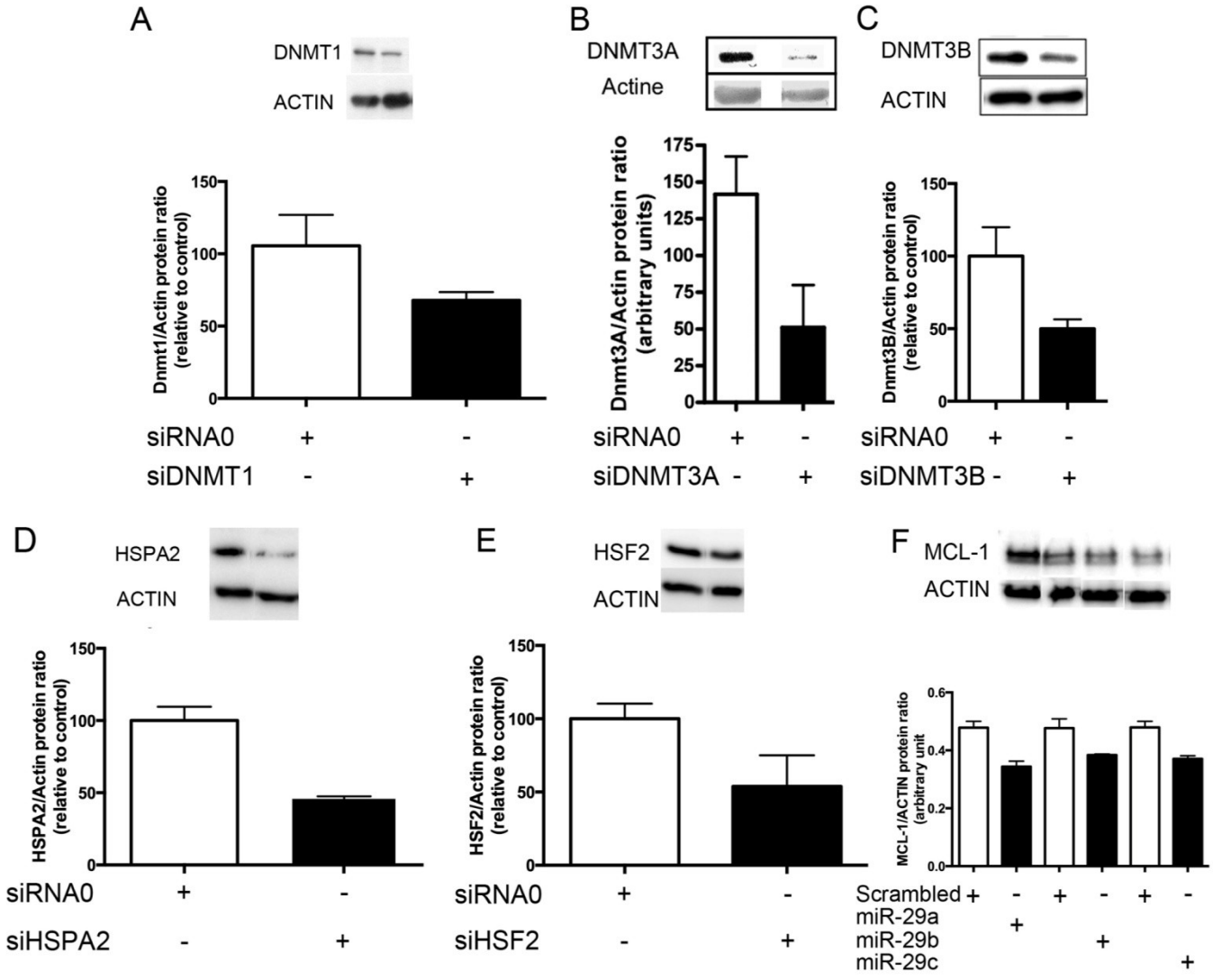

A
miRNA relative expression
EB µg/day
0
2.5
miR-18a
miR-29a
miR-29b
miR-29c
B
0
2.5
PND 90
PND 150
Number of TUNEL positive cells /100 tubules
ns
PND90
PND150
C
PND90
PND150
HSPA2
HSF2
HSF1
ACTIN
relative protein expression
HSF1
HSF2
HSPA2
D
miRNA expression
miR- 18a 29a 29b 29c

Figure 5



Supplemental data 1



Supplemental data 2

BIBLIOGRAPHIE

1. Ellinger, I., *The Calcium-Sensing Receptor and the Reproductive System.* Front Physiol, 2016. **7**: p. 371.
2. Holstein, A.F., W. Schulze, and M. Davidoff, *Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment.* Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 107.
3. Hermo, L., et al., *Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes.* Microsc Res Tech, 2010. **73**(4): p. 241-78.
4. Haider, S.G., *Cell biology of Leydig cells in the testis.* Int Rev Cytol, 2004. **233**: p. 181-241.
5. Haider, S.G., *Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria.* Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2581-2.
6. Tran, N., G. Servos, and S.G. Haider, *Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium.* Anat Embryol (Berl), 2006. **211**(4): p. 273-82.
7. Maekawa, M., K. Kamimura, and T. Nagano, *Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function.* Arch Histol Cytol, 1996. **59**(1): p. 1-13.
8. Hales, D.B., *Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis.* J Reprod Immunol, 2002. **57**(1-2): p. 3-18.
9. Christensen, A.K. and D.W. Fawcett, *The fine structure of testicular interstitial cells in mice.* Am J Anat, 1966. **118**(2): p. 551-71.
10. Russell, L.D., et al., *A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell.* Am J Anat, 1990. **188**(1): p. 21-30.
11. Mruk, D.D. and C.Y. Cheng, *Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis.* Endocr Rev, 2004. **25**(5): p. 747-806.
12. Griswold, M.D., *The central role of Sertoli cells in spermatogenesis.* Semin Cell Dev Biol, 1998. **9**(4): p. 411-6.
13. Hai, Y., et al., *The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis.* Semin Cell Dev Biol, 2014. **29**: p. 66-75.
14. Johnson, L., D.L. Thompson, Jr., and D.D. Varner, *Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis.* Anim Reprod Sci, 2008. **105**(1-2): p. 23-51.
15. Vogl, A.W., et al., *Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations.* Arch Histol Cytol, 2000. **63**(1): p. 1-15.
16. Petersen, C. and O. Soder, *The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size.* Horm Res, 2006. **66**(4): p. 153-61.
17. Chung, S.S., et al., *Evidence for cross-talk between Sertoli and germ cells using selected cathepsins as markers.* J Androl, 1998. **19**(6): p. 686-703.
18. de Kretser, D.M., et al., *The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology.* Mol Cell Endocrinol, 2004. **225**(1-2): p. 57-64.
19. Welt, C., et al., *Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium.* Exp Biol Med (Maywood), 2002. **227**(9): p. 724-52.
20. Itman, C., et al., *Developmentally regulated SMAD2 and SMAD3 utilization directs activin signaling outcomes.* Dev Dyn, 2009. **238**(7): p. 1688-700.
21. Davis, C.M., et al., *Differential expression of extracellular matrix components in rat Sertoli cells.* Biol Reprod, 1990. **43**(5): p. 860-9.
22. Mark, M., et al., *Role of retinoic acid receptor (RAR) signaling in post-natal male germ cell differentiation.* Biochim Biophys Acta, 2014.
23. Clermont, Y., *The cycle of the seminiferous epithelium in man.* Am J Anat, 1963. **112**: p. 35-51.
24. Hermann, B.P., et al., *Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents?* Reproduction, 2010. **139**(3): p. 479-93.

25. Tegelenbosch, R.A. and D.G. de Rooij, *A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse.* Mutat Res, 1993. **290**(2): p. 193-200.
26. Oatley, J.M. and R.L. Brinster, *Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2008. **24**: p. 263-86.
27. de Rooij, D.G., *Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells.* Reproduction, 2001. **121**(3): p. 347-54.
28. Sun, D.L., X.D. Zhang, and B.F. Jin, *[Molecular mechanisms of proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells].* Zhonghua Nan Ke Xue, 2011. **17**(3): p. 268-72.
29. Cohen, P.E. and J.W. Pollard, *Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals.* Bioessays, 2001. **23**(11): p. 996-1009.
30. Cheng, C.Y. and D.D. Mruk, *The biology of spermatogenesis: the past, present and future.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1546): p. 1459-63.
31. Yoshinaga, K. and K. Toshimori, *Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation.* Microsc Res Tech, 2003. **61**(1): p. 39-45.
32. Holdcraft, R.W. and R.E. Braun, *Hormonal regulation of spermatogenesis.* Int J Androl, 2004. **27**(6): p. 335-42.
33. Huhtaniemi, I., *Gonadotrophin actions on the testis--genotypes and phenotypes of gonadotrophin and gonadotrophin receptor mutations.* Endocr Dev, 2003. **5**: p. 81-103.
34. Amory, J.K. and W. Bremner, *Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development.* Mol Cell Endocrinol, 2001. **182**(2): p. 175-9.
35. McLachlan, R.I., et al., *Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive.* J Androl, 2002. **23**(2): p. 149-62.
36. McLachlan, R.I., et al., *Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man.* Recent Prog Horm Res, 2002. **57**: p. 149-79.
37. Walker, W.H. and J. Cheng, *FSH and testosterone signaling in Sertoli cells.* Reproduction, 2005. **130**(1): p. 15-28.
38. Roser, J.F., *Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems.* Anim Reprod Sci, 2008. **107**(3-4): p. 179-96.
39. Schlatt, S. and J. Ehmcke, *Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective.* Semin Cell Dev Biol, 2014. **29**: p. 2-16.
40. de Rooij, D.G., D. Lok, and D. Weenk, *Feedback regulation of the proliferation of the undifferentiated spermatogonia in the Chinese hamster by the differentiating spermatogonia.* Cell Tissue Kinet, 1985. **18**(1): p. 71-81.
41. Siegel, E.T., et al., *The molecular basis of impaired follicle-stimulating hormone action: evidence from human mutations and mouse models.* Reprod Sci, 2013. **20**(3): p. 211-33.
42. O'Shaughnessy, P.J., et al., *Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors.* Reproduction, 2010. **139**(1): p. 177-84.
43. Dankbar, B., et al., *Ubiquitous expression of the androgen receptor and testis-specific expression of the FSH receptor in the cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) revealed by a ribonuclease protection assay.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **55**(1): p. 35-41.
44. Aravindan, G.R., et al., *Effect of altering endogenous gonadotrophin concentrations on the kinetics of testicular germ cell turnover in the bonnet monkey (Macaca radiata).* J Endocrinol, 1993. **137**(3): p. 485-95.
45. Lindstedt, G., et al., *Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSHbeta gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal serum testosterone concentrations.* Clin Chem Lab Med, 1998. **36**(8): p. 663-5.
46. Schlatt, S., et al., *Modulating testicular mass in xenografting: a model to explore testis development and endocrine function.* Endocrinology, 2010. **151**(8): p. 4018-23.

47. Foppiani, L., et al., *Inhibin B is a more sensitive marker of spermatogenetic damage than FSH in the irradiated non-human primate model.* J Endocrinol, 1999. **162**(3): p. 393-400.
48. Schlatt, S., et al., *Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes.* Hum Reprod, 2002. **17**(1): p. 55-62.
49. Chang, C., et al., *Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(18): p. 6876-81.
50. De Gendt, K., et al., *A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1327-32.
51. O'Shaughnessy, P.J., *Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis.* Semin Cell Dev Biol, 2014. **29**: p. 55-65.
52. Skinner, M.K., et al., *Cell-cell interactions and the regulation of testis function.* Ann N Y Acad Sci, 1991. **637**: p. 354-63.
53. Ruwanpura, S.M., R.I. McLachlan, and S.J. Meachem, *Hormonal regulation of male germ cell development.* J Endocrinol, 2010. **205**(2): p. 117-31.
54. Weinbauer, G.F., Gromoll, J., Simoni, M., Nieschlag, E. and H.M.B. E. Nieschlag, *Physiology of testicular function*. 1997: E. Nieschlag, H.M. Behre (Eds.), *Andrology, male reproductive health and dysfunction (1st ed.) [Chapter 3]* p. 25-57.
55. Le Roy, C., et al., *Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1999. **69**(1-6): p. 379-84.
56. Svechnikov, K., et al., *The paracrine role played by interleukin-1 alpha in the testis.* Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2004. **4**(1): p. 67-74.
57. Syed, V., et al., *Identification, ontogeny, and regulation of an interleukin-6-like factor in the rat seminiferous tubule.* Endocrinology, 1993. **132**(1): p. 293-9.
58. Van Pelt, A.M. and D.G. De Rooij, *The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement.* Biol Reprod, 1990. **42**(4): p. 677-82.
59. van Pelt, A.M. and D.G. de Rooij, *Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice.* Biol Reprod, 1990. **43**(3): p. 363-67.
60. Zervos, I.A., et al., *Effects of dietary vitamin A intake on acrosin- and plasminogen-activator activity of ram spermatozoa.* Reproduction, 2005. **129**(6): p. 707-15.
61. Morales, C. and M.D. Griswold, *Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat.* Endocrinology, 1987. **121**(1): p. 432-4.
62. Van Beek, M.E. and M.L. Meistrich, *A method for quantifying synchrony in testes of rats treated with vitamin A deprivation and readministration.* Biol Reprod, 1990. **42**(3): p. 424-31.
63. van Pelt, A.M. and D.G. de Rooij, *Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells.* Endocrinology, 1991. **128**(2): p. 697-704.
64. Toppari, J., *Is semen quality declining?* Andrologia, 1996. **28**(6): p. 307-8.
65. Boisen, K.A., et al., *Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome.* Ann N Y Acad Sci, 2001. **948**: p. 90-9.
66. Auger, J., et al., *Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years.* N Engl J Med, 1995. **332**(5): p. 281-5.
67. Sharpe, R.M. and D.S. Irvine, *How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?* BMJ, 2004. **328**(7437): p. 447-51.
68. Toppari, J., et al., *Male reproductive health and environmental xenoestrogens.* Environ Health Perspect, 1996. **104 Suppl 4**: p. 741-803.
69. Toppari, J., M. Kaleva, and H.E. Virtanen, *Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data.* Hum Reprod Update, 2001. **7**(3): p. 282-6.

70. Skakkebaek, N.E., E. Rajpert-De Meyts, and K.M. Main, *Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects.* Hum Reprod, 2001. **16**(5): p. 972-8.
71. Skakkebaek, N.E., et al., *Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis.* APMIS, 2003. **111**(1): p. 1-9; discussion 9-11.
72. Skakkebaek, N.E., et al., *Is human fecundity declining?* Int J Androl, 2006. **29**(1): p. 2-11.
73. Akre, O., A. Pettersson, and L. Richiardi, *Risk of contralateral testicular cancer among men with unilaterally undescended testis: a meta analysis.* Int J Cancer, 2009. **124**(3): p. 687-9.
74. Akre, O. and L. Richiardi, *Does a testicular dysgenesis syndrome exist?* Hum Reprod, 2009. **24**(9): p. 2053-60.
75. Wood, H.M. and J.S. Elder, *Cryptorchidism and testicular cancer: separating fact from fiction.* J Urol, 2009. **181**(2): p. 452-61.
76. Sharpe, R.M. and N.E. Skakkebaek, *Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?* Lancet, 1993. **341**(8857): p. 1392-5.
77. Delbes, G., et al., *[Is fetal testis in danger?].* Med Sci (Paris), 2005. **21**(12): p. 1083-8.
78. Rajpert-De Meyts, E., et al., *Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia.* APMIS, 1998. **106**(1): p. 198-204; discussion 204-6.
79. Manson, J.M. and M.C. Carr, *Molecular epidemiology of hypospadias: review of genetic and environmental risk factors.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2003. **67**(10): p. 825-36.
80. Hennekam, R.C., et al., *Elements of morphology: standard terminology for the external genitalia.* Am J Med Genet A, 2013. **161A**(6): p. 1238-63.
81. Shih, E.M. and J.M. Graham, Jr., *Review of genetic and environmental factors leading to hypospadias.* Eur J Med Genet, 2014. **57**(8): p. 453-63.
82. Paulozzi, L.J., J.D. Erickson, and R.J. Jackson, *Hypospadias trends in two US surveillance systems.* Pediatrics, 1997. **100**(5): p. 831-4.
83. Bay, K., et al., *Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2006. **20**(1): p. 77-90.
84. Barthold, J.S. and R. Gonzalez, *The epidemiology of congenital cryptorchidism, testicular ascent and orchiopexy.* J Urol, 2003. **170**(6 Pt 1): p. 2396-401.
85. Boisen, K.A., et al., *Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries.* Lancet, 2004. **363**(9417): p. 1264-9.
86. Papparella, A., et al., *[Epidemiology and treatment of cryptorchidism and retractile testis: retrospective study in the area of Naples].* Minerva Pediatr, 2013. **65**(1): p. 77-82.
87. Blomberg, M.I. and B. Kallen, *Maternal obesity and morbid obesity: the risk for birth defects in the offspring.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010. **88**(1): p. 35-40.
88. Gill, S.K., et al., *Association between maternal age and birth defects of unknown etiology: United States, 1997-2007.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012. **94**(12): p. 1010-8.
89. Schenzle, D., K. Dietz, and G.G. Frosner, *Antibody against hepatitis A in seven European countries. II. Statistical analysis of cross-sectional surveys.* Am J Epidemiol, 1979. **110**(1): p. 70-6.
90. Kumpe, D.A., et al., *Intracranial neurosarcoidosis.* J Comput Assist Tomogr, 1979. **3**(3): p. 324-30.
91. Richardson, J.L., *Colorectal cancer: a mass screening and education program.* Geriatrics, 1977. **32**(2): p. 123-31.
92. Cheever, M.A., P.D. Greenberg, and A. Fefer, *Tumor neutralization, immunotherapy, and chemoimmunotherapy of a Friend leukemia with cells secondarily sensitized in vitro: II. Comparison of cells cultured with and without tumor to noncultured immune cells.* J Immunol, 1978. **121**(6): p. 2220-7.
93. Battin, M., S. Albersheim, and D. Newman, *Congenital genitourinary tract abnormalities following cocaine exposure in utero.* Am J Perinatol, 1995. **12**(6): p. 425-8.

94. North, K. and J. Golding, *A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood.* BJU Int, 2000. **85**(1): p. 107-13.
95. Carmichael, S.L., G.M. Shaw, and E.J. Lammer, *Environmental and genetic contributors to hypospadias: a review of the epidemiologic evidence.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012. **94**(7): p. 499-510.
96. Kristensen, D.M., et al., *Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat.* Hum Reprod, 2011. **26**(1): p. 235-44.
97. Ema, M., E. Miyawaki, and K. Kawashima, *Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy.* Toxicol Lett, 2000. **111**(3): p. 271-8.
98. Swan, S.H., et al., *Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure.* Environ Health Perspect, 2005. **113**(8): p. 1056-61.
99. Suzuki, Y., et al., *Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns.* Int J Androl, 2012. **35**(3): p. 236-44.
100. Virtanen, H. and J. Toppari, *[Pathogenesis of undescended testis].* Duodecim, 2014. **130**(11): p. 1086-92.
101. Hutson, J.M., et al., *The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism.* Endocr Rev, 2013. **34**(5): p. 725-52.
102. Laitinen, E.M., et al., *Isolated cryptorchidism: no evidence for involvement of genes underlying isolated hypogonadotropic hypogonadism.* Mol Cell Endocrinol, 2011. **341**(1-2): p. 35-8.
103. Ferlin, A., et al., *Genetic alterations associated with cryptorchidism.* JAMA, 2008. **300**(19): p. 2271-6.
104. Cortes, D., J. Thorup, and J. Visfeldt, *Hormonal treatment may harm the germ cells in 1 to 3-year-old boys with cryptorchidism.* J Urol, 2000. **163**(4): p. 1290-2.
105. Toppari, J., W. Rodprasert, and H.E. Virtanen, *Cryptorchidism --disease or symptom?* Ann Endocrinol (Paris), 2014. **75**(2): p. 72-6.
106. Cobellis, G., et al., *Spermatogenesis and cryptorchidism.* Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 63.
107. Jensen, M.S., et al., *Cryptorchidism concordance in monozygotic and dizygotic twin brothers, full brothers, and half-brothers.* Fertil Steril, 2010. **93**(1): p. 124-9.
108. Damgaard, I.N., et al., *Risk factors for congenital cryptorchidism in a prospective birth cohort study.* PLoS One, 2008. **3**(8): p. e3051.
109. Virtanen, H.E., et al., *Mild gestational diabetes as a risk factor for congenital cryptorchidism.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(12): p. 4862-5.
110. Henriksen, T.B., et al., *Alcohol consumption at the time of conception and spontaneous abortion.* Am J Epidemiol, 2004. **160**(7): p. 661-7.
111. Damgaard, I.N., et al., *Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism.* Environ Health Perspect, 2006. **114**(7): p. 1133-8.
112. Hosie, S., et al., *Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes?* Eur J Pediatr Surg, 2000. **10**(5): p. 304-9.
113. Vega, A., et al., *Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures.* Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 150.
114. Parkin, D.M., et al., *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000.* Int J Cancer, 2001. **94**(2): p. 153-6.
115. Sesterhenn, I.A. and C.J. Davis, Jr., *Pathology of germ cell tumors of the testis.* Cancer Control, 2004. **11**(6): p. 374-87.
116. Dieckmann, K.P. and N.E. Skakkebaek, *Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features.* Int J Cancer, 1999. **83**(6): p. 815-22.

117. Rajpert-De Meyts, E., *Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects.* Hum Reprod Update, 2006. **12**(3): p. 303-23.
118. Looijenga, L.H., et al., *POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors.* Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2244-50.
119. Gillis, A.J., et al., *Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis.* Int J Androl, 2011. **34**(4 Pt 2): p. e160-74.
120. Almstrup, K., et al., *Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling.* Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4736-43.
121. Skakkebaek, N.E., et al., *Testicular cancer trends as 'whistle blowers' of testicular developmental problems in populations.* Int J Androl, 2007. **30**(4): p. 198-204; discussion 204-5.
122. Almstrup, K., et al., *Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells.* Br J Cancer, 2010. **103**(8): p. 1269-76.
123. Shanmugalingam, T., et al., *Global incidence and outcome of testicular cancer.* Clin Epidemiol, 2013. **5**: p. 417-27.
124. McGlynn, K.A. and B. Trabert, *Adolescent and adult risk factors for testicular cancer.* Nat Rev Urol, 2012. **9**(6): p. 339-49.
125. Mai, P.L., et al., *The International Testicular Cancer Linkage Consortium: a clinicopathologic descriptive analysis of 461 familial malignant testicular germ cell tumor kindred.* Urol Oncol, 2010. **28**(5): p. 492-9.
126. Dieckmann, K.P. and U. Pichlmeier, *The prevalence of familial testicular cancer: an analysis of two patient populations and a review of the literature.* Cancer, 1997. **80**(10): p. 1954-60.
127. Hemminki, K. and X. Li, *Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology.* Br J Cancer, 2004. **90**(9): p. 1765-70.
128. Nathanson, K.L., et al., *The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor.* Am J Hum Genet, 2005. **77**(6): p. 1034-43.
129. Rapley, E.A., et al., *Somatic mutations of KIT in familial testicular germ cell tumours.* Br J Cancer, 2004. **90**(12): p. 2397-401.
130. Linger, R., et al., *Analysis of the DND1 gene in men with sporadic and familial testicular germ cell tumors.* Genes Chromosomes Cancer, 2008. **47**(3): p. 247-52.
131. Kanetsky, P.A., et al., *Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer.* Nat Genet, 2009. **41**(7): p. 811-5.
132. Kratz, C.P., et al., *Variants in or near KITLG, BAK1, DMRT1, and TERT-CLPTM1L predispose to familial testicular germ cell tumour.* J Med Genet, 2011. **48**(7): p. 473-6.
133. Ohlson, C.G. and L. Hardell, *Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics.* Chemosphere, 2000. **40**(9-11): p. 1277-82.
134. Hardell, L., et al., *In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk.* Int J Androl, 2006. **29**(1): p. 228-34.
135. Hardell, L., et al., *Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer.* Environ Health Perspect, 2003. **111**(7): p. 930-4.
136. Huyghe, E., et al., *[Optimal evaluation of the infertile male. 2007 French urological association guidelines].* Prog Urol, 2008. **18**(2): p. 95-101.
137. Slama, R., et al., *Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis.* Hum Reprod, 2012. **27**(5): p. 1489-98.
138. Thonneau, P., et al., *Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989).* Hum Reprod, 1991. **6**(6): p. 811-6.
139. Swan, S.H., E.P. Elkin, and L. Fenster, *The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996.* Environ Health Perspect, 2000. **108**(10): p. 961-6.

140. Ezeh, U.I., et al., *Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia.* Hum Reprod, 1999. **14**(4): p. 1005-12.
141. Bhasin, S., *Approach to the infertile man.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 1995-2004.
142. Robin, G., et al., *[Why and how to assess hypospermia?].* Gynecol Obstet Fertil, 2008. **36**(10): p. 1035-42.
143. Schiff, J.D., P.S. Li, and M. Goldstein, *Correlation of ultrasonographic and orchidometer measurements of testis volume in adults.* BJU Int, 2004. **93**(7): p. 1015-7.
144. Marcelli, F., et al., *[Role of deep seminal tract imaging in the diagnosis of unilateral agenesis of the vas deferens. Case report of a patient with CFTR gene mutation].* Prog Urol, 2006. **16**(5): p. 617-9.
145. de la Taille, A., et al., *[Correlation of genitourinary abnormalities, spermiogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens].* Prog Urol, 1998. **8**(3): p. 370-6.
146. Sharpe, R.M., *Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1546): p. 1697-712.
147. Dohle, G.R., et al., *Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia.* Hum Reprod, 2002. **17**(1): p. 13-6.
148. Liu, R.Z., *[AZF deletions and male infertility].* Zhonghua Nan Ke Xue, 2012. **18**(11): p. 963-8.
149. Choi, J., et al., *Impaired spermatogenesis and gr/gr deletions related to Y chromosome haplogroups in Korean men.* PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43550.
150. Horvath, A., et al., *Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors.* Cancer Res, 2009. **69**(13): p. 5301-6.
151. Desdoits-Lethimonier, C., et al., *Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates.* Hum Reprod, 2012. **27**(5): p. 1451-9.
152. Albert, O. and B. Jegou, *A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood.* Hum Reprod Update, 2014. **20**(2): p. 231-49.
153. Volle, D.H., et al., *The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice.* J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3752-64.
154. Meunier, L., et al., *Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and Mcl-1.* Endocrinology, 2012. **153**(4): p. 1936-47.
155. Ali, S., et al., *Exposure to low-dose bisphenol A impairs meiosis in the rat seminiferous tubule culture model: a physiotoxicogenomic approach.* PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106245.
156. Wohlfahrt-Veje, C., K.M. Main, and N.E. Skakkebaek, *Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems.* Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(4): p. 459-65.
157. Clark, A.T., et al., *Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma.* Stem Cells, 2004. **22**(2): p. 169-79.
158. Rodriguez, E., et al., *Analysis of chromosome 12 aneuploidy in interphase cells from human male germ cell tumors by fluorescence in situ hybridization.* Genes Chromosomes Cancer, 1992. **5**(1): p. 21-9.
159. Ferlin, A., et al., *The INSL3-LGR8/GREAT ligand-receptor pair in human cryptorchidism.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(9): p. 4273-9.
160. Mifsud, A., et al., *Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility.* Fertil Steril, 2001. **75**(2): p. 275-81.
161. Harkonen, K., et al., *The polymorphic androgen receptor gene CAG repeat, pituitary-testicular function and andropausal symptoms in ageing men.* Int J Androl, 2003. **26**(3): p. 187-94.
162. Milatiner, D., et al., *Associations between androgen receptor CAG repeat length and sperm morphology.* Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1426-30.
163. Guillette, L.J., Jr., et al., *Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida.* Environ Health Perspect, 1994. **102**(8): p. 680-8.

164. Guillette, L.J., Jr. and E.A. Guillette, *Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health?* Toxicol Ind Health, 1996. **12**(3-4): p. 537-50.
165. Damstra, T., *Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children.* J Toxicol Clin Toxicol, 2002. **40**(4): p. 457-65.
166. Damstra, T., et al., *Persistent organic pollutants: potential health effects?* J Epidemiol Community Health, 2002. **56**(11): p. 824-5.
167. Weber, R.F., et al., *Environmental influences on male reproduction.* BJU Int, 2002. **89**(2): p. 143-8.
168. Lind, D.V., et al., *Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: a cohort study of 1027 mother-child pairs.* Hum Reprod, 2017. **32**(1): p. 223-231.
169. Aho, M., et al., *Is the incidence of hypospadias increasing? Analysis of Finnish hospital discharge data 1970-1994.* Environ Health Perspect, 2000. **108**(5): p. 463-5.
170. Pierik, F.H., et al., *A high hypospadias rate in The Netherlands.* Hum Reprod, 2002. **17**(4): p. 1112-5.
171. Mauduit, C., et al., *[Long-term effects of environmental endocrine disruptors on male fertility].* Gynecol Obstet Fertil, 2006. **34**(10): p. 978-84.
172. Main, K.M., et al., *Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age.* Environ Health Perspect, 2006. **114**(2): p. 270-6.
173. Chalbot, M.C., *Association entre exposition périnatale ou maternelle aux perturbateurs endocriniens et développement de l'enfant: cas de la cryptorchidie et de l'obésité*. 2012, Anses: Anses • Bulletin de veille scientifique no 19 • Santé / Environnement / Travail • Décembre 2012. p. 18-22.
174. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis.* Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
175. Horvitz, H.R., *Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans.* Cancer Res, 1999. **59**(7 Suppl): p. 1701s-1706s.
176. Marchetti, P., *[Apoptosis: basic knowledge and applications].* Gynecol Obstet Fertil, 2005. **33**(9): p. 632-41.
177. Leist, M., et al., *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis.* J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1481-6.
178. Alberts, B.J., A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*, ed. G.S.t. edition. 2002, New York.
179. Martinvalet, D., P. Zhu, and J. Lieberman, *Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis.* Immunity, 2005. **22**(3): p. 355-70.
180. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death.* Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
181. Mattson, M.P., *Apoptosis in neurodegenerative disorders.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(2): p. 120-9.
182. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.* Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
183. Shaha, C., R. Tripathi, and D.P. Mishra, *Male germ cell apoptosis: regulation and biology.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1546): p. 1501-15.
184. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis.* Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
185. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
186. Nagata, S., *Biddable death.* Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. E143-5.
187. Brenner, C. and G. Kroemer, *Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators.* Science, 2000. **289**(5482): p. 1150-1.

188. Brunner, T., et al., *Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology.* Semin Immunol, 2003. **15**(3): p. 167-76.
189. Trapani, J.A. and M.J. Smyth, *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 735-47.
190. Nicholson, D.W., *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.* Cell Death Differ, 1999. **6**(11): p. 1028-42.
191. Russell, L.D., et al., *Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis.* Biol Reprod, 2002. **66**(4): p. 950-8.
192. Billig, H., et al., *Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages.* Endocrinology, 1995. **136**(1): p. 5-12.
193. Kierszenbaum, A.L., *Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive.* Mol Reprod Dev, 2001. **58**(1): p. 1-3.
194. Rodriguez, I., et al., *An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis.* EMBO J, 1997. **16**(9): p. 2262-70.
195. Januskauska, A., A. Johannisson, and H. Rodriguez-Martinez, *Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls.* Theriogenology, 2001. **55**(4): p. 947-61.
196. Zheng, S., T.T. Turner, and J.J. Lysiak, *Caspase 2 activity contributes to the initial wave of germ cell apoptosis during the first round of spermatogenesis.* Biol Reprod, 2006. **74**(6): p. 1026-33.
197. Allan, D.J., B.V. Harmon, and S.A. Roberts, *Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat.* Cell Prolif, 1992. **25**(3): p. 241-50.
198. Johnson, L., C.S. Petty, and W.B. Neaves, *Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production.* Biol Reprod, 1983. **29**(1): p. 207-15.
199. Orth, J.M., G.L. Gunsalus, and A.A. Lamperti, *Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development.* Endocrinology, 1988. **122**(3): p. 787-94.
200. Print, C.G. and K.L. Loveland, *Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis.* Bioessays, 2000. **22**(5): p. 423-30.
201. Knudson, C.M., et al., *Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death.* Science, 1995. **270**(5233): p. 96-9.
202. Blanco-Rodriguez, J., C. Martinez-Garcia, and A. Porras, *Correlation between DNA synthesis in the second, third and fourth generations of spermatogonia and the occurrence of apoptosis in both spermatogonia and spermatocytes.* Reproduction, 2003. **126**(5): p. 661-8.
203. Blanco-Rodriguez, J. and C. Martinez-Garcia, *Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids.* Biol Reprod, 1999. **61**(6): p. 1541-7.
204. Arama, E., J. Agapite, and H. Steller, *Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in Drosophila.* Dev Cell, 2003. **4**(5): p. 687-97.
205. Tesarik, J., et al., *In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium.* Hum Reprod, 2002. **17**(7): p. 1811-9.
206. Rucker, E.B., 3rd, et al., *Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis.* Mol Endocrinol, 2000. **14**(7): p. 1038-52.
207. Yip, K.W. and J.C. Reed, *Bcl-2 family proteins and cancer.* Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6398-406.
208. Yan, W., et al., *Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro.* Mol Cell Endocrinol, 2000. **165**(1-2): p. 115-29.
209. Furuchi, T., et al., *Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia.* Development, 1996. **122**(6): p. 1703-9.

210. Yan, W., et al., *Overexpression of Bcl-W in the testis disrupts spermatogenesis: revelation of a role of BCL-W in male germ cell cycle control.* Mol Endocrinol, 2003. **17**(9): p. 1868-79.
211. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed, *IAP family proteins--suppressors of apoptosis.* Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 239-52.
212. Salvesen, G.S. and C.S. Duckett, *IAP proteins: blocking the road to death's door.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 401-10.
213. Weikert, S., et al., *The inhibitor of apoptosis (IAP) survivin is expressed in human testicular germ cell tumors and normal testes.* Cancer Lett, 2005. **223**(2): p. 331-7.
214. Lee, J., et al., *The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis.* Endocrinology, 1997. **138**(5): p. 2081-8.
215. Sugihara, A., et al., *Expression of Fas and Fas ligand in the testes and testicular germ cell tumors: an immunohistochemical study.* Anticancer Res, 1997. **17**(5B): p. 3861-5.
216. D'Alessio, A., et al., *Testicular FasL is expressed by sperm cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3316-21.
217. Jacobo, P.V., et al., *Involvement of soluble Fas Ligand in germ cell apoptosis in testis of rats undergoing autoimmune orchitis.* Cytokine, 2012. **60**(2): p. 385-92.
218. Lin, Y.C., P.L. Yao, and J.H. Richburg, *FasL gene-deficient mice display a limited disruption in spermatogenesis and inhibition of mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced germ cell apoptosis.* Toxicol Sci, 2010. **114**(2): p. 335-45.
219. Francavilla, S., et al., *Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis.* Mol Hum Reprod, 2002. **8**(3): p. 213-20.
220. Zou, H., et al., *An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.* J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11549-56.
221. Hikim, A.P., et al., *Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis.* Endocrinology, 2003. **144**(7): p. 3167-75.
222. Sinha Hikim, A.P., et al., *Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **85**(2-5): p. 175-82.
223. Hou, M., et al., *Bortezomib treatment causes long-term testicular dysfunction in young male mice.* Mol Cancer, 2014. **13**: p. 155.
224. Feki, A., et al., *BARD1 expression during spermatogenesis is associated with apoptosis and hormonally regulated.* Biol Reprod, 2004. **71**(5): p. 1614-24.
225. Rasoulpour, R.J. and K. Boekelheide, *NF-kappaB is activated in the rat testis following exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate.* Biol Reprod, 2005. **72**(2): p. 479-86.
226. Susin, S.A., et al., *Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis.* J Exp Med, 2000. **192**(4): p. 571-80.
227. Kim, J. and J. Soh, *Cadmium-induced apoptosis is mediated by the translocation of AIF to the nucleus in rat testes.* Toxicol Lett, 2009. **188**(1): p. 45-51.
228. Creagh, E.M., D. Sheehan, and T.G. Cotter, *Heat shock proteins--modulators of apoptosis in tumour cells.* Leukemia, 2000. **14**(7): p. 1161-73.
229. Ritossa, F., *A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila.* Experientia, 1962. **18**(12): p. 571-573.
230. Ritossa, F.M. and R.C. Vonborstel, *Chromosome Puffs in Drosophila Induced by Ribonuclease.* Science, 1964. **145**(3631): p. 513-4.
231. Ritossa, F., *Discovery of the heat shock response.* Cell Stress Chaperones, 1996. **1**(2): p. 97-8.
232. Amici, C., et al., *Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6227-31.
233. Gupta, S.C., et al., *Heat shock proteins in toxicology: how close and how far?* Life Sci, 2010. **86**(11-12): p. 377-84.
234. Berendes, H.D., *The induction of changes in chromosomal activity in different polytene types of cell in Drosophila hydei.* Dev Biol, 1965. **11**(3): p. 371-84.
235. Tissieres, A., H.K. Mitchell, and U.M. Tracy, *Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs.* J Mol Biol, 1974. **84**(3): p. 389-98.

236. Anckar, J. and L. Sistonen, *Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease.* Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 1089-115.
237. Morimoto, R.I., *Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes.* Science, 1993. **259**(5100): p. 1409-10.
238. Burel, C., et al., *Mammalian heat shock protein families. Expression and functions.* Experientia, 1992. **48**(7): p. 629-34.
239. Ashburner, M., *Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila. V. Responses to environmental treatments.* Chromosoma, 1970. **31**(3): p. 356-76.
240. Nguyen, V.T., M. Morange, and O. Bensaude, *Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells.* J Biol Chem, 1989. **264**(18): p. 10487-92.
241. Nakai, A., *New aspects in the vertebrate heat shock factor system: Hsf3 and Hsf4.* Cell Stress Chaperones, 1999. **4**(2): p. 86-93.
242. Wu, C., *The 5' ends of Drosophila heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I.* Nature, 1980. **286**(5776): p. 854-60.
243. Nover, L., et al., *The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors.* Cell Stress Chaperones, 1996. **1**(4): p. 215-23.
244. Pirkkala, L., P. Nykanen, and L. Sistonen, *Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond.* FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1118-31.
245. Fiorenza, M.T., et al., *Complex expression of murine heat shock transcription factors.* Nucleic Acids Res, 1995. **23**(3): p. 467-74.
246. Fujimoto, M., et al., *A novel mouse HSF3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock.* Mol Biol Cell, 2010. **21**(1): p. 106-16.
247. Nakai, A. and R.I. Morimoto, *Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(4): p. 1983-97.
248. Harrison, C.J., A.A. Bohm, and H.C. Nelson, *Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor.* Science, 1994. **263**(5144): p. 224-7.
249. Vuister, G.W., et al., *Solution structure of the DNA-binding domain of Drosophila heat shock transcription factor.* Nat Struct Biol, 1994. **1**(9): p. 605-14.
250. Lu, M., et al., *Alpha-helix 1 in the DNA-binding domain of heat shock factor 1 regulates its heat-induced trimerization and DNA-binding.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **385**(4): p. 612-7.
251. Takemori, Y., et al., *Mutational analysis of human heat-shock transcription factor 1 reveals a regulatory role for oligomerization in DNA-binding specificity.* Biochem J, 2009. **424**(2): p. 253-61.
252. Yamamoto, N., et al., *Differential recognition of heat shock elements by members of the heat shock transcription factor family.* FEBS J, 2009. **276**(7): p. 1962-74.
253. Sorger, P.K. and H.C. Nelson, *Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif.* Cell, 1989. **59**(5): p. 807-13.
254. Green, M., et al., *A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 3354-62.
255. Hoj, A. and B.K. Jakobsen, *A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation.* EMBO J, 1994. **13**(11): p. 2617-24.
256. Nieto-Sotelo, J., et al., *The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions.* Cell, 1990. **62**(4): p. 807-17.
257. Morimoto, R.I. and M.G. Santoro, *Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection.* Nat Biotechnol, 1998. **16**(9): p. 833-8.
258. Rabindran, S.K., et al., *Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper.* Science, 1993. **259**(5092): p. 230-4.

259. Zuo, J., et al., *Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(11): p. 7557-68.
260. Lanneau, D., *Rôle des Protéines de Choc Thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique*, in *U.F.R de Médecine*. 2010, UNIVERSITE DE BOURGOGNE. p. 188.
261. Fujimoto, M. and A. Nakai, *The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress.* FEBS J, 2010. **277**(20): p. 4112-25.
262. Bjork, J.K. and L. Sistonen, *Regulation of the members of the mammalian heat shock factor family.* FEBS J, 2010. **277**(20): p. 4126-39.
263. Abane, R. and V. Mezger, *Roles of heat shock factors in gametogenesis and development.* FEBS J, 2010. **277**(20): p. 4150-72.
264. Akerfelt, M., et al., *Heat shock factors at a crossroad between stress and development.* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1113**: p. 15-27.
265. Nakai, A., M. Suzuki, and M. Tanabe, *Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1.* EMBO J, 2000. **19**(7): p. 1545-54.
266. McMillan, D.R., et al., *Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis.* J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7523-8.
267. Zhong, M., A. Orosz, and C. Wu, *Direct sensing of heat and oxidation by Drosophila heat shock transcription factor.* Mol Cell, 1998. **2**(1): p. 101-8.
268. Akerfelt, M., R.I. Morimoto, and L. Sistonen, *Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(8): p. 545-55.
269. Satyal, S.H., et al., *Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1.* Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 1962-74.
270. Voellmy, R., *Feedback regulation of the heat shock response.* Handb Exp Pharmacol, 2006(172): p. 43-68.
271. Cotto, J.J., M. Kline, and R.I. Morimoto, *Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation.* J Biol Chem, 1996. **271**(7): p. 3355-8.
272. Anckar, J., et al., *Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(3): p. 955-64.
273. Hietakangas, V., et al., *Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(8): p. 2953-68.
274. Fritah, S., et al., *Heat-shock factor 1 controls genome-wide acetylation in heat-shocked cells.* Mol Biol Cell, 2009. **20**(23): p. 4976-84.
275. Whitesell, L. and S. Lindquist, *Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy.* Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(4): p. 469-78.
276. Vydra, N., et al., *Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells.* Cell Death Differ, 2006. **13**(2): p. 212-22.
277. Widlak, W., et al., *Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific hst70 gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium.* Acta Biochim Pol, 2003. **50**(2): p. 535-41.
278. Kus-Liskiewicz, M., et al., *Impact of heat shock transcription factor 1 on global gene expression profiles in cells which induce either cytoprotective or pro-apoptotic response following hyperthermia.* BMC Genomics, 2013. **14**: p. 456.
279. Widlak, W., et al., *Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70 kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testes.* Genes Cells, 2007. **12**(4): p. 487-99.
280. Sistonen, L., K.D. Sarge, and R.I. Morimoto, *Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2087-99.

281. Trinklein, N.D., et al., *Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation.* Cell Stress Chaperones, 2004. **9**(1): p. 21-8.
282. Ostling, P., et al., *Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1.* J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7077-86.
283. Xing, H., et al., *Mechanism of hsp70i gene bookmarking.* Science, 2005. **307**(5708): p. 421-3.
284. Sandqvist, A., et al., *Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli.* Mol Biol Cell, 2009. **20**(5): p. 1340-7.
285. Wilkerson, D.C., L.A. Murphy, and K.D. Sarge, *Interaction of HSF1 and HSF2 with the Hspa1b promoter in mouse epididymal spermatozoa.* Biol Reprod, 2008. **79**(2): p. 283-8.
286. Kallio, M., et al., *Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice.* EMBO J, 2002. **21**(11): p. 2591-601.
287. Wang, G., et al., *Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis.* Genesis, 2003. **36**(1): p. 48-61.
288. Mou, L., et al., *A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia.* Hum Genet, 2013. **132**(2): p. 159-65.
289. Miller, M.J., N.H. Xuong, and E.P. Geiduschek, *A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(10): p. 5222-5.
290. Hunt, C. and R.I. Morimoto, *Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(19): p. 6455-9.
291. Sikora, A. and E. Grzesiuk, *Heat shock response in gastrointestinal tract.* J Physiol Pharmacol, 2007. **58 Suppl 3**: p. 43-62.
292. Lanneau, D., et al., *Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation.* J Cell Mol Med, 2008. **12**(3): p. 743-61.
293. Beere, H.M., et al., *Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 469-75.
294. Bruey, J.M., et al., *Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 645-52.
295. Solary, E., et al., *Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies.* Leukemia, 2000. **14**(10): p. 1833-49.
296. Cheng, W., et al., *HSP60 is involved in the neuroprotective effects of naloxone.* Mol Med Rep, 2014. **10**(4): p. 2172-6.
297. Kampinga, H.H., et al., *Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins.* Cell Stress Chaperones, 2009. **14**(1): p. 105-11.
298. Arrigo, A.P., *The monovalent ionophore monensin maintains the nuclear localization of the human stress protein hsp28 during heat shock recovery.* J Cell Sci, 1990. **96 (Pt 3)**: p. 419-27.
299. Kappe, G., J.A. Leunissen, and W.W. de Jong, *Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins.* Prog Mol Subcell Biol, 2002. **28**: p. 1-17.
300. Garrido, C., et al., *Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27.* Eur J Biochem, 1996. **237**(3): p. 653-9.
301. Treweek, T.M., et al., *Small heat-shock proteins: important players in regulating cellular proteostasis.* Cell Mol Life Sci, 2014.
302. Kotlarz, A., et al., *Human Hsp40 proteins, DNAJA1 and DNAJA2, as potential targets of the immune response triggered by bacterial DnaJ in rheumatoid arthritis.* Cell Stress Chaperones, 2013. **18**(5): p. 653-9.
303. Rajoriya, J.S.P., J.K.; Ghosh, S.K; Perumal, P.; Kumar, A.; Kaushal, S.; Ramteke; S.S., *Studies on effect of different seasons on expression of HSP70 and HSP90 gene in sperm of Tharparkar bull semen.* Asian Pacific Journal of Reproduction, 2014. **3**(3): p. 192-199.

304. Ishihara, K., K. Yasuda, and T. Hatayama, *Molecular cloning, expression and localization of human 105 kDa heat shock protein, hsp105.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1444**(1): p. 138-42.
305. Daugaard, M., M. Rohde, and M. Jaattela, *The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions.* FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3702-10.
306. Taira, T., et al., *A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**(10): p. 1975-83.
307. Bonnycastle, L.L., et al., *Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2).* Genomics, 1994. **23**(1): p. 85-93.
308. Son, W.Y., et al., *Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis.* Fertil Steril, 2000. **73**(6): p. 1138-44.
309. Christians, E.S., et al., *Heat shock proteins in mammalian development.* Semin Cell Dev Biol, 2003. **14**(5): p. 283-90.
310. Cao, W., et al., *[Acute heat stress increases HSP70 expression in the testis, epididymis and vas deferens of adult male mice].* Zhonghua Nan Ke Xue, 2009. **15**(3): p. 200-6.
311. Nixon, B., et al., *Heat Shock Protein A2 (HSPA2): Regulatory Roles in Germ Cell Development and Sperm Function.* Adv Anat Embryol Cell Biol, 2017. **222**: p. 67-93.
312. Rockett, J.C., et al., *Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice.* Biol Reprod, 2001. **65**(1): p. 229-39.
313. Dix, D.J., et al., *Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3264-8.
314. Govin, J., et al., *Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis.* J Biol Chem, 2006. **281**(49): p. 37888-92.
315. Motiei, M., et al., *Evaluation of HSPA2 in fertile and infertile individuals.* Andrologia, 2013. **45**(1): p. 66-72.
316. Cedenho, A.P., et al., *Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa.* Hum Reprod, 2006. **21**(7): p. 1791-4.
317. Corduan, A., et al., *Sequential interplay between BAG6 and HSP70 upon heat shock.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(11-12): p. 1998-2004.
318. Sasaki, T., et al., *Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis.* J Cell Biol, 2008. **182**(3): p. 449-58.
319. Bromfield, E.G., et al., *Proteolytic degradation of heat shock protein A2 occurs in response to oxidative stress in male germ cells of the mouse.* Mol Hum Reprod, 2017. **23**(2): p. 91-105.
320. Amadio, M., et al., *Post-transcriptional regulation of HSP70 expression following oxidative stress in SH-SY5Y cells: the potential involvement of the RNA-binding protein HuR.* Curr Pharm Des, 2008. **14**(26): p. 2651-8.
321. Chi, M.N., et al., *The RNA-binding protein ELAVL1/HuR is essential for mouse spermatogenesis, acting both at meiotic and postmeiotic stages.* Mol Biol Cell, 2011. **22**(16): p. 2875-85.
322. Bromfield, E., R.J. Aitken, and B. Nixon, *Novel characterization of the HSPA2-stabilizing protein BAG6 in human spermatozoa.* Mol Hum Reprod, 2015. **21**(10): p. 755-69.
323. Gunther, E. and L. Walter, *Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates.* Experientia, 1994. **50**(11-12): p. 987-1001.
324. Milner, C.M. and R.D. Campbell, *Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes.* Immunogenetics, 1990. **32**(4): p. 242-51.
325. Lanneau, D., et al., *Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27.* Prion, 2007. **1**(1): p. 53-60.
326. Li, C.Y., et al., *Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation.* J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25665-71.
327. Stankiewicz, A.R., et al., *Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation.* J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38729-39.

328. Guzhova, I. and B. Margulis, *Hsp70 chaperone as a survival factor in cell pathology.* Int Rev Cytol, 2006. **254**: p. 101-49.
329. Garrido, C., et al., *Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties.* Cell Cycle, 2006. **5**(22): p. 2592-601.
330. Mosser, D.D. and R.I. Morimoto, *Molecular chaperones and the stress of oncogenesis.* Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2907-18.
331. Waddington, C.H., *The epigenotype. 1942.* Int J Epidemiol, 2012. **41**(1): p. 10-3.
332. Bird, A., *Perceptions of epigenetics.* Nature, 2007. **447**(7143): p. 396-8.
333. Berger, S.L., et al., *An operational definition of epigenetics.* Genes Dev, 2009. **23**(7): p. 781-3.
334. Dupont, C., D.R. Armant, and C.A. Brenner, *Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective.* Semin Reprod Med, 2009. **27**(5): p. 351-7.
335. Wu, C. and J.R. Morris, *Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence.* Science, 2001. **293**(5532): p. 1103-5.
336. Anway, M.D., et al., *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility.* Science, 2005. **308**(5727): p. 1466-9.
337. Guerrero-Bosagna, C., et al., *Epigenetic transgenerational inheritance of vinclozolin induced mouse adult onset disease and associated sperm epigenome biomarkers.* Reprod Toxicol, 2012. **34**(4): p. 694-707.
338. Anway, M.D. and M.K. Skinner, *Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease.* Reprod Biomed Online, 2008. **16**(1): p. 23-5.
339. Charles, M.A., *[Developmental origins of adult health and disease: an important concept for social inequalities in health].* Rev Epidemiol Sante Publique, 2013. **61 Suppl 3**: p. S133-8.
340. Charles, M.A.J., C., *Les origines développementales de la santé (DOHaD) et l'épigénétique. Une révolution pour la prévention des maladies chroniques de l'adulte.* 2012. **18**.
341. Gluckman, P.D., et al., *Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease.* N Engl J Med, 2008. **359**(1): p. 61-73.
342. Ferguson-Smith, A.C. and M.E. Patti, *You are what your dad ate.* Cell Metab, 2011. **13**(2): p. 115-7.
343. Dietz, D.M. and E.J. Nestler, *From father to offspring: paternal transmission of depressive-like behaviors.* Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(1): p. 311-2.
344. The American Association for Cancer Research Human Epigenome Task Force & European Union, N.o.E., Scientific Advisory Board, *Moving AHEAD with an international human epigenome project.* Nature, 2008. **454**: p. 711-715.
345. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Eukaryotic cytosine methyltransferases.* Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 481-514.
346. Delaval, K. and R. Feil, *Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting.* Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(2): p. 188-95.
347. Morison, I.M., J.P. Ramsay, and H.G. Spencer, *A census of mammalian imprinting.* Trends Genet, 2005. **21**(8): p. 457-65.
348. Davuluri, R.V., I. Grosse, and M.Q. Zhang, *Computational identification of promoters and first exons in the human genome.* Nat Genet, 2001. **29**(4): p. 412-7.
349. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.* Cell, 1992. **69**(6): p. 915-26.
350. Lippman, Z., et al., *Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control.* Nature, 2004. **430**(6998): p. 471-6.
351. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.* Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
352. Jin, B. and K.D. Robertson, *DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer.* Adv Exp Med Biol, 2013. **754**: p. 3-29.
353. Jacinto, F.V. and M. Esteller, *Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer.* Mutagenesis, 2007. **22**(4): p. 247-53.

354. Loughery, J.E., et al., *DNMT1 deficiency triggers mismatch repair defects in human cells through depletion of repair protein levels in a process involving the DNA damage response.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(16): p. 3241-55.
355. Ha, K., et al., *Rapid and transient recruitment of DNMT1 to DNA double-strand breaks is mediated by its interaction with multiple components of the DNA damage response machinery.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(1): p. 126-40.
356. Liao, H.F., et al., *DNMT3L promotes quiescence in postnatal spermatogonial progenitor cells.* Development, 2014. **141**(12): p. 2402-13.
357. Liu, Y., et al., *Global and cyp19a1a gene specific DNA methylation in gonads of adult rare minnow Gobiocypris rarus under bisphenol A exposure.* Aquat Toxicol, 2014. **156C**: p. 10-16.
358. Singh, S. and S.S. Li, *Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates.* Int J Mol Sci, 2012. **13**(8): p. 10143-53.
359. Zhang, Q., et al., *[Effects of bromopropane exposure on expression of DNA methyltransferases and level of histone acetylation in testis of male rats].* Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi, 2013. **31**(2): p. 92-5.
360. Kristensen, D.G., et al., *Evidence that active demethylation mechanisms maintain the genome of carcinoma in situ cells hypomethylated in the adult testis.* Br J Cancer, 2014. **110**(3): p. 668-78.
361. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function.* Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
362. Allis, C.D., et al., *New nomenclature for chromatin-modifying enzymes.* Cell, 2007. **131**(4): p. 633-6.
363. Joshi, A.A. and K. Struhl, *Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation.* Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 971-8.
364. Zhang, L., et al., *Expression of histone H3 lysine 4 methylation and its demethylases in the developing mouse testis.* Cell Tissue Res, 2014. **358**(3): p. 875-83.
365. Zhuang, T., et al., *CHD5 is required for spermiogenesis and chromatin condensation.* Mech Dev, 2014. **131**: p. 35-46.
366. Sheng, K., et al., *The role of histone ubiquitination during spermatogenesis.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 870695.
367. Nishio, H., et al., *Distinctive changes in histone H3K4 modification mediated via Kdm5a expression in spermatogonial stem cells of cryptorchid testes.* J Urol, 2014. **191**(5 Suppl): p. 1564-72.
368. Cassault-Meyer, E., et al., *An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality.* Environ Toxicol Pharmacol, 2014. **38**(1): p. 131-40.
369. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.* Cell, 2009. **136**(4): p. 642-55.
370. Mette, M.F., et al., *Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA.* EMBO J, 2000. **19**(19): p. 5194-201.
371. Wassenegger, M., et al., *RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants.* Cell, 1994. **76**(3): p. 567-76.
372. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
373. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.* Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
374. Eulalio, A., et al., *Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing.* Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2558-70.
375. Jeanteur, P., *[miRNAs and cancer].* Bull Cancer, 2010. **97**(11): p. 1231-9.
376. Kiriakidou, M., et al., *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation.* Cell, 2007. **129**(6): p. 1141-51.
377. Kinch, L.N. and N.V. Grishin, *The human Ago2 MC region does not contain an eIF4E-like mRNA cap binding motif.* Biol Direct, 2009. **4**: p. 2.

378. Choe, J., et al., *microRNA/Argonaute 2 regulates nonsense-mediated messenger RNA decay.* EMBO Rep, 2010. **11**(5): p. 380-6.
379. Jackson, R.J., C.U. Hellen, and T.V. Pestova, *The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(2): p. 113-27.
380. Djuranovic, S., A. Nahvi, and R. Green, *miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay.* Science, 2012. **336**(6078): p. 237-40.
381. Wakiyama, M., et al., *Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system.* Genes Dev, 2007. **21**(15): p. 1857-62.
382. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation.* Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 913-63.
383. Wang, B., et al., *Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro.* Mol Cell, 2006. **22**(4): p. 553-60.
384. Mathonnet, G., et al., *MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F.* Science, 2007. **317**(5845): p. 1764-7.
385. Maroney, P.A., et al., *Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells.* Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1102-7.
386. Petersen, C.P., et al., *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells.* Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 533-42.
387. Nottrott, S., M.J. Simard, and J.D. Richter, *Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes.* Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1108-14.
388. Zeng, Y., E.J. Wagner, and B.R. Cullen, *Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells.* Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1327-33.
389. Parker, R. and H. Song, *The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover.* Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(2): p. 121-7.
390. Hendrickson, D.G., et al., *Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA.* PLoS Biol, 2009. **7**(11): p. e1000238.
391. Doench, J.G. and P.A. Sharp, *Specificity of microRNA target selection in translational repression.* Genes Dev, 2004. **18**(5): p. 504-11.
392. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels.* Nature, 2010. **466**(7308): p. 835-40.
393. Bashkirov, V.I., et al., *A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates.* J Cell Biol, 1997. **136**(4): p. 761-73.
394. Eystathioy, T., et al., *A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(4): p. 1338-51.
395. Ingelfinger, D., et al., *The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci.* RNA, 2002. **8**(12): p. 1489-501.
396. Kulkarni, M., S. Ozgur, and G. Stoecklin, *On track with P-bodies.* Biochem Soc Trans, 2010. **38**(Pt 1): p. 242-51.
397. Pillai, R.S., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells.* Science, 2005. **309**(5740): p. 1573-6.
398. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation.* Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
399. Vasudevan, S. and J.A. Steitz, *AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2.* Cell, 2007. **128**(6): p. 1105-18.
400. Makeyev, E.V., et al., *The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing.* Mol Cell, 2007. **27**(3): p. 435-48.
401. Naguibneva, I., et al., *The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(3): p. 278-84.

402. Visvanathan, J., et al., *The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development.* Genes Dev, 2007. **21**(7): p. 744-9.
403. Li, X., et al., *A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development.* Cell, 2009. **137**(2): p. 273-82.
404. Stark, A., et al., *Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution.* Cell, 2005. **123**(6): p. 1133-46.
405. Rosa, A. and A.H. Brivanlou, *A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation.* EMBO J, 2011. **30**(2): p. 237-48.
406. Buchold, G.M., et al., *Analysis of microRNA expression in the prepubertal testis.* PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15317.
407. Hayashi, K., et al., *MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis.* PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1738.
408. Marcon, E., et al., *miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus.* Chromosome Res, 2008. **16**(2): p. 243-60.
409. Kotaja, N., *MicroRNAs and spermatogenesis.* Fertil Steril, 2014. **101**(6): p. 1552-62.
410. Song, R., et al., *Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation.* Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 488-93.
411. Papaioannou, M.D. and S. Nef, *microRNAs in the testis: building up male fertility.* J Androl, 2010. **31**(1): p. 26-33.
412. McIver, S.C., et al., *miRNA and mammalian male germ cells.* Hum Reprod Update, 2012. **18**(1): p. 44-59.
413. Yan, N., et al., *A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues.* Reproduction, 2007. **134**(1): p. 73-9.
414. Meikar, O., M. Da Ros, and N. Kotaja, *Epigenetic regulation of male germ cell differentiation.* Subcell Biochem, 2013. **61**: p. 119-38.
415. Saitou, M., S.C. Barton, and M.A. Surani, *A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice.* Nature, 2002. **418**(6895): p. 293-300.
416. West, J.A., et al., *A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy.* Nature, 2009. **460**(7257): p. 909-13.
417. Loughlin, F.E., et al., *Structural basis of pre-let-7 miRNA recognition by the zinc knuckles of pluripotency factor Lin28.* Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(1): p. 84-9.
418. Heo, I., et al., *Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA.* Mol Cell, 2008. **32**(2): p. 276-84.
419. Zhong, X., et al., *Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells.* J Biol Chem, 2010. **285**(53): p. 41961-71.
420. Giraldez, A.J., et al., *Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs.* Science, 2006. **312**(5770): p. 75-9.
421. Niu, Z., et al., *MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(31): p. 12740-5.
422. He, Z., et al., *MiRNA-20 and mirna-106a regulate spermatogonial stem cell renewal at the post-transcriptional level via targeting STAT3 and Ccnd1.* Stem Cells, 2013. **31**(10): p. 2205-17.
423. Tong, M.H., et al., *Expression of Mirlet7 family microRNAs in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice.* Biol Reprod, 2011. **85**(1): p. 189-97.
424. Huszar, J.M. and C.J. Payne, *MicroRNA 146 (Mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice.* Biol Reprod, 2013. **88**(1): p. 15.
425. Tong, M.H., et al., *Two miRNA clusters, Mir-17-92 (Mirc1) and Mir-106b-25 (Mirc3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice.* Biol Reprod, 2012. **86**(3): p. 72.

426. Smorag, L., et al., *MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203 and -34b-5p mediated spermatogenesis regulation.* Biol Cell, 2012. **104**(11): p. 677-92.
427. Yu, J.Y., et al., *Dicer-1-dependent Dacapo suppression acts downstream of Insulin receptor in regulating cell division of Drosophila germline stem cells.* Development, 2009. **136**(9): p. 1497-507.
428. Bouhallier, F., et al., *Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis.* RNA, 2010. **16**(4): p. 720-31.
429. Bao, J., et al., *MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway.* J Biol Chem, 2012. **287**(26): p. 21686-98.
430. Kondratiev, T.V. and T. Tveita, *Effects of sympathetic stimulation during cooling on hypothermic as well as posthypothermic hemodynamic function.* Can J Physiol Pharmacol, 2006. **84**(10): p. 985-91.
431. Yu, Z., T. Raabe, and N.B. Hecht, *MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage.* Biol Reprod, 2005. **73**(3): p. 427-33.
432. Liu, W.M., et al., *Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(2): p. 490-4.
433. Wainwright, E.N., et al., *SOX9 regulates microRNA miR-202-5p/3p expression during mouse testis differentiation.* Biol Reprod, 2013. **89**(2): p. 34.
434. Panneerdoss, S., et al., *Androgen-responsive microRNAs in mouse Sertoli cells.* PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41146.
435. Nicholls, P.K., et al., *Hormonal regulation of sertoli cell micro-RNAs at spermiation.* Endocrinology, 2011. **152**(4): p. 1670-83.
436. Liu, H., et al., *Basic fibroblast growth factor promotes stem Leydig cell development and inhibits LH-stimulated androgen production by regulating microRNA expression.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **144 Pt B**: p. 483-91.
437. Rakoczy, J., et al., *MicroRNAs-140-5p/140-3p modulate Leydig cell numbers in the developing mouse testis.* Biol Reprod, 2013. **88**(6): p. 143.
438. Hu, Z., et al., *MicroRNAs 125a and 455 repress lipoprotein-supported steroidogenesis by targeting scavenger receptor class B type I in steroidogenic cells.* Mol Cell Biol, 2012. **32**(24): p. 5035-45.
439. Hu, Z., et al., *Hormonal regulation of microRNA expression in steroid producing cells of the ovary, testis and adrenal gland.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78040.
440. Lian, J., et al., *Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia.* Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 13.
441. Wang, C., et al., *Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility.* Clin Chem, 2011. **57**(12): p. 1722-31.
442. Comazzetto, S., et al., *Oligoasthenoteratozoospermia and infertility in mice deficient for miR-34b/c and miR-449 loci.* PLoS Genet, 2014. **10**(10): p. e1004597.
443. Zimmermann, C., et al., *Germ cell-specific targeting of DICER or DGCR8 reveals a novel role for endo-siRNAs in the progression of mammalian spermatogenesis and male fertility.* PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107023.
444. Brown, R.P., et al., *A critical review of the scientific literature on potential endocrine-mediated effects in fish and wildlife.* Ecotoxicol Environ Saf, 2001. **49**(1): p. 17-25.
445. Nohynek, G.J., et al., *Endocrine disruption: fact or urban legend?* Toxicol Lett, 2013. **223**(3): p. 295-305.
446. WHO/IPCS, *International Program on Chemical Safety. Global Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. Available at: http://www.who.int.ipcs/.* 2002.
447. E.U., *European Union. Endocrine Disruptor Site. 4. December, 2012. Available at: http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/reports_conclusions_en.htm.* 2012.

448. (EFSA), E.F.S.A., *Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment*

EFSA J. , 2013. **11**(3): p. 3132.

449. EPA, *US Environmental Protection Agency. 13 September, 2012. Endocrine Disruptors Research. Available at: http://www.epa.gov/endocrine/.* 2012.
450. Ting, Y.F. and S.M. Praveena, *Sources, mechanisms, and fate of steroid estrogens in wastewater treatment plants: a mini review.* Environ Monit Assess, 2017. **189**(4): p. 178.
451. Lorand, T., E. Vigh, and J. Garai, *Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens.* Curr Med Chem, 2010. **17**(30): p. 3542-74.
452. Moreira, A.C., et al., *Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **143**: p. 61-71.
453. Bayen, S., et al., *Pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in water, sediments and mollusks in mangrove ecosystems from Singapore.* Mar Pollut Bull, 2016. **109**(2): p. 716-22.
454. Oates David Klein Glenn Longley Pamela Hamlett, R.P., *Pharmaceutical And Endocrine Disruptor Compounds in Surface and Wastewater in San Marcos, TX.* Water Environ Res, 2017.
455. Moutsatsou, P., *The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding.* Hormones (Athens), 2007. **6**(3): p. 173-93.
456. Adams, N.R., *Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens.* Aust Vet J, 1990. **67**(6): p. 197-201.
457. Hilakivi-Clarke, L., et al., *Maternal exposure to genistein during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in female rat offspring.* Oncol Rep, 1999. **6**(5): p. 1089-95.
458. Kuiper, G.G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta.* Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4252-63.
459. Rodriguez-Carrasco, Y., et al., *Exposure estimates to Fusarium mycotoxins through cereals intake.* Chemosphere, 2013. **93**(10): p. 2297-303.
460. Massart, F. and G. Saggese, *Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development.* Int J Androl, 2010. **33**(2): p. 369-76.
461. Minervini, F., et al., *Effects of in vitro exposure to natural levels of zearalenone and its derivatives on chromatin structure stability in equine spermatozoa.* Theriogenology, 2010. **73**(3): p. 392-403.
462. Benzoni, E., et al., *Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality.* Reprod Toxicol, 2008. **25**(4): p. 461-7.
463. Tsakmakidis, I.A., et al., *Evaluation of zearalenone and alpha-zearalenol toxicity on boar sperm DNA integrity.* J Appl Toxicol, 2008. **28**(5): p. 681-8.
464. Tsakmakidis, I.A., et al., *Study on the in vitro effect of zearalenone and alpha-zearalenol on boar sperm-zona pellucida interaction by hemizona assay application.* J Appl Toxicol, 2007. **27**(5): p. 498-505.
465. Koraichi, F., et al., *Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver.* Toxicol Lett, 2012. **211**(3): p. 246-56.
466. Koraichi, F., et al., *Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of ABC transporter expression in testis.* Toxicology, 2013. **310**: p. 29-38.
467. Filipiak, E., et al., *Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis.* Folia Histochem Cytobiol, 2009. **47**(5): p. S113-20.

468. Kim, I.H., et al., *Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats.* Toxicol Lett, 2003. **138**(3): p. 185-92.
469. Yang, J.Y., et al., *Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice.* Reprod Toxicol, 2007. **24**(3-4): p. 381-7.
470. Jee, Y., et al., *Involvement of the Fas and Fas ligand in testicular germ cell apoptosis by zearalenone in rat.* J Vet Sci, 2010. **11**(2): p. 115-9.
471. Dieckmann, W.J., et al., *Does the administration of diethylstilbestrol during pregnancy have therapeutic value? 1953.* Am J Obstet Gynecol, 1999. **181**(6): p. 1572-3.
472. Newbold, R.R., E. Padilla-Banks, and W.N. Jefferson, *Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations.* Endocrinology, 2006. **147**(6 Suppl): p. S11-7.
473. Klip, H., et al., *Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study.* Lancet, 2002. **359**(9312): p. 1102-7.
474. Pons, J.C., et al., *Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero.* Prenat Diagn, 2005. **25**(5): p. 418-9.
475. Palmer, J.R., et al., *Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero.* Epidemiology, 2005. **16**(4): p. 583-6.
476. Palmer, J.R., et al., *Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study.* Environ Health, 2009. **8**: p. 37.
477. Newbold, R.R., *Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol.* Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **199**(2): p. 142-50.
478. Cederroth, C.R., et al., *Estrogen receptor alpha is a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism.* Endocrinology, 2007. **148**(11): p. 5507-19.
479. Goyal, H.O., et al., *Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood.* Biol Reprod, 2003. **68**(6): p. 2081-91.
480. Mathews, E., et al., *Mal-development of the penis and loss of fertility in male rats treated neonatally with female contraceptive 17alpha-ethinyl estradiol: a dose-response study and a comparative study with a known estrogenic teratogen diethylstilbestrol.* Toxicol Sci, 2009. **112**(2): p. 331-43.
481. Reyhanian Caspillo, N., et al., *Short-term treatment of adult male zebrafish (Danio Rerio) with 17alpha-ethinyl estradiol affects the transcription of genes involved in development and male sex differentiation.* Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2014. **164**: p. 35-42.
482. Roggio, M.A., et al., *Effects of the synthetic estrogen 17alpha-ethinylestradiol on aromatase expression, reproductive behavior and sperm quality in the fish Jenynsia multidentata.* Bull Environ Contam Toxicol, 2014. **92**(5): p. 579-84.
483. Mandrup, K.R., et al., *Effects of perinatal ethinyl estradiol exposure in male and female Wistar rats.* Reprod Toxicol, 2013. **42**: p. 180-91.
484. Fenichel, P., N. Chevalier, and F. Brucker-Davis, *Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor.* Ann Endocrinol (Paris), 2013. **74**(3): p. 211-20.
485. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement.* Endocr Rev, 2009. **30**(4): p. 293-342.
486. Salian, S., T. Doshi, and G. Vanage, *Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis.* Toxicology, 2009. **265**(1-2): p. 56-67.
487. Nagao, T., et al., *Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate.* Reprod Toxicol, 1999. **13**(4): p. 303-11.
488. Kato, H., et al., *Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats.* Reprod Toxicol, 2006. **22**(1): p. 20-9.
489. Nellemann, C., et al., *The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo.* Toxicol Sci, 2003. **71**(2): p. 251-62.
490. Wolf, C.J., et al., *Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin.* Toxicol Sci, 2000. **55**(1): p. 152-61.

491. Cowin, P.A., et al., *Vinclozolin exposure in utero induces postpubertal prostatitis and reduces sperm production via a reversible hormone-regulated mechanism.* Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 783-92.
492. Eustache, F., et al., *Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility.* Environ Health Perspect, 2009. **117**(8): p. 1272-9.
493. Wan, H.T., et al., *Targeting testis-specific proteins to inhibit spermatogenesis: lesson from endocrine disrupting chemicals.* Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(7): p. 839-55.
494. Wang, H., et al., *Maternal lead exposure during lactation persistently impairs testicular development and steroidogenesis in male offspring.* J Appl Toxicol, 2013. **33**(12): p. 1384-94.
495. Hannas, B.R., et al., *Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate.* Toxicol Sci, 2011. **123**(1): p. 206-16.
496. Akingbemi, B.T., et al., *Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells.* Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 592-603.
497. Xi, W., et al., *Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice.* Environ Sci Pollut Res Int, 2011. **19**(7): p. 2515-27.
498. Ji, Y.L., et al., *Effects of maternal cadmium exposure during late pregnant period on testicular steroidogenesis in male offspring.* Toxicol Lett, 2011. **205**(1): p. 69-78.
499. Huet, M.P., Y. M.; Clavier, J., *Imposex in Nucella lapillus: a ten year survey in NW Brittany.* MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES, 2004. **270**: p. 153-161.
500. Gooding, M.P. and G.A. LeBlanc, *Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail Ilyanassa obsoleta.* Gen Comp Endocrinol, 2001. **122**(2): p. 172-80.
501. Cheek, A.O., et al., *Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin.* Environ Health Perspect, 1999. **107**(4): p. 273-8.
502. Swedenborg, E., et al., *Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders.* J Mol Endocrinol, 2009. **43**(1): p. 1-10.
503. Safe, S. and V. Krishnan, *Chlorinated hydrocarbons: estrogens and antiestrogens.* Toxicol Lett, 1995. **82-83**: p. 731-6.
504. Salian, S., T. Doshi, and G. Vanage, *Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A.* Life Sci, 2009. **85**(1-2): p. 11-8.
505. Stouder, C. and A. Paoloni-Giacobino, *Specific transgenerational imprinting effects of the endocrine disruptor methoxychlor on male gametes.* Reproduction, 2011. **141**(2): p. 207-16.
506. Guerrero-Bosagna, C., et al., *Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome.* PLoS One, 2010. **5**(9).
507. Doyle, T.J., et al., *Transgenerational effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testicular germ cell associations and spermatogonial stem cells in mice.* Biol Reprod, 2013. **88**(5): p. 112.
508. Guerrero-Bosagna, C. and M.K. Skinner, *Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of male infertility.* Curr Opin Genet Dev, 2014. **26C**: p. 79-88.
509. Li, S., et al., *Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus.* Cancer Res, 1997. **57**(19): p. 4356-9.
510. Shutoh, Y., et al., *Low dose effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on gene transcription and DNA methylation in the hypothalamus of young male rats: implication of hormesis-like effects.* J Toxicol Sci, 2009. **34**(5): p. 469-82.
511. Doshi, T., et al., *Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A.* Toxicology, 2011. **289**(2-3): p. 74-82.

512. Park, C.J., et al., *Butyl paraben-induced changes in DNA methylation in rat epididymal spermatozoa.* Andrologia, 2012. **44 Suppl 1**: p. 187-93.
513. Doherty, L.F., et al., *In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer.* Horm Cancer, 2010. **1**(3): p. 146-55.
514. Siddeek, B., et al., *Developmental epigenetic programming of adult germ cell death disease: Polycomb protein EZH2-miR-101 pathway.* Epigenomics, 2016. **8**(11): p. 1459-1479.
515. Avissar-Whiting, M., et al., *Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells.* Reprod Toxicol, 2010. **29**(4): p. 401-6.
516. Hyunseok, C.S., J.K.; Hye-Won, P.; Moon-Ju, O.; So, Y.Y.; Seung, Y.L.; Chansoo, P.; JaeRyul, Han.: Jung-Hwa, Oh.; Seung, Y.H.; Seok-Joo, Yoon., *A relationship between miRNA and gene expression in the mouse Sertoli cell line after exposure to bisphenol A.* BioChip Journal, 2010. **4**(1): p. 75-81.
517. Teng, Y., et al., *Endocrine disruptors fludioxonil and fenhexamid stimulate miR-21 expression in breast cancer cells.* Toxicol Sci, 2013. **131**(1): p. 71-83.
518. Shi, Z., et al., *Perfluorododecanoic acid-induced steroidogenic inhibition is associated with steroidogenic acute regulatory protein and reactive oxygen species in cAMP-stimulated Leydig cells.* Toxicol Sci, 2010. **114**(2): p. 285-94.
519. Wan, H.T., et al., *Testicular signaling is the potential target of perfluorooctanesulfonate-mediated subfertility in male mice.* Biol Reprod, 2011. **84**(5): p. 1016-23.
520. Doumouchtsis, K.K., et al., *The effect of lead intoxication on endocrine functions.* J Endocrinol Invest, 2009. **32**(2): p. 175-83.
521. Wagner, M.S., S.M. Wajner, and A.L. Maia, *Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis?* Microsc Res Tech, 2009. **72**(11): p. 796-808.
522. Meeker, J.D. and K.K. Ferguson, *Relationship between urinary phthalate and bisphenol A concentrations and serum thyroid measures in U.S. adults and adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008.* Environ Health Perspect, 2011. **119**(10): p. 1396-402.
523. Croutch, C.R., et al., *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD) alter body weight by decreasing insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling.* Toxicol Sci, 2005. **85**(1): p. 560-71.
524. Meeker, J.D., L. Godfrey-Bailey, and R. Hauser, *Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic.* J Androl, 2007. **28**(3): p. 397-406.
525. Rey, R.A., et al., *Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis.* Microsc Res Tech, 2009. **72**(11): p. 787-95.
526. Carreau, S. and R.A. Hess, *Oestrogens and spermatogenesis.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1546): p. 1517-35.
527. O'Donnell, L., et al., *Estrogen and spermatogenesis.* Endocr Rev, 2001. **22**(3): p. 289-318.
528. Mocarelli, P., et al., *Perinatal exposure to low doses of dioxin can permanently impair human semen quality.* Environ Health Perspect, 2011. **119**(5): p. 713-8.
529. Meeker, J.D., A.M. Calafat, and R. Hauser, *Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic.* Environ Sci Technol, 2010. **44**(4): p. 1458-63.
530. Barker, D.J., *Fetal origins of coronary heart disease.* BMJ, 1995. **311**(6998): p. 171-4.
531. Barker, D.J., *The origins of the developmental origins theory.* J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 412-7.
532. Power, C., D. Kuh, and S. Morton, *From developmental origins of adult disease to life course research on adult disease and aging: insights from birth cohort studies.* Annu Rev Public Health, 2013. **34**: p. 7-28.
533. Heijmans, B.T., et al., *The epigenome: archive of the prenatal environment.* Epigenetics, 2009. **4**(8): p. 526-31.

534. Junien, C., A. Gabory, and L. Attig, *[Sexual dimorphism in the XXI(st) century].* Med Sci (Paris), 2012. **28**(2): p. 185-92.
535. Lehraiki, A., et al., *Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism.* Toxicol Sci, 2009. **111**(2): p. 372-82.
536. Geoffroy-Siraudin, C., et al., *Ex-vivo assessment of chronic toxicity of low levels of cadmium on testicular meiotic cells.* Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **262**(3): p. 238-46.
537. Toyama, Y., et al., *Neonatally administered diethylstilbestrol retards the development of the blood-testis barrier in the rat.* J Androl, 2001. **22**(3): p. 413-23.
538. Cheng, C.Y. and D.D. Mruk, *The blood-testis barrier and its implications for male contraception.* Pharmacol Rev, 2012. **64**(1): p. 16-64.
539. Setchell, B.P. and G.M. Waites, *Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the 'blood-testis barrier' after injection of cadmium chloride in the rat.* J Endocrinol, 1970. **47**(1): p. 81-6.
540. Goldspiel, B.R. and D.R. Kohler, *Flutamide: an antiandrogen for advanced prostate cancer.* DICP, 1990. **24**(6): p. 616-23.
541. Balk, S.P., *Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer.* Urology, 2002. **60**(3 Suppl 1): p. 132-8; discussion 138-9.
542. Daniels, G., et al., *Androgen receptor coactivators that inhibit prostate cancer growth.* Am J Clin Exp Urol, 2014. **2**(1): p. 62-70.
543. Generali, J.A. and D.J. Cada, *Flutamide: hirsutism in women.* Hosp Pharm, 2014. **49**(6): p. 517-20.
544. Ibanez, L., et al., *Hyperinsulinaemic androgen excess in adolescent girls.* Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(8): p. 499-508.
545. Andrews, P., et al., *Feasibility and potential gains of enhancing the subacute rat study protocol (OECD test guideline no. 407) by additional parameters selected to determine endocrine modulation. A pre-validation study to determine endocrine-mediated effects of the antiandrogenic drug flutamide.* Arch Toxicol, 2001. **75**(2): p. 65-73.
546. Kunimatsu, T., et al., *Evaluation for reliability and feasibility of the draft protocol for the enhanced rat 28-day subacute study (OECD Guideline 407) using androgen antagonist flutamide.* Toxicology, 2004. **200**(1): p. 77-89.
547. Moon, H.J., et al., *OECD validation of phase 3 Hershberger assay in Korea using surgically castrated male rats with coded chemicals.* J Appl Toxicol, 2009. **29**(4): p. 350-5.
548. Shin, J.H., et al., *Effects of flutamide on puberty in male rats: an evaluation of the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function.* J Toxicol Environ Health A, 2002. **65**(5-6): p. 433-45.
549. Kang, I.H., et al., *Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p, p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay.* Toxicology, 2004. **199**(2-3): p. 145-59.
550. Urbatzka, R., et al., *Androgenic and antiandrogenic activities in water and sediment samples from the river Lambro, Italy, detected by yeast androgen screen and chemical analyses.* Chemosphere, 2007. **67**(6): p. 1080-7.
551. Ma, D., L. Chen, and R. Lui, *Decrease of antiandrogenic activity in gray water and domestic wastewater treated by the MBR process.* Environ Sci Process Impacts, 2013. **15**(3): p. 668-76.
552. Shi, W., et al., *Endocrine-disrupting equivalents in industrial effluents discharged into Yangtze River.* Ecotoxicology, 2009. **18**(6): p. 685-92.
553. Zhao, J.L., et al., *Screening of multiple hormonal activities in surface water and sediment from the Pearl River system, South China, using effect-directed in vitro bioassays.* Environ Toxicol Chem, 2011. **30**(10): p. 2208-15.
554. Peets, E.A., M.F. Henson, and R. Neri, *On the mechanism of the anti-androgenic action of flutamide (alpha-alpha-alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide) in the rat.* Endocrinology, 1974. **94**(2): p. 532-40.

555. Katchen, B. and S. Buxbaum, *Disposition of a new, nonsteroid, antiandrogen, alpha,alpha,alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide (Flutamide), in men following a single oral 200 mg dose.* J Clin Endocrinol Metab, 1975. **41**(2): p. 373-9.
556. Simard, J., et al., *Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues.* Mol Cell Endocrinol, 1986. **44**(3): p. 261-70.
557. Neri, R., *Pharmacology and pharmacokinetics of flutamide.* Urology, 1989. **34**(4 Suppl): p. 19-21; discussion 46-56.
558. Kemppainen, J.A., et al., *Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones.* J Biol Chem, 1992. **267**(2): p. 968-74.
559. Viguier-Martinez, M.C., et al., *Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidences on fertility.* Acta Endocrinol (Copenh), 1983. **104**(2): p. 246-52.
560. Sinclair, A.W., et al., *Flutamide-induced hypospadias in rats: A critical assessment.* Differentiation, 2017. **94**: p. 37-57.
561. van der Schoot, P., *Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide.* J Reprod Fertil, 1992. **96**(2): p. 483-96.
562. McIntyre, B.S., N.J. Barlow, and P.M. Foster, *Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues.* Toxicol Sci, 2001. **62**(2): p. 236-49.
563. Imperato-McGinley, J., et al., *Comparison of the effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies.* Endocrinology, 1992. **131**(3): p. 1149-56.
564. Husmann, D.A. and M.J. McPhaul, *Time-specific androgen blockade with flutamide inhibits testicular descent in the rat.* Endocrinology, 1991. **129**(3): p. 1409-16.
565. Miyata, K., et al., *Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormones and androgen-dependent organs in F1 male rats.* J Toxicol Sci, 2002. **27**(1): p. 19-33.
566. Miyata, K., et al., *Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormone responsiveness in F1 male rats.* J Toxicol Sci, 2003. **28**(3): p. 149-63.
567. Lee, K.H., *Modification of Gene Expression of Connexins in the Rat Corpus Epididymis by Estradiol Benzoate or Flutamide Exposure at the Early Neonatal Age.* Dev Reprod, 2015. **19**(2): p. 69-77.
568. Lee, K.H., *Changes in Expression of Connexin Isoforms in the Caudal Epididymis of Adult Sprague-Dawley Rats exposed to Estradiol Benzoate or Flutamide at the Neonatal Age.* Dev Reprod, 2016. **20**(3): p. 237-245.
569. Omezzine, A., et al., *Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide.* Endocrinology, 2003. **144**(2): p. 648-61.
570. Bozec, A., et al., *The mitochondrial-dependent pathway is chronically affected in testicular germ cell death in adult rats exposed in utero to anti-androgens.* J Endocrinol, 2004. **183**(1): p. 79-90.
571. Florin, A., et al., *Androgens and postmeiotic germ cells regulate claudin-11 expression in rat Sertoli cells.* Endocrinology, 2005. **146**(3): p. 1532-40.
572. Maire, M., et al., *Alteration of transforming growth factor-beta signaling system expression in adult rat germ cells with a chronic apoptotic cell death process after fetal androgen disruption.* Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5135-43.
573. Benbrahim-Tallaa, L., et al., *Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption.* J Endocrinol, 2008. **196**(1): p. 21-31.
574. Anahara, R., Y. Toyama, and C. Mori, *Flutamide induces ultrastructural changes in spermatids and the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in mouse testes.* Reprod Toxicol, 2004. **18**(4): p. 589-96.

575. Anahara, R., Y. Toyama, and C. Mori, *Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis.* Reprod Toxicol, 2008. **25**(2): p. 139-43.
576. Chandolia, R.K., et al., *Comparative effects of chronic administration of the non-steroidal antiandrogens flutamide and Casodex on the reproductive system of the adult male rat.* Acta Endocrinol (Copenh), 1991. **125**(5): p. 547-55.
577. Toyoda, K., et al., *Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals.* Arch Toxicol, 2000. **74**(3): p. 127-32.
578. Marchetti, B. and F. Labrie, *Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in the rat.* J Steroid Biochem, 1988. **29**(6): p. 691-8.
579. Okahara, A., et al., *Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 5). Effects of repeated doses of flutamide for 2 and 4 weeks.* J Toxicol Sci, 2000. **25 Spec No**: p. 63-70.
580. Kassim, N.M., et al., *The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat.* J Anat, 1997. **190 (Pt 4)**: p. 577-88.
581. Mikkila, T.F., J. Toppari, and J. Paranko, *Effects of neonatal exposure to 4-tert-octylphenol, diethylstilbestrol, and flutamide on steroidogenesis in infantile rat testis.* Toxicol Sci, 2006. **91**(2): p. 456-66.
582. Mitchell, R.T., et al., *Anogenital distance (AGD) plasticity in adulthood: Implications for its use as a biomarker of fetal androgen action.* Endocrinology, 2014: p. en20141534.
583. Yin, P., et al., *Diethylstilbestrol, flutamide and their combination impaired the spermatogenesis of male adult zebrafish through disrupting HPG axis, meiosis and apoptosis.* Aquat Toxicol, 2017. **185**: p. 129-137.
584. Chojnacka, K., et al., *Flutamide induces alterations in the cell-cell junction ultrastructure and reduces the expression of Cx43 at the blood-testis barrier with no disturbance in the rat seminiferous tubule morphology.* Reprod Biol Endocrinol, 2016. **14**: p. 14.
585. Ohsako, S., et al., *Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide.* J Reprod Dev, 2003. **49**(4): p. 275-90.
586. Rouquie, D., et al., *Standard and molecular NOAELs for rat testicular toxicity induced by flutamide.* Toxicol Sci, 2009. **109**(1): p. 59-65.
587. Zarzycka, M., et al., *Flutamide alters the distribution of c-Src and affects the N-cadherin-beta-catenin complex in the seminiferous epithelium of adult rat.* Andrology, 2015. **3**(3): p. 569-81.
588. Chateauraynaud, F.D., J.; Fintz, M. , *La dose fait-elle toujours le poison? Une analyse sociologique des mondes de la recherche et de l'expertise à l'épreuve*

des faibles doses. 2001.
589. Vandenberg, L.N., et al., *Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses.* Endocr Rev, 2012. **33**(3): p. 378-455.
590. Emond, C.a.K., P. , *La problématique des faibles doses en évaluation des risques sanitaires.* Anses • Bulletin de veille scientifique, 2012. **18**(Santé / Environnement / Travail): p. 49-52.
591. Melnick, R., et al., *Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review.* Environ Health Perspect, 2002. **110**(4): p. 427-31.
592. Vandenberg, L.N., et al., *Human exposure to bisphenol A (BPA).* Reprod Toxicol, 2007. **24**(2): p. 139-77.
593. Brucker-Davis, F., K. Thayer, and T. Colborn, *Significant effects of mild endogenous hormonal changes in humans: considerations for low-dose testing.* Environ Health Perspect, 2001. **109 Suppl 1**: p. 21-6.
594. Vandenberg, L.N., *Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors.* Vitam Horm, 2014. **94**: p. 129-65.
595. EFSA. 2016; Available from: http://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/bisphenol.

596. Cunningham, M.L., et al., *Workshop overview: use of genomic data in risk assessment.* Toxicol Sci, 2003. **73**(2): p. 209-15.
597. Freeman, K., *Toxicogenomics data: the road to acceptance.* Environ Health Perspect, 2004. **112**(12): p. A678-85.
598. Ludwig, S., et al., *A molecular and phenotypic integrative approach to identify a no-effect dose level for antiandrogen-induced testicular toxicity.* Toxicol Sci, 2011. **122**(1): p. 52-63.
599. Angle, B.M., et al., *Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation.* Reprod Toxicol, 2013. **42**: p. 256-68.
600. Vinas, R. and C.S. Watson, *Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions.* Environ Health Perspect, 2013. **121**(3): p. 352-8.
601. Vandenberg, L.N., *Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study.* Dose Response, 2014. **12**(2): p. 259-76.
602. Rhomberg, L.R. and J.E. Goodman, *Low-dose effects and nonmonotonic dose-responses of endocrine disrupting chemicals: has the case been made?* Regul Toxicol Pharmacol, 2012. **64**(1): p. 130-3.
603. Hass, U.C., S. Axelstad, M. Dreisig Sørensen, K. Boberg, J., *Input for the REACH-review in 2013 on endocrine disrupters (tærskelværdi-projekt, j.nr. MST-621-00050)* 2013, DANISH CENTRE ON ENDOCRINE DISRUPTERS. p. 48.
604. Myers, J.P., R.T. Zoeller, and F.S. vom Saal, *A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health.* Environ Health Perspect, 2009. **117**(11): p. 1652-5.
605. Vandenberg, L.N., et al., *Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology.* Reprod Toxicol, 2013. **38**: p. 1-15.
606. Patisaul, H.B., et al., *Accumulation and endocrine disrupting effects of the flame retardant mixture Firemaster(R) 550 in rats: an exploratory assessment.* J Biochem Mol Toxicol, 2013. **27**(2): p. 124-36.
607. Xu, Z., et al., *Nonmonotonic responses to low doses of xenoestrogens: A review.* Environ Res, 2017. **155**: p. 199-207.
608. Woodruff, T.J., A.R. Zota, and J.M. Schwartz, *Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003-2004.* Environ Health Perspect, 2011. **119**(6): p. 878-85.
609. Arbuckle, T.E., *Maternal-infant biomonitoring of environmental chemicals: the epidemiologic challenges.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010. **88**(10): p. 931-7.
610. Robin, M.A., *Effets des faibles doses de bisphénol A sur la fonction testiculaire et les anomalies génitales chez l'homme : difficulté*

de l'extrapolation des résultats des études animales à l'homme et influence des variations génétiques. Anses • Bulletin de veille scientifique 2013. **n° 21 • Santé / Environnement / Travail**: p. 22-26.
611. Nagel, S.C., et al., *Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol.* Environ Health Perspect, 1997. **105**(1): p. 70-6.
612. Gray, L.E., Jr., et al., *Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat.* Toxicol Ind Health, 1999. **15**(1-2): p. 48-64.
613. Khurana, S., S. Ranmal, and N. Ben-Jonathan, *Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression.* Endocrinology, 2000. **141**(12): p. 4512-7.
614. Chitra, K.C., C. Latchoumycandane, and P.P. Mathur, *Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats.* Toxicology, 2003. **185**(1-2): p. 119-27.
615. Yamasaki, K., et al., *Effects of in utero and lactational exposure to tamoxifen in SD rats.* Toxicol Lett, 2005. **156**(2): p. 289-96.

616. Wadia, P.R., et al., *Perinatal bisphenol A exposure increases estrogen sensitivity of the mammary gland in diverse mouse strains.* Environ Health Perspect, 2007. **115**(4): p. 592-8.
617. D'Cruz, S.C., et al., *Bisphenol A impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis: an in vivo and in silico study.* Food Chem Toxicol, 2012. **50**(3-4): p. 1124-33.
618. N'Tumba-Byn, T., et al., *Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51579.
619. Shenoy, K., *Prenatal exposure to low doses of atrazine affects mating behaviors in male guppies.* Horm Behav, 2014. **66**(2): p. 439-48.
620. Bello, U.M., et al., *The effects on steroidogenesis and histopathology of adult male Japanese quails (Coturnix coturnix japonica) testis following pre-pubertal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP).* Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2014. **166**: p. 24-33.
621. Martinez, C.S., et al., *Chronic exposure to low doses of mercury impairs sperm quality and induces oxidative stress in rats.* J Toxicol Environ Health A, 2014. **77**(1-3): p. 143-54.
622. Martinez, C.S., et al., *60-Day Chronic Exposure to Low Concentrations of HgCl2 Impairs Sperm Quality: Hormonal Imbalance and Oxidative Stress as Potential Routes for Reproductive Dysfunction in Rats.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111202.
623. Hass, U., et al., *Low-dose effect of developmental bisphenol A exposure on sperm count and behaviour in rats.* Andrology, 2016. **4**(4): p. 594-607.
624. Ogo, F.M., et al., *Low doses of bisphenol A can impair postnatal testicular development directly, without affecting hormonal or oxidative stress levels.* Reprod Fertil Dev, 2017.
625. Gao, H.T., et al., *Effects of six priority controlled phthalate esters with long-term low-dose integrated exposure on male reproductive toxicity in rats.* Food Chem Toxicol, 2017. **101**: p. 94-104.
626. Quinnies, K.M., et al., *Direct and transgenerational effects of low doses of perinatal di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on social behaviors in mice.* PLoS One, 2017. **12**(2): p. e0171977.
627. Agency, U.S.E.P., *U. State of the Science Evaluation : Nonmonotonic Dose Responses as They Apply to Estrogen , Androgen , and Thyroid Pathways and EPA Testing and Assessment Procedures.* . 2013.
628. Authority, E.F.S., *Modern methodologies and tools for human hazard assessment of chemicals.* EFSA Journal 2014;12(4):3638, 2014.
629. Reponse, N.R.C.U.C.t.R.E.s.S.o.t.S.P.o.N.D., *Review of the Environmental Protection Agency's State-of-the-science evaluation of nonmonotonic dose-response relationships as they apply to endocrine disruptors / Committee to Review EPA's State of the Science Paper on Nonmonotonic Dose Reponse, Board on Environmental Studies and Toxicology, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies.* 2014.
630. Hoffmann, M., et al., *[Endocrine disruptors : Evidence from epidemiological studies necessitates a critical review of model systems].* Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2017.
631. Dereumeaux, C., et al., *Biomarkers of exposure to environmental contaminants in French pregnant women from the Elfe cohort in 2011.* Environ Int, 2016. **97**: p. 56-67.
632. Dereumeaux, C., et al., *The French human biomonitoring program: First lessons from the perinatal component and future needs.* Int J Hyg Environ Health, 2017. **220**(2 Pt A): p. 64-70.
633. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects*. 2008; Available from: http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9740701e.pdf?expires=1416997619&id=id&accname=guest&checksum=135E54EEA84C3C36CE0416C3F82BBA55.
634. OCDE, *Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours, Éditions OCDE, Paris.* 1998.
635. OCDE, *Essai n° 409: Toxicité orale à doses répétées - non-rongeurs: 90 jours, Éditions OCDE, Paris.* 1998.

636. OECD, *Essai n° 414: Étude de la toxicité pour le développement prénatal, OECD Publishing, Paris.* 2001.
637. OCDE, *Essai n° 415: Étude de toxicité pour la reproduction sur une génération, Éditions OCDE, Paris.* 1983.
638. OCDE, *Essai n° 416: Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations, Éditions OCDE, Paris.* 2001.
639. OCDE, *Essai n° 421: Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement, Éditions OCDE, Paris.* 1995.
640. OCDE, *Essai n° 422: Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement, Éditions OCDE, Paris.* 1996.
641. OECD, *Essai n° 426 : Étude de neurotoxicité pour le développement, Éditions OCDE, Paris*. 2007.
642. OCDE, *Essai n° 451 : Études de cancérogénèse, Éditions OCDE, Paris.* 2009.
643. OCDE, *Test No. 452: Chronic Toxicity Studies, OECD Publishing, Paris.* 2009.
644. Program), N.N.T., *TOXICOLOGY AND CARCINOGENESIS STUDY OF GENISTEIN (CAS NO. 446-72-0) IN SPRAGUE-DAWLEY RATS (FEED STUDY)*, in *NTP TECHNICAL REPORT*. 2008, National Institutes of Health Public Health Service U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES: NTP TR 545 NIH Publication No. 08-4430

p. 1-240.
645. Services, N.N.T.P.U.S.d.o.H.a.H., *Harlan Sprague Dawley.*
646. Services, N.T.P.U.S.d.o.H.a.H., *NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP)*. 2006.
647. Services, N.T.P.U.S.d.o.H.a.H., *NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Fluoxetine*. 2004.
648. Wilson, V.S., et al., *Differential expression of the phthalate syndrome in male Sprague-Dawley and Wistar rats after in utero DEHP exposure.* Toxicol Lett, 2007. **170**(3): p. 177-84.
649. Watts, L.M., et al., *Apoptotic cell death and fertility in three unilateral cryptorchid rat models.* Urol Res, 2000. **28**(5): p. 332-7.
650. Saalu, L.C.T., V. A.; Oyewopo, A. O.; Raji, Y., *Artificial Cryptorchidism and the Moderating Effect of Melatonin (N-acetyl. 5 methoxy tryptamin) in Sprague-Dawley Rats.* Journal of Applied Sciences, 2006.
651. Rebourcet, D., et al., *The effects of an in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on male reproductive function: identification of Ccl5 as a potential marker.* Int J Androl, 2010. **33**(2): p. 413-24.
652. Jones, S., et al., *Disruption of rat testis development following combined in utero exposure to the phytoestrogen genistein and antiandrogenic plasticizer di-(2-ethylhexyl) phthalate.* Biol Reprod, 2014. **91**(3): p. 64.
653. Song, Y., et al., *Transgenerational impaired male fertility with an Igf2 epigenetic defect in the rat are induced by the endocrine disruptor p,p'-DDE.* Hum Reprod, 2014. **29**(11): p. 2512-21.
654. Picut, C.A., et al., *Postnatal Development of the Testis in the Rat: I. Morphologic Study and II. Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters.* Toxicol Pathol, 2014.
655. Barthold, J.S., et al., *Failure of shortening and inversion of the perinatal gubernaculum in the cryptorchid long-evans orl rat.* J Urol, 2006. **176**(4 Pt 1): p. 1612-7.
656. Klonisch, T., P.A. Fowler, and S. Hombach-Klonisch, *Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development.* Dev Biol, 2004. **270**(1): p. 1-18.
657. Waddell, W.J., *History of dose response.* J Toxicol Sci, 2010. **35**(1): p. 1-8.
658. Barouki, R., et al., *Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health.* Environ Health, 2012. **11**: p. 42.
659. Anderson, H.A., et al., *Symptoms and clinical abnormalities following ingestion of polybrominated-biphenyl-contaminated food products.* Ann N Y Acad Sci, 1979. **320**: p. 684-702.

660. Hsu, S.T., et al., *Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup.* Environmental Health Perspectives 1985. **59**: p. 5-10.
661. Pesatori, A.C., et al., *Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident".* Ind Health, 2003. **41**(3): p. 127-38.
662. Li, D., et al., *Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction.* Human Reproduction, 2010. **25**(2): p. 519-27.
663. Queiroz, E.K. and W. Waissmann, *Occupational exposure and effects on the male reproductive system.* Cad Saude Publica, 2006. **22**(3): p. 485-93.
664. Villeneuve, S., et al., *Occupation and occupational exposure to endocrine disrupting chemicals in male breast cancer: a case-control study in Europe.* Occup Environ Med, 2010. **67**(12): p. 837-44.
665. Zoeller, R.T., et al., *Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society.* Endocrinology, 2012. **153**(9): p. 4097-110.
666. Vandenberg, L.N., et al., *Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses.* Endocrine Reviews, 2012. **33**(3): p. 378-455.
667. Benbrahim-Tallaa, L., et al., *Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption.* J Endocrinol, 2008 **196**(1): p. 21-31.
668. Gore, A.C., et al., *EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals.* Endocrine Reviews, 2015: p. er20151010.
669. Siddeek, B., et al., *MicroRNAs as potential biomarkers in diseases and toxicology.* Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2014. **764-765**: p. 46-57.
670. Mori, C., et al., *Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice.* Dev Dyn, 1997. **208**(1): p. 125-36.
671. Macleod, D.J., et al., *Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs.* Int J Androl, 2010. **33**(2): p. 279-87.
672. Foster, P.M. and M.W. Harris, *Changes in androgen-mediated reproductive development in male rat offspring following exposure to a single oral dose of flutamide at different gestational ages.* Toxicological Sciences, 2005. **85**(2): p. 1024-32.
673. Welsh, M., et al., *Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism.* Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(4): p. 1479-90.
674. Kassim, N.M., et al., *The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat.* J Anat, 1997. **190**(Pt 4): p. 577-88.
675. Christiansen, S., et al., *Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats.* International Journal of Andrology, 2012. **35**(3): p. 303-16.
676. Brieno-Enriquez, M.A., et al., *Exposure to endocrine disruptor induces transgenerational epigenetic deregulation of microRNAs in primordial germ cells.* PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0124296.
677. Elzeinova, F., et al., *Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice.* Reprod Toxicol, 2008. **26**(3-4): p. 231-8.
678. Skinner, M.K. and M.D. Anway, *Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on the development of disease and cancer.* Crit Rev Oncog, 2007. **13**(1): p. 75-82.
679. Miyata, K., et al., *Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormones and androgen-dependent organs in F1 male rats.* J Toxicol Sci, 2002. **27**(1): p. 19-33.
680. van der Schoot, P., *Androgens in relation to prenatal development and postnatal inversion of the gubernacula in rats.* J Reprod Fertil, 1992. **95**(1): p. 145-58.
681. Barker, D.J., et al., *Weight in infancy and death from ischaemic heart disease.* Lancet, 1989. **2**(8663): p. 577-80.
682. Wolf, C., Jr., et al., *Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl-*

and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. Toxicol Ind Health, 1999. **15**(1-2): p. 94-118.
683. Pallares, M.E., et al., *Maternal administration of flutamide during late gestation affects the brain and reproductive organs development in the rat male offspring.* Neuroscience, 2014. **278**: p. 122-35.
684. Okur, H., et al., *Effects of prenatal flutamide on testicular development, androgen production and fertility in rats.* Urol Int, 2006. **76**(2): p. 130-3.
685. Gunes, S., M. Al-Sadaan, and A. Agarwal, *Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility.* Reprod Biomed Online, 2015. **31**(3): p. 309-19.
686. Frost, R.J., et al., *MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11847-52.
687. Ghosh, M., et al., *Essential role of the RNA-binding protein HuR in progenitor cell survival in mice.* J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3530-43.
688. Messer, L.C., et al., *Developmental Programming: Priming Disease Susceptibility for Subsequent Generations.* Curr Epidemiol Rep, 2015. **2**(1): p. 37-51.
689. Nelson, K.G., et al., *Exposure to diethylstilbestrol during a critical developmental period of the mouse reproductive tract leads to persistent induction of two estrogen-regulated genes.* Cell Growth Differ, 1994. **5**(6): p. 595-606.
690. McLachlan, J.A., *Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond.* Andrology, 2016. **4**(4): p. 684-94.
691. Bjork, J.K., et al., *miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis.* Development, 2010. **137**(19): p. 3177-84.
692. Guo, X., Y. Wu, and R.S. Hartley, *MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer.* RNA Biol, 2009. **6**(5): p. 575-83.
693. Shi, X.B., et al., *An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(50): p. 19983-8.
694. Hanson, M. and P. Gluckman, *Developmental origins of noncommunicable disease: population and public health implications.* Am J Clin Nutr, 2011. **94**(6 Suppl): p. 1754S-1758S.
695. Walker, C.L. and S.M. Ho, *Developmental reprogramming of cancer susceptibility.* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(7): p. 479-86.
696. Sundrani, D.P., et al., *Sex-specific differences and developmental programming for diseases in later life.* Reprod Fertil Dev, 2017.
697. Aiken, C.E., J.L. Tarry-Adkins, and S.E. Ozanne, *Transgenerational Developmental Programming of Ovarian Reserve.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 16175.
698. Koneva, L.A., et al., *Developmental programming: Interaction between prenatal BPA and postnatal overfeeding on cardiac tissue gene expression in female sheep.* Environ Mol Mutagen, 2017. **58**(1): p. 4-18.
699. Lucas, A., *Programming by early nutrition: an experimental approach.* J Nutr, 1998. **128**(2 Suppl): p. 401S-406S.
700. Sarabay, A., *Evaluation des effets de faibles doses d'un perturbateur endocrinien de référence, le flutamide, sur l'appareil reproducteur mâle du rat adulte*, in *ÉCOLE DOCTORALE : ED425 Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué*. 2015, Paris Sud. p. 340.
701. Lagarde, F., et al., *Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment.* Environ Health, 2015. **14**: p. 13.
702. Calabrese, E.J. and R.B. Blain, *The hormesis database: the occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature.* Regul Toxicol Pharmacol, 2011. **61**(1): p. 73-81.
703. Chevillotte, G.B., A. Varret, C. Ballet, P. Bodin, L. Roudot, A-C. , *Probabilistic assessment method of the non-monotonic dose-responses-Part I: Methodological approach.* http://www.sciencedirect.com/science/journal/02786915, 2017.

704. Hanson, M.A., F.M. Low, and P.D. Gluckman, *Epigenetic epidemiology: the rebirth of soft inheritance.* Ann Nutr Metab, 2011. **58 Suppl 2**: p. 8-15.
705. Heindel, J.J., et al., *Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences.* Endocrinology, 2015. **156**(10): p. 3416-21.
706. Bernal, A.J. and R.L. Jirtle, *Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010. **88**(10): p. 938-44.
707. Marsit, C.J., *Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation.* J Exp Biol, 2015. **218**(Pt 1): p. 71-9.
708. Becher, G., et al., *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization.* 2013. p. 296 pp.
709. Isling, L.K., et al., *Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters.* Reproduction, 2014. **147**(4): p. 465-76.
710. Gore, A.C., et al., *EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals.* Endocrine Reviews, 2015. **36**(6): p. E1-E150.
711. Zoeller, R.T. and L.N. Vandenberg, *Assessing dose-response relationships for endocrine disrupting chemicals (EDCs): a focus on non-monotonicity.* Environ Health, 2015. **14**: p. 42.
712. Juul, A., et al., *Possible fetal determinants of male infertility.* Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(9): p. 553-62.
713. Lindquist, S., *The heat-shock response.* Annual Review of Biochemistry, 1986. **55**: p. 1151-91.
714. Richter, K., M. Haslbeck, and J. Buchner, *The heat shock response: life on the verge of death.* Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 253-66.
715. Kallio, M., et al., *Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice.* EMBO Journal, 2002. **21**(11): p. 2591-601.
716. Cedenho, A.P., et al., *Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa.* Human Reproduction, 2006. **21**(7): p. 1791-4.
717. Mou, L., et al., *A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia.* Human Genetics, 2013. **132**(2): p. 159-65.
718. Garzon, R., et al., *MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia.* Blood, 2009. **114**(26): p. 5331-41.
719. Takada, S., et al., *Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos.* RNA, 2009. **15**(8): p. 1507-14.
720. Veeck, J. and M. Esteller, *Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(1): p. 5-17.
721. Anckar, J. and L. Sistonen, *Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease.* Annual Review of Biochemistry, 2011. **80**: p. 1089-115.
722. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.* Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
723. Plasterk, R.H., *Micro RNAs in animal development.* Cell, 2006. **124**(5): p. 877-81.
724. Kim, V.N. and J.W. Nam, *Genomics of microRNA.* Trends in Genetics, 2006. **22**(3): p. 165-73.
725. Takashima, S., et al., *Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects.* Biology of Reproduction, 2009. **81**(1): p. 155-64.
726. Ostling, P., et al., *Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1.* Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(10): p. 7077-86.
727. Zheng, K., et al., *Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11841-6.
728. De Fazio, S., et al., *The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements.* Nature, 2011. **480**(7376): p. 259-63.

729. Vagin, V.V., et al., *Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members.* Genes and Development, 2009. **23**(15): p. 1749-62.
730. Hanson, E.K., H. Lubenow, and J. Ballantyne, *Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs.* Analytical Biochemistry, 2009. **387**(2): p. 303-14.
731. Boon, R.A. and K.C. Vickers, *Intercellular transport of microRNAs.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(2): p. 186-92.
732. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases.* Cell Res, 2008. **18**(10): p. 997-1006.