

**ÉCOLE DOCTORALE SST**  
**UMR INRA/CNRS/Université de Tours**  
**Physiologie de la Reproduction et des Comportements**

**THÈSE** présentée par :  
**Betty FUMEL**

soutenue le : 16 Décembre 2011

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**  
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

**Rôles des récepteurs à l'hormone  
thyroïdienne, TR $\alpha$ 1 et p43, dans le contrôle  
de la prolifération des cellules de Sertoli  
chez la souris**

**THÈSE dirigée par :**  
Mr GUILLOU Florian

Directeur de recherche (HDR), INRA, Tours

**RAPPORTEURS :**  
Mme DEJUCQ-RAINSFORD Nathalie  
Mr LAREYRE Jean-Jacques

Chargée de recherche (HDR), INSERM, Rennes  
Chargé de recherche (HDR), INRA, Rennes

**JURY :**  
Mr BENZAKOUR Omar  
Mme DEJUCQ-RAINSFORD Nathalie  
Mme FOUCHECOURT Sophie  
Mr GUILLOU Florian  
Mr LAREYRE Jean-Jacques  
Mr ROYERE Dominique

Professeur, Université de Poitiers  
Chargée de recherche (HDR), INSERM, Rennes  
Chargée de recherche, INRA, Tours  
Directeur de recherche (HDR), INRA, Tours  
Chargé de recherche (HDR), INRA, Rennes  
Professeur, Université François - Rabelais, Tours

« Il vaut mieux subir l'injustice que de la commettre. »

Socrate

# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur le président et Mesdames, Messieurs, les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Un immense merci à Sophie Fouchécourt, pour m'avoir encadré durant cette thèse. C'est une grande fierté d'avoir été votre première thésarde, même si je resterai la seule et unique! Merci de m'avoir tant appris; merci pour votre disponibilité, vos conseils, votre pertinence ainsi que de m'avoir inculqué la rigueur scientifique. Merci aussi pour tous les à-côtés : les fous rires, les prêts littéraires, les prêts de Psychologie magazine et les discussions sur la nature humaine. Alexis & Eliot, vous avez une maman en or, promis, c'est fini, je ne l'accaparerais plus! Merci de m'avoir soutenu pendant les moments de doute. Je suis désormais convaincue que "Le succès c'est d'aller d'échec en échec sans perdre son enthousiasme"!

Un grand merci à Florian Guillou, pour m'avoir encadré en DEA et durant ces trois ans de thèse. Merci pour votre disponibilité, à toutes heures (surtout nocturnes!). Merci de m'avoir ouvert la porte du monde du testicule. Merci pour toutes les discussions scientifiques enrichissantes, pour votre écoute ainsi que pour vos conseils scientifiques. La transferrine et les souris shTf resteront une sacrée belle aventure. On saura bientôt si la transferrine me portait bonheur ou si je portais bonheur à la transferrine! Merci également de m'avoir initié aux arts primitifs... Même si l'art Inuit n'est pas devenu ma passion!

Merci aux membres de mon comité de thèse de m'avoir accompagné (et si souvent aidé) pendant ses trois années; plus particulièrement à Karine Gauthier pour ses précieux conseils pour la qRT-PCR et ses mails d'encouragement; et, à Gabriel Livera pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, m'avoir initiée à la culture organotypique et pour toutes les discussions scientifiques passionnantes. Merci également à Marina Govoroun et Philippe Monget pour leurs conseils avisés.

Un grand merci à René Habert de m'avoir permis de réaliser mes cultures organotypiques et tous mes comptages BrdU dans son laboratoire au CEA de Fontenay-Aux-Roses. Merci à toute son équipe pour l'accueil chaleureux, plus particulièrement à Stéphanie

Moreno et Sébastien Messiaen pour avoir mis fin à de longs mois de tentatives infructueuses pour la mise au point de mes immunohistochimies ! Merci à Abdelali Lehraiki pour toutes les discussions sur nos thèses respectives. Enfin, un immense merci à Virginie Rouiller-Fabre pour sa gentillesse désarmante. Ces déplacements à Fontenay ont été une vraie bouffée d'oxygène pour moi.

Je remercie sincèrement Christophe Staub pour son aide, sa gentillesse et son dévouement! Merci de m'avoir initié à la stéréologie. Merci pour le thé, les biscuits et les discussions sur les post-docs! ça a été un plaisir de travailler avec vous... Euh avec toi!

Un énorme merci à Michèle Magistrini sans qui les comptages de Sertoli à l'âge adulte n'auraient pas été possibles. Michèle, merci pour ton dévouement et ta gentillesse. Jamais personne ne m'avait tendu la main à la prc avant toi...

Merci également à Fabrice Vincent pour son aide dans la mise au point des paramètres et pour l'utilisation du matériel m'ayant permis de faire mes comptages de cellules de Sertoli chez l'adulte... Fabrice, merci pour ton dévouement et ta patience.

Merci à Laurence Dupuy, ma grande sœur, d'avoir toujours été là pour veiller sur moi et de m'avoir si souvent réconforté! Merci pour ton amitié, ton soutien et pour tous les fous rires qu'on a partagé, à l'Inra et en dehors! Les visites des châteaux de la Loire resteront de sacrés souvenirs! Que d'anecdotes à noter dans le petit cahier.... J'espère qu'il y en aura encore plein d'autres.

Merci à tous les thésards et assimilés que j'ai eu la joie de côtoyer du vieux temps de l'ancienne équipe MAG jusqu'à maintenant. Merci à Vanessa Wehbi pour ses encouragements et son soutien outre-Atlantique. Merci à Guillaume Durand, pour m'avoir si souvent fait rire avec ses blagues (pas toujours drôles... Alors, c'est l'histoire de 7 nains qui vont à la mine...), pour m'avoir si souvent prêté Midol et pour les commentaires sur les matchs du top 14 les lundis matins: vive Clermont-Ferrand et l'ASM! Merci à Jérémy Decourtye, pour tous les bons moments passés, ravie d'avoir partagé les pauses ragots avec toi et de t'avoir initié au théâtre. Merci à Thibaud Tranchant pour nos discussions sur l'avenir dans la Science et merci d'être resté jusqu'à la fin de ma thèse! (Finalement, je ne suis pas la dernière à partir!) Merci également aux autres commères de la bande: Vincent Puard, Stéphanie Roy, JB Bodet et Gwenhael Jégot pour leur soutien et les soirées aux Berthoms! Un

immense merci supplémentaire à Stéphanie Roy pour son soutien et son aide (et grand dévouement) pour l'impression des manuscrits!

Sans oublier mes copines de promo! Merci à Leslie Angulo, ma guimauve, pour tous les bons moments passés, depuis le master 1. Merci à Maya Haj Hassan, pour toutes nos discussions sur le déroulement de nos thèses et sur l'avenir et les fous rires de décompression dans la voiture en rentrant le soir. Merci à Stéphanie Coyral-Castel pour son soutien et la recherche d'idées de reconversion dans les moments de doute! Merci à Elodie Desroziers pour son amitié et son soutien.

Merci aux animaliers, Claude Cahier, Déborah Crespin et Marine Cirot, qui ont bichonné mes petites souris pendant ces trois ans à l'Inra. Claude, merci pour les discussions sur la vraie « vie », j'espère que la chasse sera bonne cet Automne! Les filles, merci pour toutes nos discussions entre deux manips et d'avoir pallié à toutes mes demandes, même de dernières minutes! Merci pour tout à tous les trois.

Merci à Eric Jeanpierre de m'avoir appris les prélèvements rétro-orbitaux et les ponctions intracardiaques. Eric, merci pour nos petites discussions, ton soutien et ta sympathie.

Merci à Isabelle Gibert pour le génotypage de mes souris & à Christophe Gauthier pour les dosages de testostérone.

Merci également au personnel de la PRC, qui m'a accompagné, de près ou de loin, durant ces trois ans. Merci à Sophie Mary pour sa gentillesse et les nombreux ordres de mission préparés, ainsi que pour la réception discrète des bouquets de fleurs! Merci à Béatrice Desmet pour les réservations de billets de train et d'avion. Merci à Ghislaine Ploux pour sa sympathie. Merci à Thérèse Hiribarren pour les nombreuses commandes passées. Merci à Patrick Trézy pour sa gentillesse. Merci à Gaël Ramé pour son dévouement et sa bonne humeur contagieuse.

Je remercie de tout cœur mes amis, pour ne pas m'avoir abandonné malgré mon peu de disponibilité au cours de ses trois dernières années. Audrey & Amélie, mes copines de toujours, merci de la force de votre amitié et de votre soutien! Ma Céline, je devrais désormais trouvé le temps de venir en pèlerinage au Puy! Marie-Ange et Nath, merci de votre

compassion! Julien et Nico, merci de votre soutien à distance. Bruno, merci pour m'avoir si souvent permis de penser à autre chose.

Merci à mes parents de m'avoir permis d'aller au bout de ces huit longues années d'études, merci de votre soutien, financier et mental! Merci de ne pas m'avoir renié malgré le nombre maigre de mes retours en Corrèze durant ces trois ans. Merci à mon frère, Maxime, pour ses encouragements... Bientôt se sera à moi de t'encourager si tu te lances aussi dans l'aventure d'une thèse... Merci à mes grands-mères de ne pas avoir tourné de l'œil quand je tentais de leur expliquer que mon job consistait à prélever des testicules de souris!

Pour finir (le meilleur pour la fin), merci à l'homme de ma vie. Benjamin, merci à toi mon amour, merci pour tout ce que tu es. Sans toi, je n'aurais certainement pas eu la force de finir cette thèse. Merci d'avoir toujours su trouvé les mots, de croire en moi et d'être toujours là pour moi. Merci de me supporter, aux deux sens du terme! Je t'aime.

(Merci également à mes sponsors de rédaction de thèse: Maison du café et Milka!)

Mille excuses aux personnes que j'aurais pu oublier de remercier...

## Résumé

Les pathologies d'hypothyroïdie et d'hyperthyroïdie et les études menées via les modèles pharmacologiques ont montré l'importance de la régulation de l'hormone thyroïdienne T3 pour le développement testiculaire. La T3 agit via des récepteurs nucléaires appelés TRs. Chez la souris, le gène *THRA* code pour sept isoformes de récepteurs. Parmi ces sept isoformes, seuls deux sont capables de lier l'ADN et la T3, le récepteur nucléaire TR $\alpha$ 1 et le récepteur mitochondrial p43. Des travaux précédents indiquent que le récepteur TR $\alpha$ 1 serait impliqué dans l'action de la T3 au niveau testiculaire et notamment, dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli (Holsberger *et al.*, 2005).

Afin d'évaluer le rôle de ce récepteur dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli dans le testicule, nous avons étudié l'impact de l'invalidation de ce récepteur TR $\alpha$ 1 (lignée de souris TR $\alpha$ 0) et, de l'expression d'un récepteur dominant négatif de TR $\alpha$ 1, appelé TR $\alpha^{\text{AMI}}$ , spécifiquement dans les cellules de Sertoli (lignée de souris TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC). Ce récepteur TR $\alpha^{\text{AMI}}$  induit une répression constitutive de la transcription des gènes cibles de la T3.

Dans les deux modèles, TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC, nous montrons une augmentation de la prolifération des cellules de Sertoli à 3jpp, avec pour conséquence à l'âge adulte une augmentation du poids testiculaire et du rendement spermatique. Grâce à l'utilisation de cultures organotypiques de testicules de souris témoins et mutantes, nous démontrons que **la T3 agit directement sur la prolifération des cellules de Sertoli**. Nous montrons que l'invalidation du récepteur TR $\alpha$ 1 ou, l'expression du dominant négatif TR $\alpha^{\text{AMI}}$ , conduit à une augmentation de l'expression de Cdk4 et Cdkn2a à 3 jpp. Il est probable que ces deux acteurs du cycle cellulaire soient responsables de l'augmentation de la prolifération des cellules de Sertoli. Nous montrons que l'expression des facteurs de transcription c-myc et JunD, connus pour contrôler la transcription du gène Cdk4, est modifiée dans le testicule des souris TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC à 3 jpp. **La régulation de la prolifération des cellules de Sertoli T3-dépendante implique donc la voie Cdk4/Cdkn2a/JunD/c-myc.**

Nous avons analysé l'implication du récepteur p43 mitochondrial dans la régulation du contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli par la T3. Ce récepteur p43 est codé par le génome nucléaire puis, importé dans la mitochondrie.

Nous montrons que l'invalidation du récepteur mitochondrial (lignée de souris p43KO; Blanchet *et al.*, 2011) provoque un phénotype testiculaire similaire à celui observé lorsque le TR $\alpha$ 1 est invalidé ou quand le dominant négatif TR $\alpha^{\text{AMI}}$  est exprimé spécifiquement dans les cellules de Sertoli. Nous avons observé une augmentation de la prolifération des cellules de Sertoli à 3 jpp avec pour conséquences une augmentation du poids testiculaire et du rendement spermatique chez l'adulte. L'invalidation du récepteur p43 entraîne une modification de la structure des mitochondries chez l'adulte. A 3 jpp, nous montrons une modification de l'expression des gènes mitochondriaux dans les testicules de souris p43KO. Les mêmes modifications sont observées dans les testicules des souris TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC. Nous montrons également une modification du gène c-myc.

**Ces résultats montrent pour la première fois l'importance de la régulation des génomes, mitochondrial (via le récepteur p43) et nucléaire (via le récepteur TR $\alpha$ 1), pour le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli par la T3.**

Ces résultats apportent un nouvel éclairage sur le contrôle endocrine des fonctions testiculaires et apportent des informations précieuses pour mieux comprendre l'origine de la baisse du rendement spermatique observé à l'heure actuelle, chez l'homme et les espèces sauvages.

**Mots-clés:** cellules de Sertoli, prolifération, développement post-natal, hormones thyroïdiennes, récepteur TR $\alpha$ 1, récepteur p43

# Abstract

Hypothyroidism and hyperthyroidism pathologies and pharmacological model studies have shown the importance of thyroid hormone regulation for testicular development. Thyroid hormone T3 acts on nuclear receptors, called TRs. In mouse, the *THRA* gene encodes seven receptors. Among them, only two are able to bind DNA and T3, the nuclear TR $\alpha$ 1 and the mitochondrial p43. Previous studies indicate that TR $\alpha$ 1 may be implied in T3 actions on testis, particularly in Sertoli cell proliferation control (Holsberger *et al.*, 2005).

In order to evaluate TR $\alpha$ 1 role in Sertoli cell proliferation control, we studied impacts of TR $\alpha$ 1 invalidation (TR $\alpha$ 0 mice) and of a TR $\alpha$ 1 negative dominant receptor expression (called TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>) specifically in Sertoli cells (TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC mice). TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> receptor induces constitutive repression of T3 target genes.

In both TR $\alpha$ 0 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC models, we demonstrated an increase in Sertoli cell proliferation at 3 dpp inducing an increase in testicular weight and spermatic reserve at adulthood. By using organotypic cultures of control and mutant mouse testis, we demonstrated that **T3 directly acts on Sertoli cell proliferation**. We showed that TR $\alpha$ 1 invalidation or TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> expression leads to an increase in Cdk4 and Cdkn2a expressions at 3dpp. These cell cycle actors might be responsible of Sertoli cell proliferation increase. Moreover, at 3 dpp, we demonstrated that c-myc and JunD, which are transcription factors known to control Cdk4 expression, exhibit modification of their expression in TR $\alpha$ 0 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC mice. **T3-dependant Sertoli cell proliferation regulation implies the Cdk4/Cdkn2a/JunD/c-myc pathway.**

We analysed mitochondrial p43 receptor implication in T3-dependant regulation of Sertoli cell proliferation. This receptor is encoded by nuclear genome and imported in mitochondria.

We demonstrated that p43 receptor invalidation (p43KO mice; Blanchet *et al.*, 2011) induces similar phenotype as observed in TR $\alpha$ 0 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC mice. We observed an increase in Sertoli cell proliferation at 3 dpp inducing an increase in testicular weight and spermatic

reserve at adulthood. p43 receptor invalidation leads to mitochondria structure modifications at adulthood. In 3 dpp p43KO testis, we showed modifications in the expression of mitochondria genes. Same modifications are observed in TR $\alpha$ 0 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC mice. We also demonstrated modification of c-myc expression.

**For the first time, these results demonstrate the importance of mitochondrial genome (via p43 receptor) and nuclear genome (via TR $\alpha$ 1 receptor) regulations for Sertoli cell proliferation control by T3.**

These results bring a new light on endocrine control of testicular functions and give precious informations to understand the currently observed decline of sperm production in humans and wild species.

**Key words:** Sertoli cells, proliferation, post-natal development, thyroid hormones, TR $\alpha$ 1 receptor, p43 receptor

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	7
Abstract .....	9
Table des matières .....	11
Liste des abréviations .....	14
Liste des figures.....	19
Liste des annexes.....	22
Introduction .....	23
I. L'hormone thyroïdienne T3 et ses récepteurs .....	24
A. Synthèse de l'hormone T3.....	24
B. Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs) .....	25
1) La famille des récepteurs nucléaires.....	25
2) Les gènes codant pour les TRs .....	25
3) Les différents domaines des TRs et leur fonction .....	26
4) Mode d'action des TRs.....	27
C. Rôles de la T3 et des TRs.....	30
1) Principaux rôles de la T3.....	30
2) TRs et développement chez la souris .....	30
D. Hormones thyroïdiennes et effets non nucléaires.....	32
1) Actions cytoplasmiques de la T3.....	32
2) Actions mitochondriales de la T3.....	33
II. Le testicule .....	37
A. Morphologie du testicule.....	37
B. Physiologie et fonctions du testicule .....	38
1) Compartiment interstitiel et fonction endocrine.....	39
2) Compartiment tubulaire et spermatogenèse .....	45
3) Les cellules de Sertoli.....	52
C. Ontogenèse et mise en place des cellules de Sertoli.....	62
1) Prémices au développement de la gonade mâle .....	62
2) Développement des cellules de Sertoli.....	62

III.	Régulation de la balance prolifération/différenciation des cellules de Sertoli .....	66
A.	Action de la FSH et autres facteurs .....	66
B.	Régulation via l'hormone thyroïdienne T3 .....	68
1)	Les déiodases testiculaires.....	69
2)	Rôle de la T3 dans la prolifération des cellules de Sertoli .....	69
3)	Les TRs impliqués.....	70
4)	La T3 et les mécanismes supposés impliqués dans la prolifération des cellules de Sertoli .....	72
5)	T3 et marqueurs de maturation des cellules de Sertoli.....	73
6)	Effets de la T3 sur le métabolisme du glucose des cellules de Sertoli .....	75
	Objectifs .....	76
	Résultats .....	79
I.	Impact phénotypique de l'inactivation du récepteur TR $\alpha$ 1 dans les cellules de Sertoli et cellules de Leydig, par inactivation ciblée .....	80
A.	Conséquences de l'expression du dominant négatif TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> dans les cellules de Sertoli sur la fonction du testicule.....	80
1)	Contexte.....	80
2)	Résultats et discussion.....	82
3)	Perspectives .....	84
B.	Rôles du récepteur TR $\alpha$ 1 dans les cellules de Leydig adultes: lignée TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> -Aro.....	86
1)	Contexte.....	86
2)	Matériel et méthodes .....	87
3)	Résultats .....	88
4)	Discussion/perspectives.....	89
II.	Impact de l'invalidation du récepteur mitochondrial p43 sur la prolifération des cellules de Sertoli.....	91
A.	Introduction .....	91
B.	Matériels et méthodes.....	91
C.	Résultats .....	94
1)	Analyse du phénotype testiculaire des souris p43KO .....	94
2)	Comparaison des phénotypes testiculaires entre les lignées p43KO, TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> -SC .....	97
D.	Discussion .....	99
	Conclusion générale & perspectives .....	103

I. Quels sont les facteurs, induits par l'activation du TR $\alpha$ 1 par la T3, qui sont impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli? .....	105
II. Existe-t-il d'autres récepteurs, autres que TR $\alpha$ 1 et p43, impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli chez la souris? .....	107
III. Comment les voies de signalisation induites par la T3 et celles induites par la FSH contrôlent de la prolifération des cellules de Sertoli? .....	109
IV. Pourquoi la T3 induit la différenciation des cellules de Sertoli uniquement après la naissance?.....	110
V. Quels sont les acteurs qui établissent le dialogue entre génome nucléaire et génome mitochondrial suite à l'activation par la T3 des récepteurs TR $\alpha$ 1 et p43? .....	111
VI. Quelles applications à nos travaux? .....	114
Bibliographie .....	116
Annexes .....	142

## Liste des abréviations

ABP	Androgen Binding Protein
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AF	Activating Function
AMH	Anti-Mullerian Hormone
AR	Androgen receptor
ARKO	Androgen Receptor Knock Out
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyUridine
CBP	CREB Binding Protein
CDK	Cyclin Dependant Kinase
CDKI	Cyclin Dependant Kinase Inhibitor
ChIP-Seq	Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing
CREB	cAMP-Response Element-Binding protein
Cx	Connexin
DAB	DiAminoBenzidine
DBD	DNA Binding Domain
DR	Direct Repeat
DHEA	DeHydroEpiAndrosterone

DHT	DiHydroTestosterone
DRIP/TRAP	vitamin D Receptor Interacting pRotein/Thyroid hormone Receptor Associated Protein
ER	Estrogen Receptor
ERKO	Estrogen Receptor Knock Out
Erm	Ets related molecule
FC	Fold Change
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	Follicle Stimulating Hormone
FSH -R	Follicle Stimulating Hormone Receptor
GDNF	Glial Derived Neurotrophic Factor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
hCG	human Chorionic Gonadotropin
HDL	High Density Lipoprotein
HDAC	Histones DeACetylates
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$
IGF	Insulin Growth Factor
Il	Interleukin
IRES	Internal Ribosome Entry Site
JAM	Junctional Adhesion Molecules
jpc	jours post-coitum
jpp	jours post-partum

KO	Knock Out
KI	Knock In
LBD	Ligand Binding Domain
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinizing Hormone
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
NCoR	Nuclear receptor Co-Repressor
NLS	Nuclear Localization Signal
PCAF	p300/CBP Associated Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGC	Primordial Germ Cells
PI3K	PhosphoInositide-3-Kinase
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PLC	PhosphoLipase C
PPAR $\gamma$ 2	Peroxisome Proliferator Activated Receptor $\gamma$ 2
PS	PhosphatidylSerine phospholipide
p450Arom	p450Aromatase
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive Oxygen Species

RXR	Récepteur X aux Rétinoïdes
SC	Sertoli Cell
SCARKO	Sertoli Cell Androgen Receptor Knock Out
SCF	Stem Cell Factor
Sf-1	Steroidogenic factor 1
SHBG	Sex Hormone Binding Globuline
SMRT	Silencing Mediator for Retinoic acid receptor and Thyroid receptor
SR-BI	Scavenger Receptor Class B Type I
SRC	Steroid Receptor Co-activator
SRY	Sex-determining Region of Y chromosome
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
TGF	Transforming Growth Factor
THRA	Thyroid Hormone Receptor Alpha
THRB	Thyroid Hormone Receptor Beta
TNF	Tumor Necrosis Factor
TR	Thyroid Receptor
TRE	Thyroid hormone Response Element
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine

17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -HydroxySteroide Deshydrogenase
UCP	Uncoupling Protein
WT1	Wilms Tumor 1
ZO	Zonula Occludens

# Liste des figures

**Figure 1:** Régulation de la synthèse de l'hormone thyroïdienne par l'axe hypothalamo-hypophysaire

**Figure 2:** Transformation de la T4 en T3

**Figure 3:** Les produits du gène *THRA*

**Figure 4:** Les produits du gène *THRB*

**Figure 5:** Structure des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs)

**Figure 6:** Structure des hétérodimères TR/RXR

**Figure 7:** Régulation des gènes cibles de la T3 par les TRs

**Figure 8:** Effets non génomiques de la T3

**Figure 9:** Structure interne de l'appareil génital mâle chez la souris

**Figure 10:** Structure interne du testicule humain

**Figure 11:** Schéma de la compartimentation tubes séminifères/interstitium

**Figure 12:** Synthèse de la testostérone par les cellules de Leydig

**Figure 13:** Coupe transversale d'un tube séminifère de souris adulte

**Figure 14:** Schéma des différentes jonctions spécialisées du tube séminifère

**Figure 15:** Déroulement de la spermatogenèse chez la souris

**Figure 16:** Le cycle de l'épithélium séminifère chez la souris

**Figure 17:** Représentation schématique d'une cellule de Sertoli

**Figure 18:** Observation en microscopie électronique d'une cellule de Sertoli de souris

**Figure 19:** Les facteurs sertoliens et leur rôle supposé

- Figure 20:** Mécanismes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophyséogonadique
- Figure 21:** Ontogenèse de la gonade mâle chez l'Homme
- Figure 22:** Prolifération post-natale des cellules de Sertoli chez la souris
- Figure 23:** Niveaux circulants des hormones durant le développement post-natal chez la souris
- Figure 24:** Actions de la T3 sur le développement testiculaire
- Figure 25:** Mécanismes hypothétiques du contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli par la T3
- Figure 26:** Mécanismes contrôlant le passage G1 à S du cycle cellulaire
- Figure 27:** La construction TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>
- Figure 28:** Expression de TR $\alpha$ 1 dans le testicule de souris
- Figure 29:** Expression des gènes du cycle cellulaire dans les testicules des souris TR $\alpha$ 0 à 3 jpp
- Figure 30:** Expression des gènes JunD et de c-myc dans les testicules des souris TR $\alpha$ 0 à 3 jpp
- Figure 31:** Effet du traitement à la T3 sur le poids testiculaire des souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC à 4 mois
- Figure 32:** Poids testiculaire et réserve spermatique des souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Aro à 4-6 mois
- Figure 33:** Prolifération des cellules de Sertoli des souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Aro à 3 jpp
- Figure 34:** Cultures organotypiques des testicules des souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Aro à 3 jpp
- Figure 35:** Niveaux de testostérone chez les souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Aro à l'âge adulte
- Figure 36:** Expression de TR $\alpha$ 1 et TR $\alpha$ 2 dans les testicules des souris p43KO
- Figure 37:** Poids testiculaire et réserve spermatique des souris p43KO à 4 mois
- Figure 38:** Niveaux de testostérone chez les souris p43KO à l'âge adulte
- Figure 39:** Prolifération des cellules de Sertoli des souris p43KO à 3 jpp

**Figure 40:** Observation des mitochondries des testicules des souris p43KO à l'âge adulte en microscopie électronique

**Figure 41:** Expression des gènes mitochondriaux dans les testicules des souris p43KO à 3 jpp

**Figure 42:** Expression du gène c-myc dans les testicules des souris p43KO à 3 jpp

**Figure 43:** Expression du gène JunD dans les testicules des souris p43KO à 3 jpp

**Figure 44:** Observation des mitochondries des testicules des souris TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha^{AM1}$ -SC à l'âge adulte en microscopie électronique

**Figure 45:** Expression des gènes mitochondriaux dans les testicules des souris TR $\alpha$ 0 à 3 jpp

**Figure 46:** Expression des gènes mitochondriaux dans les testicules des souris TR $\alpha^{AM1}$ -SC à 3 jpp

# Liste des annexes

Annexe 1 : Création de la lignée de souris aromatase-Cre et spécificité de l'excision induite .....	143
Annexe 2 : Expression de l'aromatase-Cre dans l'ovaire .....	144
Annexe 3: Expression de l'aromatase-Cre dans le testicule.....	145
Annexe 4: Article de synthèse sur les fonctions de la transferrine dans le testicule (revue parue dans Andrologie) .....	146

# Introduction

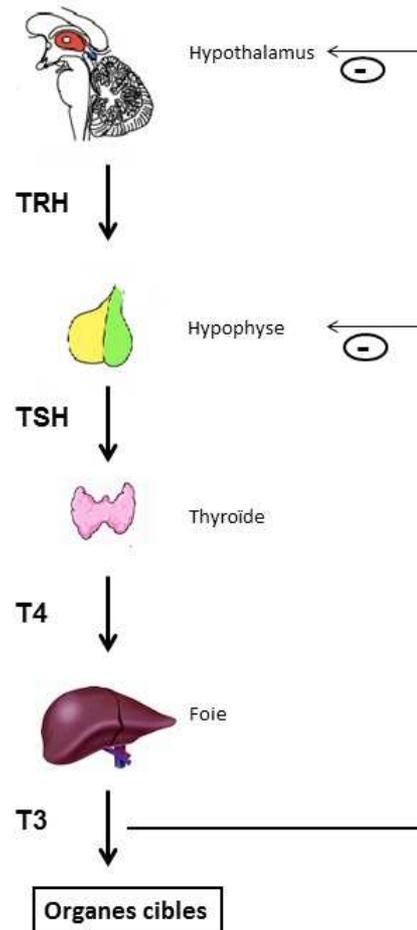


Figure 1: Régulation de la synthèse de l'hormone thyroïdienne par l'axe hypothalamo-hypophysaire

La synthèse de la T4 est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La T4 est ensuite transformée en T3 par les déiodases, au niveau des tissus périphériques comme le foie. Il existe un rétrocontrôle de la T3 sur la production de TRH et TSH par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

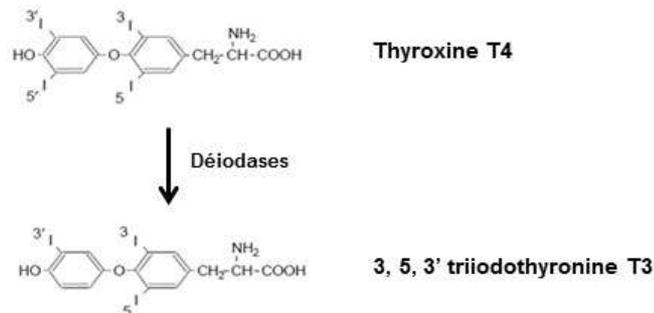


Figure 2: Transformation de la Thyroxine en Tri-iodothyronine

La T4, forme précurseur, est clivée par les déiodases pour donner la forme active de l'hormone, la T3.

# I. L'hormone thyroïdienne T3 et ses récepteurs

## A. Synthèse de l'hormone T3

La glande thyroïde produit une hormone, la thyroxine ou 3,5,3',5' tétraiodothyronine ou T4. La thyroïde est une glande endocrine bilobée, située dans la partie antérieure du cou, sur la face ventrale du larynx. Les deux lobes sont reliés par un isthme. La thyroïde est constituée de deux types de cellules, les cellules à calcitonine et les cellules folliculaires ou thyrocytes, qui sécrètent l'hormone thyroïdienne T4. Les thyrocytes sont en charge de l'accumulation active d'iode provenant de l'alimentation pour produire la T4 (et une faible quantité de T3) (Laurberg, 1984).

Le contrôle de la synthèse des hormones thyroïdiennes se fait par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 1). La synthèse de T4 dans la thyroïde est activée par l'hormone hypophysaire la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) (Shupnik *et al.*, 1985). La synthèse de la TSH est sous contrôle hypothalamique, via la stimulation par la TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) (Koller *et al.*, 1987). Le niveau sanguin d'hormone thyroïdienne est finement régulé. La T4 et la T3 exercent un rétrocontrôle négatif hypophysaire en réprimant l'expression des gènes codant pour les deux sous unités de la TSH (TSH $\alpha$  et TSH $\beta$ ) ainsi que sur le gène codant pour la TRH. (Vagenakis, 1988; Guissouma *et al.*, 2000 and 2005). La T4 est transportée par le sang via des protéines plasmatiques (Thyroxyne Binding Globuline, Transthyretine, Albumine) jusqu'aux tissus périphériques, où elle est déiodinée par les T4 5'-déiodases de types 1 ou 2. La perte de l'atome d'iode conduit à la formation de l'hormone triiodothyronine T3 (Figure 2). La forme active de l'hormone est la T3. Elle se lie préférentiellement à des récepteurs nucléaires contrôlant la transcription du génome (St Germain and Galton, 1997). Les principaux organes capables de transformer la T4 en T3 sont le foie et les reins via les Déiodases D1, responsables des deux tiers de la production de T3 par le corps, ainsi que le cerveau et le tissu adipeux brun via les Déiodases D2 (Brent *et al.*, 1994). Dans les tissus, la T3 et la T4 sont dégradées par les Déiodases D3.

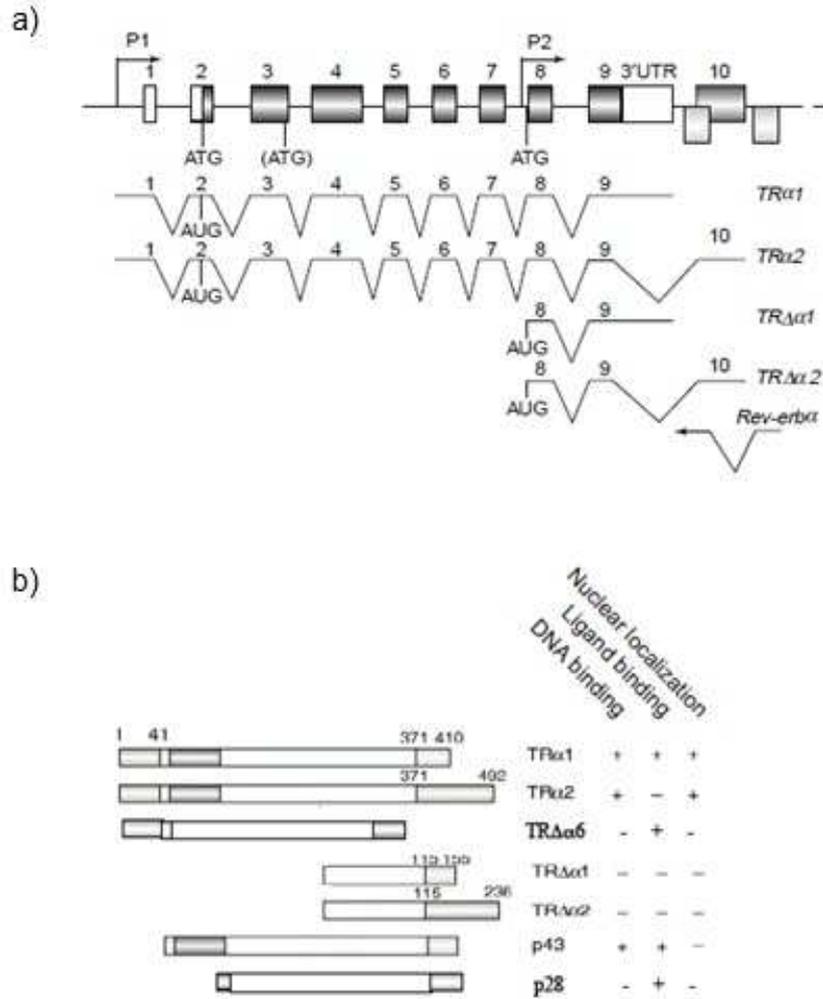


Figure 3: Les produits du gène *THRA* (adapté de Flamant et Samarut, 2003)

Chez la souris, le gène *THRA* code pour sept isoformes.

A partir du locus *THRA*, par épissage alternatif des exons 6 et 9 et utilisation d'un promoteur interne P2, cinq ARNm sont générés (a). Ces transcrits codent pour sept protéines différentes, obtenues par traduction à partir d'ATG alternatifs (b). L'ARNm de TRα1 code pour trois récepteurs : TRα1, p43 et p28.

## B. Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs)

### 1) La famille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes font partie de la famille des récepteurs nucléaires, tout comme les récepteurs aux stéroïdes, à l'acide rétinoïque ou encore aux vitamines A et D (Kumar *et al.*, 1999). Certains récepteurs sont dits orphelins car leurs ligands ne sont pas connus.

Les récepteurs nucléaires sont composés de différents domaines homologues permettant la fixation du ligand, la dimérisation et la fixation à l'ADN (Kumar *et al.*, 1999). Les différents récepteurs nucléaires ont évolué à partir d'un gène ancestral par duplication (Laudet *et al.*, 1992).

### 2) Les gènes codant pour les TRs

Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes sont codés par deux gènes : *THRA* et *THRB*. Chacun de ces deux gènes peut générer grâce à l'utilisation de promoteurs internes et par épissage alternatif différentes isoformes protéiques.

Chez la souris, ces deux gènes codent pour neuf isoformes.

Le gène *THRA* code pour 7 isoformes (Figure 3). Parmi elles, on trouve deux formes longues TR $\alpha$ 1 et TR $\alpha$ 2, qui sont issues d'un épissage alternatif d'un transcrit primaire (Koenig *et al.*, 1989). Il y a aussi trois formes tronquées TR $\Delta\alpha$ 1, TR $\Delta\alpha$ 2 (issues de l'épissage alternatif d'un transcrit secondaire débutant à partir d'un promoteur interne situé dans l'intron 7 (Chassande *et al.*, 1997)) et TR $\Delta\alpha$ 6. Seules les formes TR $\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 6 sont capables de lier le ligand. Mais contrairement au TR $\alpha$ 1, la forme TR $\Delta\alpha$ 6 ne peut pas lier l'ADN, elle aurait un rôle antagoniste (Casas *et al.*, 2006). Le gène *THRA* code aussi pour deux récepteurs à localisation mitochondriale : p43 et p28, issus du transcrit TR $\alpha$ 1. p43 possède un site de liaison à l'ADN et est impliquée dans la régulation du génome mitochondrial (Casas *et al.*, 1999).

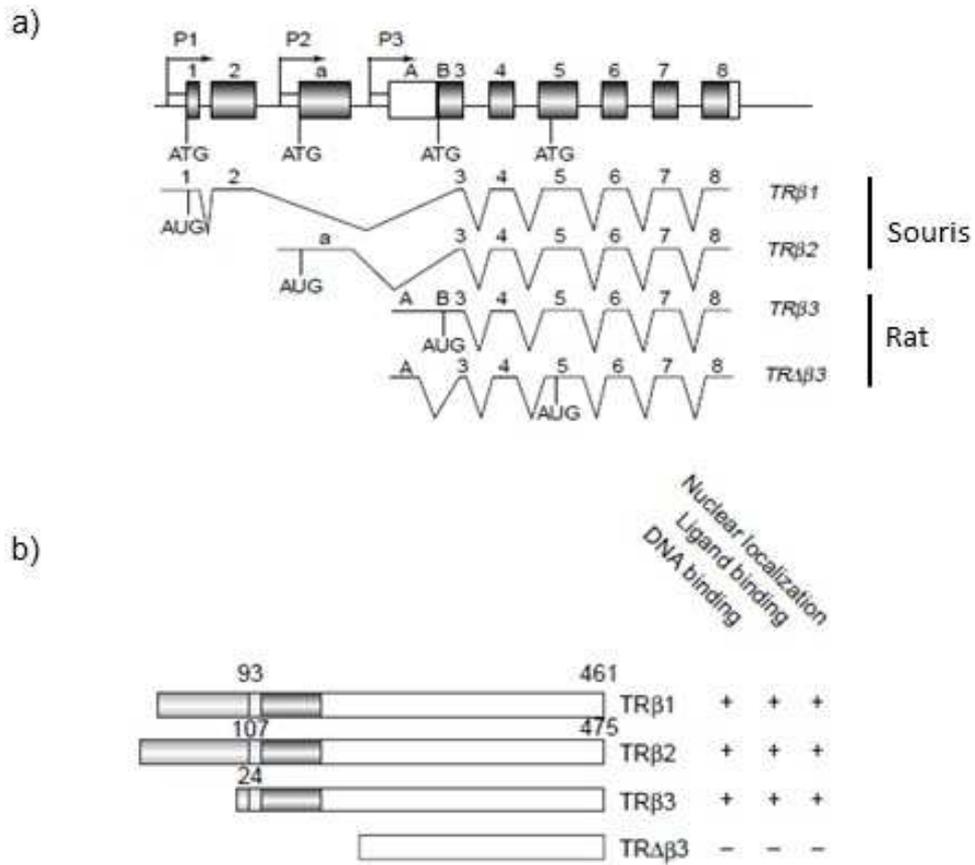


Figure 4: Les produits du gène *THRβ* (adapté de Flamant et Samarut, 2003)

Chez la souris, le gène *THRβ* code pour deux isoformes: TRβ1 et TRβ2. Les isoformes TRβ3 et TRβΔ3 ne sont retrouvés que chez le rat.

A partir du locus *THRβ*, deux ARNm sont générés via utilisation de deux promoteurs (a). Ces deux ARNm codent pour les récepteurs TRβ1 et TRβ2 (b).

La fonction exacte de la p28 est inconnue mais, elle pourrait jouer le rôle de récepteur impliqué dans les actions de la T3 sur les mitochondries vu sa colocalisation avec des enzymes de la chaîne respiratoire telles que les UCPs, translocases et ATP synthases (La thyroïde, des concepts à la pratique clinique, Elsevier, 2ème édition, Leclère *et al.*, 2001).

Les formes TR $\alpha$ 2, TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2 sont des antagonistes de TR $\alpha$ 1 car elles piègent le ligand sans activer la transcription des gènes cibles (Chassande *et al.*, 1997).

TR $\alpha$ 2, coexprimé avec TR $\alpha$ 1, aurait une action dominante négative (Burgos-Trinidad and Koenig, 1999 ; Lazar *et al.*, 1989).

TR $\alpha$ 1 et TR $\alpha$ 2 sont exprimés dans tous les organes (avec des niveaux d'expression différents selon les organes ; notamment une forte expression dans le cerveau et le cœur) alors que les formes courtes TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2 ne sont exprimées que dans l'épithélium intestinal, les poumons et le cerveau (Flamant and Samarut, 2003).

Le gène *THRB* code pour deux isoformes (Figure 4), TR $\beta$ 1 et TR $\beta$ 2. Elles sont issues de différents sites d'initiation de la transcription (Flamant and Samarut, 2003).

Les récepteurs TR $\beta$ s sont impliqués dans la régulation des niveaux de T4 et T3 circulantes via inhibition de l'expression des gènes codant pour les deux sous unités de la TSH, TSH $\alpha$  et TSH $\beta$  (Forrest *et al.*, 1996). TR $\beta$  est exprimé de manière ubiquitaire et principalement dans le foie. TR $\beta$ 2 est retrouvé dans l'hypophyse, l'hypothalamus, la rétine et l'oreille interne au cours de son développement.

Chez le rat, le gène *THRB* code en plus pour deux autres isoformes, TR $\beta$ 3 et TR $\Delta\beta$ 3 (Williams, 2000). TR $\beta$ 3 est présent dans le foie, les reins et les poumons et TR $\Delta\beta$ 3 dans les muscles squelettiques, le cœur, la rate et le cerveau (Flamant and Samarut 2003).

### 3) Les différents domaines des TRs et leur fonction

En tant que récepteurs nucléaires, les récepteurs aux hormones thyroïdiennes présentent des domaines caractéristiques (Figure 5):

- Un domaine de liaison à l'ADN : le DBD (DNA Binding Domaine)
- Un domaine de liaison au ligand : le LBD (Ligand Binding Domaine).

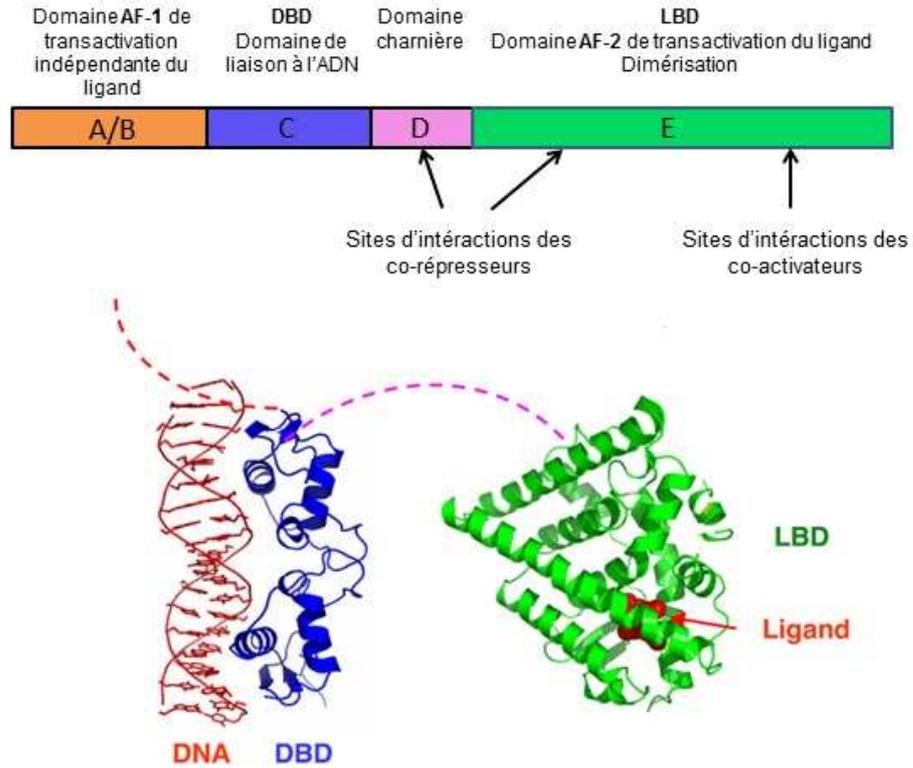


Figure 5: Structure des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Le récepteur de l'hormone thyroïdienne TR est composé de quatre domaines, dont un domaine C de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine E de liaison du ligand T3 (LBD).

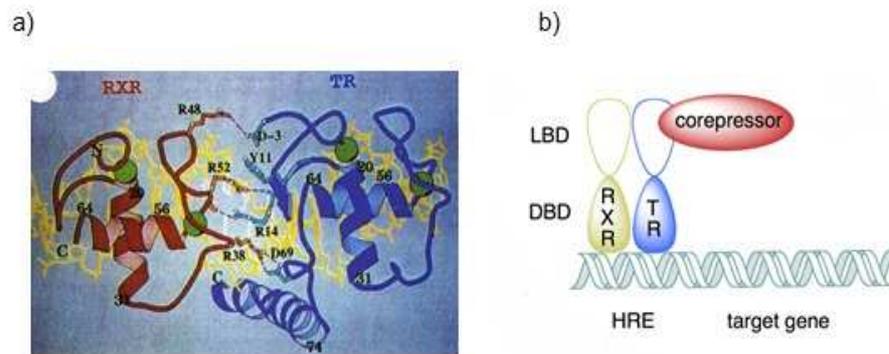


Figure 6: Structure des hétérodimères TR/RXR

a) Cristallographie de l'hétérodimère TR/RXR (Rastinejad et al., 1995)

b) Représentation schématique du positionnement du complexe TR/RXR sur l'ADN

On retrouve une grande conservation entre espèces de ces domaines (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Le DBD contient deux domaines à doigts de zinc (Brent, 1994 ; Yen, 2001). Le LBD permet la fixation de l'hormone ainsi que l'interaction des co-régulateurs (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Il y a également présence de domaines responsables de la transactivation, il s'agit des domaines AF (Activating Function). Il y en a deux, AF-1 et AF-2 qui sont respectivement responsables de la transactivation indépendante ou dépendante de l'hormone (Gonzalez-Sancho *et al.*, 2003). Ces domaines sont localisés en parties amino (N) et carboxy (C)-terminales.

A l'extrémité amino-terminale, la présence de séquence de localisation nucléaire (NLS) est à noter (Anderson and Vennstrom, 1997).

#### 4) Mode d'action des TRs

##### a) Eléments de réponse aux TRs

La fixation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes se fait sur des séquences particulières, appelées les TREs (Thyroid hormone Response Element). Ces séquences sont généralement situées dans la région des promoteurs des gènes cibles. Cette fixation a lieu le plus souvent à l'état d'hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire, le RXR (Récepteur X aux Rétinoïdes) (Figure 6).

La séquence consensus du TRE est un tandem de AGGT(C/A)A en répétition directe, séparés par quatre paires de bases, appelées Direct Repeat 4 (DR4; Yen *et al.*, 2006). Il existe également d'autres séquences dont la séquence ER6.

Cependant, les TREs présents dans les promoteurs de gènes cibles sont fréquemment différents de ce consensus (via des arrangements en palindromes ou en palindromes inversés ou selon le nombre de nucléotides séparant les répétitions) (Glass, 1994).

Une hypothèse est avancée quant à la capacité des TRs à réguler l'expression des gènes à partir d'une large variété de TREs. Celle-ci s'expliquerait par le fait que les TRs s'hétérodimérisent avec les RXRs et que ces hétérodimérisations diffèrent selon la séquence du TRE puisque la conformation du TR s'adapterait au TRE (Yen *et al.*, 2006).

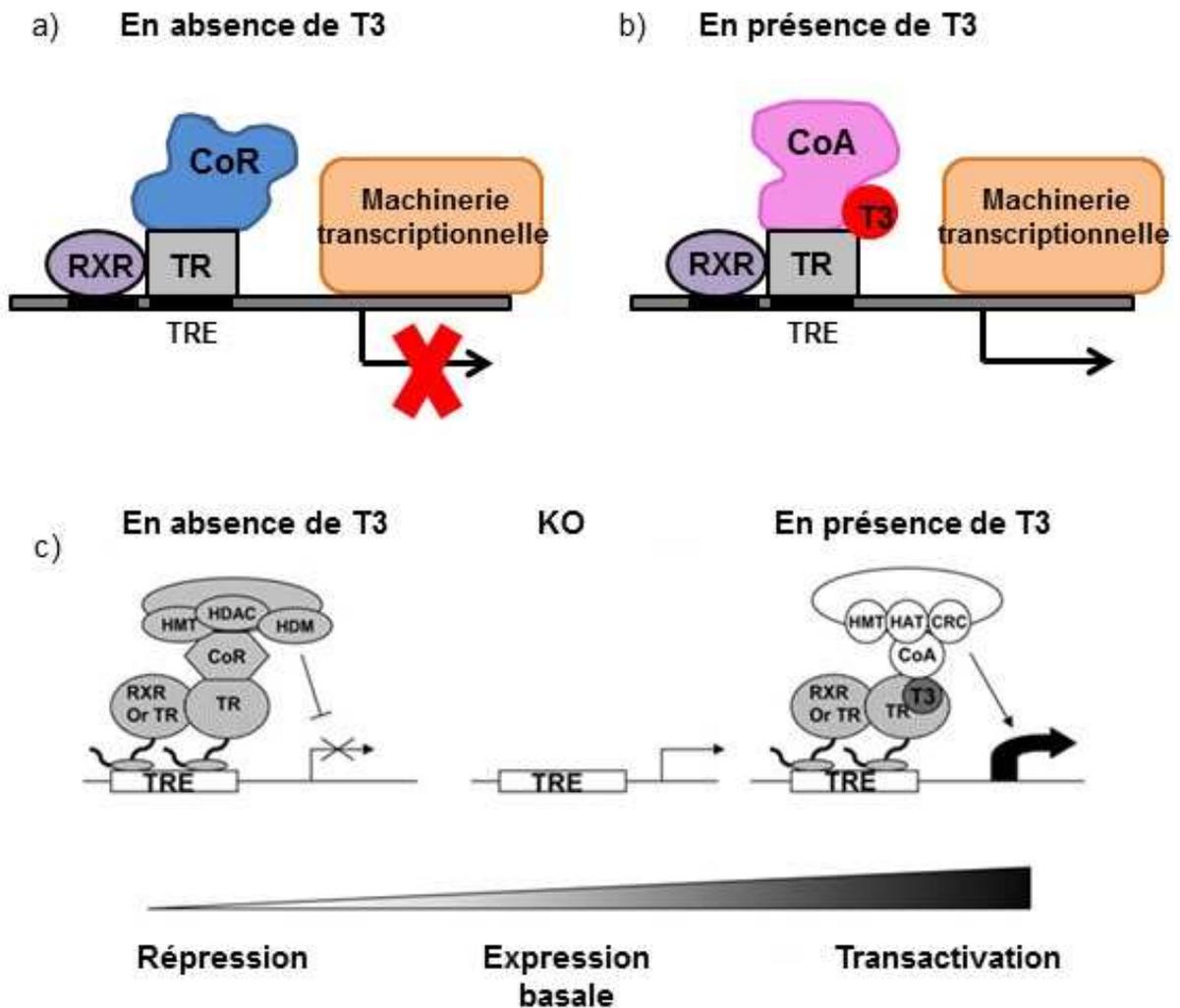


Figure 7: Régulation des gènes cibles de la T3 par les TRs (adaptés de Chang et al., 2010 et de Flamant et al., 2007)

Les récepteurs nucléaires à la T3 TRs se fixent sur des éléments de réponse appelés TREs.

- En absence de T3, il y a interaction du TR avec des co-répresseurs CoR et répression de la transcription des gènes cibles.
- En présence de T3, le TR interagit avec des co-activateurs CoA et active la transcription de gènes cibles.
- L'absence de TR, suite à une invalidation par KO, est moins délétère que la forme aporécepteur.

## b) Régulation transcriptionnelle dépendante du ligand

En présence et en absence de ligand, les hétérodimères TR/RXR se fixent sur les TREs dans le promoteur des gènes cibles (Figure 7).

En absence d'hormone T3 (Figure 7a), le TR est sous forme d'aporécepteur, il réprime la transcription de gènes cibles. En effet, dans le cas de répression basale en absence de T3, il y a reconnaissance des TRs sans ligand par les corépresseurs. Il a également été démontré que les TRs sans ligand peuvent inhiber la mise en place du complexe de pré-initiation de la transcription (Fondell *et al.*, 1993). Les facteurs impliqués sont NCoR (Nuclear receptor Co-Repressor) et SMRT (silencing mediator for retinoic acid receptor and TR) qui répriment l'interaction des hétérodimères TR/RXR avec la machinerie transcriptionnelle en place sur la boîte TATA (Chen and Evans 1995; Horlein *et al.*, 1995). Ces corépresseurs peuvent également former un complexe avec des répresseurs de la transcription comme sin3 et des Histones déacétylases (HDACs) (Nagy *et al.*, 1997). Ces HDACs ont pour but de garder la chromatine dans une conformation qui rend la transcription impossible.

Quand la T3 se fixe sur le TR (Figure 7b), celui-ci prend la forme d'holorécepteur en changeant de conformation tridimensionnelle. Dans la partie centrale du domaine AF-2, l'hélice 12 se replie sur le récepteur ce qui a pour conséquence la dissociation du corépresseur et l'interaction avec des co-activateurs favorisant la transcription du gène (Wagner *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1998). Ce phénomène nécessite à la fois la présence de protéines d'échange et une dégradation des protéines via la voie du protéasome (Flamant *et al.*, 2007). Parmi les co-activateurs, on trouve le Steroid Receptor Co-activator SRC. Il s'agit d'une protéine de 160 kDa qui s'associe à plusieurs récepteurs d'hormone en présence du ligand (Onate *et al.*, 1995). La famille des SRCs comprend plusieurs membres qui ont les mêmes capacités d'activation de la transcription (Yen, 2001). Les SRCs interagissent avec des molécules qui font le lien entre les TR et la machinerie de transcription. On trouve par exemple CBP (CREB Binding Protein) et p300. CBP est nécessaire à l'activation de promoteurs AMPc-dépendants par la protéine CREB (cAMP-response element-binding protein) (McKenna *et al.*, 1999). p300 est aussi un co-intégrateur pour l'activation transcriptionnelle par différents facteurs de transcription (McKenna *et al.*, 1999). Le complexe CBP/p300 interagit avec un activateur de la transcription, PCAF (p300/CBP Associated Protein) (Yen *et al.*, 2006). Les différents partenaires de l'activation par les TRs ont également des activités d'histones acétyltransférases, qui permettent de rendre la

chromatine accessible à la machinerie de transcription dans les régions promotrices des gènes cibles (Yen *et al.*, 2006). L'activation de la transcription implique également le complexe DRIP/TRAP (vitamin D Receptor Interacting pRotein/Thyroid hormone Receptor Associated Protein) qui contient une quinzaine de protéines (Yen *et al.*, 2006).

En résumé, l'activation de la transcription des gènes-cibles de la T3 implique la liaison de SRCs à un TR, les SRCs permettant tout d'abord la fixation de facteurs de décondensation de la chromatine puis, dans un deuxième temps, la liaison avec un complexe DRIP/TRAP qui recrute la polymérase II et les facteurs d'initiation de la transcription qui se fixent sur la boîte TATA induisant alors la transcription.

Cependant, certains gènes-cibles sont régulés de manière inverse. Leur transcription est activée en absence de T3 et réprimée en présence de celle-ci. Ces TRE « négatifs » semblent généralement très proches du site d'initiation de la transcription ou sont situés généralement après la boîte TATA (Yen, 2001). C'est le cas des gènes codant pour les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la TSH (Shupnik *et al.*, 1983). Dans ces cas de régulation inverse, les TRs liés à la T3 sont capables de recruter des HDAC, qui referment la chromatine rendant alors l'initiation de la transcription impossible (Eckey *et al.*, 2003). De plus, SMRT qui est normalement un co-répresseur fixé au TR en absence de T3, peut fonctionner comme un co-activateur (Berghagen *et al.*, 2002). De même, NCoR peut intervenir dans l'activation de gènes cibles en absence de T3 (Sato *et al.*, 1999). Ces changements de fonctions des cofacteurs seraient dépendants des variations de séquence des TREs qui induiraient des changements de conformation des TRs modifiant ainsi leurs fonctions activatrices ou répressives (Berghagen *et al.*, 2002).

Il est à noter que l'absence de TRs via invalidation par KO est moins délétère que la forme aporécepteur car, certes on perd la transactivation mais, on perd également la répression (Figure 7c).

## C. Rôles de la T3 et des TRs

### 1) Principaux rôles de la T3

Chez les mammifères, les hormones thyroïdiennes contrôlent la température corporelle en stimulant la thermogénèse dans les tissus adipeux bruns (Johansson *et al.*, 1998). Elles sont également impliquées dans des processus plus généraux comme le métabolisme des lipides (Loeb, 2000), la dégradation du cholestérol (Gullberg *et al.*, 2002; Plateroti *et al.*, 2004) ou encore l'assimilation du glucose (Dimitriadis *et al.* 2006). Chez l'homme, de nombreuses pathologies liées aux hormones thyroïdiennes sont connues. L'hormone thyroïdienne est indispensable au développement cérébral du fœtus. Un déficit en hormones thyroïdiennes pendant la période néonatale a de sévères conséquences puisqu'il va conduire au crétinisme. Les symptômes classiques sont : jaunisse, difficultés à la tétée, cri rauque, léthargie, hypothermie et abdomen distendu. Si la maladie est diagnostiquée et traitée dès la naissance, le développement mental et la croissance de ces enfants sont normaux. Sinon, à l'âge adulte, les patients présentent de sévères déficiences mentales et physiques : arriération mentale, nanisme, persistance des caractères infantiles, surdité, vision altérée, peau sèche et épaisse, langue proéminente, faiblesse musculaire, léthargie grave et fatigue. Chez le nouveau-né, la cause principale d'hypothyroïdie est une carence en iode durant la grossesse.

En période prépubère l'hypothyroïdisme induit à une augmentation de la taille des testicules (Jannini *et al.*, 1995). Un hyperthyroïdisme durant la période néonatale provoque un hypogonadisme et une infertilité à l'âge adulte (Jannini *et al.*, 1995).

### 2) TRs et développement chez la souris

Les modèles murins d'inactivation des gènes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes ont permis de montrer que les TRs ne sont pas essentiels pour le développement embryonnaire. En effet, les souriceaux sont viables à la naissance (Göthe *et al.*, 1999; Plateroti *et al.*, 2004). Le taux de T3 augmente très fortement au cours des 2 premières semaines de vie post-natale, déclenchant l'activation d'un grand nombre de gènes nécessaires entre autres à la croissance et au sevrage (Plateroti *et al.*, 2004). Le récepteur le plus important dans cette activation massive de gènes-cibles est le TR $\alpha$ 1 (Tinnikov *et al.*, 2002).

L'analyse des souris TR $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> (Wikström *et al.*, 1998) et des souris TR $\alpha$ <sup>-/-</sup> (Fraichard *et al.*, 1997) et TR $\alpha$ <sup>0/0</sup> (Gauthier *et al.*, 2001) ont permis de conclure que le récepteur TR $\alpha$ 1 joue un rôle important dans le développement et dans certaines activités physiologiques. TR $\alpha$ 1 a un rôle prépondérant pour le maintien du niveau basal de la fréquence cardiaque (Wikström *et al.*, 1998), la thermogénèse (Gauthier *et al.*, 2001), la maturation des os longs et la croissance corporelle (Fraichard *et al.*, 1997 ; Gauthier *et al.*, 2001). Il a également été montré un rôle pour la maturation intestinale (Plateroti *et al.*, 1999 et 2001). TR $\alpha$ 1 est également impliqué dans le développement des lymphocytes B (Arpin *et al.*, 2000).

Les récepteurs TR $\beta$  ont également des fonctions importantes. Les souris TR $\beta$ <sup>-/-</sup> sont hyperthyroïdiennes et présentent des défauts majeurs de la régulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde (Forrest *et al.*, 1996; Gauthier *et al.*, 1999). L'analyse de souris dépourvues spécifiquement des récepteurs TR $\beta$ 2 (Abel *et al.*, 1999) a montré que le rétrocontrôle de la production de l'hormone TSH est dérégulé. Ainsi, le rétrocontrôle de la T3 dépend uniquement du récepteur TR $\beta$ 2. Il a également été mis en évidence que les souris dépourvues de récepteurs TR $\beta$  sont sourdes, à cause d'un défaut fonctionnel des cellules ciliées de l'oreille interne (Forrest *et al.*, 1996). De plus, elles présentent une altération de la différenciation de certaines cônes de la rétine conduisant à une vision altérée des couleurs (Ng *et al.*, 2001).

Un des principaux organes cible de la T3 est le système nerveux. Les souris hypothyroïdiennes présentent un défaut de prolifération, de survie et de migration des neuroblastes de la couche granulaire externe du cervelet (Morte *et al.* 2002).

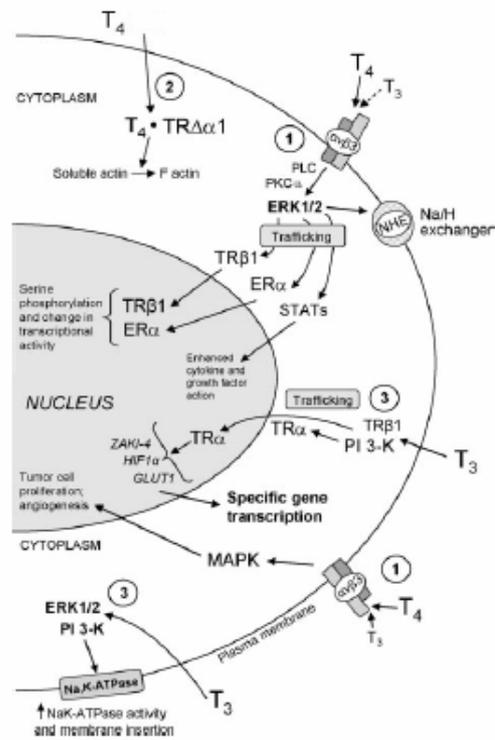


Figure 8: Les effets non génomiques de la T3 (Chang et al., 2010)

Ces effets sont initiés au niveau de la membrane plasmique via l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  ou dans le cytoplasme.

- 1) Via ce récepteur intégrine, la T3 stimule la voie des MAPK (ERK1/2) en passant par la phospholipase C (PLC) et la protéine kinase C (PKC). Cette cascade aboutit à des événements cellulaires comme la régulation de la prolifération tumorale, l'angiogenèse.
- 2) La forme tronquée TR $\Delta 1$  cytoplasmique médie l'action de la T4 sur le cytosquelette d'actine.
- 3) Dans le cytoplasme, la T3 active de manière non génomique la PI3K et initie la régulation de gènes spécifiques. Cette activation implique les TR $\alpha$  et TR $\beta 1$  cytoplasmiques.

## D. Hormones thyroïdiennes et effets non nucléaires

### 1) Actions cytoplasmiques de la T3

Par définition, les effets non génomiques de l'hormone thyroïdienne T3 sont indépendants des récepteurs nucléaires TRs. Ces effets ont été décrits au niveau de la membrane plasmique, du cytosquelette, de nombreux organites et du cytoplasme (Figure 8). Ces effets non génomiques ont été mis en évidence suite aux observations montrant que la T3 affecte la signalisation calcique en seulement quelques minutes (Segal, 1989; Davis *et al.*, 1989) et que la T3 influence la thermogénèse et l'activité de lipolyse des catécholamines en moins de trente minutes (Andrews *et al.*, 1979; Lynch *et al.*, 1985).

Il a été montré que les effets non génomiques de la T3 sont initiés au niveau de la membrane plasmique par une protéine, l'intégrine  $\alpha\beta3$ . Celle-ci contient un domaine de liaison à l'hormone, qui est aussi un site d'initiation des événements cellulaires. Ceci a été montré dans des modèles de divisions cellulaires (Davis *et al.*, 2006) et d'angiogénèse (Bergh *et al.*, 2005). A partir de cette intégrine  $\alpha\beta3$ , le signal issu de la T3 active la voie des MAPKs (ERK1/2) dans les cellules endothéliales (Bergh *et al.*, 2005) et dans les lignées tumorales en prolifération (Davis *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2007). L'activation de la voie MAPK passe par la phospholipase C (PLC) et la protéine kinase C (PKC) (Davis *et al.*, 2008). La T3 mais, également la T4, peuvent activer la PI3K via son interaction avec l'intégrine  $\alpha\beta3$ . (Lin *et al.*, 2009)

Il existe également un site de fixation T3-spécifique qui active les PI3Ks. Ceci est impliqué dans le trafic de certaines protéines intracellulaires. Cela permet le transport de TR $\alpha$  nucléaire, du cytoplasme au noyau, pour la transcription de gènes cibles spécifiques comme HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ ) (Lin *et al.*, 2009). L'activation de la PI3K peut se faire directement dans le cytoplasme par interaction directe entre TR $\alpha$ 1 extranucléaire lié à la T3 et la sous-unité régulatrice de la PI3K appelée p85, qui entraîne alors la transcription de plusieurs gènes spécifiques (Hiroi *et al.*, 2006).

L'activation de la PI3K peut également impliquer le TR $\beta$ . Dans le cytoplasme, lorsqu'il est lié à la T3, le TR $\beta$  interagit avec p85 et induit une cascade dans les voie de signalisation (impliquant Akt/PKB et mTor) conduisant à des changements dans la transcription des gènes cibles de la PI3K (Cao *et al.*, 2005 ; Moeller *et al.*, 2006).

De plus, il est à noter que l'activation des MAPKs ERK1/2, précédant l'activation de la PI3K par la T3, conduit à des changements importants au niveau de la membrane plasmique notamment des changements d'activité des Na et K-ATPases (Lei *et al.*, 2008).

L'existence de ces actions non génomiques de la T3 a été mise en évidence en 1981 par Galo et ses collaborateurs. Ils ont montré sur des membranes d'érythrocytes de rat que l'activité de la pompe à Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) est modulée par la T3. D'autres études ont montré que le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline est indispensable à l'action de la T3 (Davis *et al.*, 1983) et que cela implique des kinases spécifiques (Lawrence *et al.*, 1989).

Plusieurs équipes ont mis en évidence des actions non génomiques de la T3 sur la pompe à Sodium (Na,K-ATPase). Ils ont montré que la T3 augmente l'activité de cette pompe dans les cellules alvéolaires des poumons (Lei *et al.*, 2003; Bhargava *et al.*, 2007). Cette activation se fait via les MAPKs (Lei *et al.*, 2008) et la PI3K (Lei *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2008).

Il a été également établi que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  était soumis à régulation par la T3 (Incerpi *et al.*, 1999) et que cela implique les MAPKs (ERK1/2) (D'Arezzo *et al.*, 2004).

## 2) Actions mitochondriales de la T3

Il existe des effets de la T3 sur le génome mitochondrial. Le génome mitochondrial code pour treize sous-unités enzymatiques de la chaîne respiratoire, deux ARNs ribosomiaux et vingt-deux ARNs de transfert.

La T3 est considérée comme un régulateur majeur de la biogenèse des mitochondries (Mutvei *et al.*, 1989). Elle a été démontrée comme activatrice de la consommation d'oxygène (Palacios-Romero and Mowbray, 1979; Sterling *et al.*, 1980), de l'expression du génome mitochondrial (Mutvei *et al.*, 1989; Wiesner *et al.*, 1992) et de la mitochondriogenèse (Gross, 1971).

Plusieurs études ont montré que des injections de T3 à des rats hypothyroïdiens augmente la consommation d'oxygène et les phosphorylations oxydatives dans les mitochondries isolées du foie, moins de trente minutes après l'injection (Palacios-Romero and Mowbray, 1979; Sterling *et al.*, 1980). Cet effet de la T3 a également été démontré *in vitro* (Sterling *et al.*, 1977; Thomas *et al.*, 1987). Ces effets sont à court terme.

Des effets à long terme ont aussi été mis en évidence. En effet, des études ont été réalisées et ont montré que la T3 est impliquée dans des effets à long terme sur la consommation d'oxygène (Harper *et al.*, 1993). Dans des mitochondries isolées des hépatocytes, il a été observé que les mouvements de protons au niveau de la membrane interne sont une cible importante de la T3 et que cela influence la consommation d'oxygène. Ces mouvements de protons contrôlent à hauteur de 20% la respiration mitochondriale. De plus, les UCPs (Uncoupled Proteins) semblent impliqués dans ce contrôle (Lanni *et al.*, 1999). Il a été montré que l'expression des gènes des UCP1, UCP2 et UCP3 est augmentée par la T3 (Cassard-Doucier *et al.*, 1994; Guerra *et al.*, 1996; Rabelo *et al.*, 1996; Lanni *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 1997; Larkin *et al.*, 1997).

La T3 a également un impact sur l'expression du génome mitochondrial. L'administration de T3 chez des rats hypothyroïdiens conduit à une augmentation de deux à huit fois des ARNm mitochondriaux dans le foie (Mutvei *et al.*, 1989). Ceci a également été montré dans les muscles squelettiques (Wiesner *et al.*, 1992). En 1999, Enriquez et ses collaborateurs ont montré que la T3 diminue la demi-vie des ARNm mitochondriaux.

La mitochondriogenèse est la résultante de plusieurs événements qui conduisent à la synthèse de membranes phospholipidiques et à leur assemblage, à la réplication de l'ADN ainsi qu'à l'activation de l'expression du génome mitochondrial et des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales. La régulation par la T3 de ces événements implique donc à la fois des récepteurs nucléaires et des récepteurs mitochondriaux. L'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales est régulée par la T3 (Pillar and Seitz, 1997). C'est le cas des gènes codant pour de nombreuses sous-unités de la chaîne respiratoire, pour le cytochrome C1, les UCPs... De plus, en corrélation avec cela, il a été montré que l'importation dans les mitochondries de protéines d'origine nucléaire est augmentée dans les cellules musculaires cardiaques (Craig *et al.*, 2000). La mitochondriogenèse nécessite donc une grande coordination entre l'expression des deux génomes, nucléaire et mitochondrial.

Il a également été démontré que l'action mitochondriale de la T3 joue un rôle dans le contrôle de la différenciation des myoblastes (Rochard *et al.*, 1996 and 2000).

Un autre mécanisme concernant l'action des hormones thyroïdiennes sur la mitochondrie a été montré. Il s'agit de l'action de la T2 (3,5-diiodo-L-thyronine), qui est issue de la dégradation de la T3. L'administration de T2 réduit la masse grasseuse de rats qui reçoivent une alimentation riche en graisse. La T2 stimule l'oxydation  $\beta$  des acides gras et l'action des UCPs notamment dans le foie (Lanni *et al.*, 2005). La T2, du fait de sa faible affinité pour les TRs, a une action non génomique (Ball *et al.*, 1997).

Il existe dans la matrice mitochondriale, une isoforme de TRs codée par le gène *THRA*, la p43. Cette forme tronquée fait 43 kDa. Elle est traduite à partir du messager codant pour le TR $\alpha$ 1 via la présence d'un AUG interne. Cette protéine contient un domaine de liaison à l'ADN.

p43 n'a pas de fonction nucléaire comme les autres TRs. Elle est adressée à la mitochondrie et régule l'expression de son génome (Wrutniak *et al.*, 1995). L'affinité de p43 pour la T3 est comparable à celle observée pour les autres TRs. p43 agit en se fixant sur des séquences mitochondriales analogues à des TREs et augmente le niveau des ARNs mitochondriaux de façon T3-dépendante (Wrutniak *et al.*, 1998; Casas *et al.*, 1999). Casas et ses collaborateurs (1999) ont montré dans le foie que la p43 augmente de manière importante la transcription du génome mitochondrial et la synthèse des protéines mitochondriales impliquées dans les chaînes respiratoires.

Il a été démontré que p43 en tant que monomère ne peut pas se lier à l'ADN mitochondrial mais que cela est possible sous forme de dimère, notamment avec une forme tronquée de PPAR $\gamma$ 2 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$ 2) appelée mt-PPAR (Casas *et al.*, 1999 et 2000).

Casas et ses collaborateurs ont également montré en 2001 qu'une protéine de 44 kDa, appelée mt-RXR, issue du clivage du récepteur RXR $\alpha$  nucléaire, est importée dans la matrice mitochondriale et se lie soit seule, soit en hétérodimère avec p43, au génome mitochondrial pour augmenter la synthèse des ARN mitochondriaux.

Il a été montré un rôle de p43 dans la différenciation des myoblastes. En effet lorsque p43 est surexprimée, la différenciation des myoblastes est augmentée (Rochard *et al.*, 1996 and 2000 ; Seyer *et al.*, 2006). Seyer et ses collaborateurs ont montré en 2006 que cette régulation

implique c-myc. En effet, l'inhibition de l'activité mitochondriale par le chloramphénicol augmente le niveau d'ARNm de c-myc. De plus, la surexpression de p43 induit une diminution de l'expression de c-myc. La surexpression de c-myc mime l'influence de l'inhibition de l'activité mitochondriale sur la différenciation des myoblastes. c-myc apparaît donc comme une cible importante de l'activité mitochondriale.

Il a également été montré que la surexpression de p43 dans des fibroblastes humains stimule l'activité mitochondriale (Grandemange *et al.*, 2005).

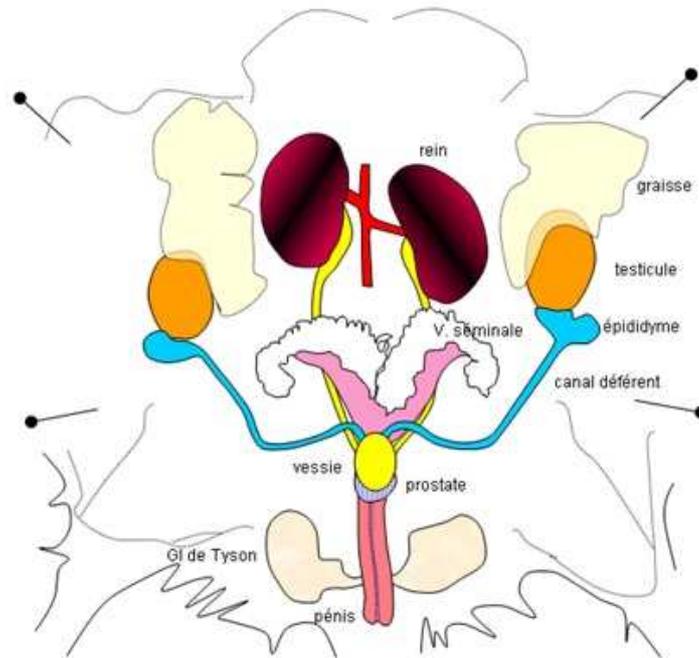


Figure 9: Structure interne de l'appareil génital mâle chez la souris (d'après <http://svt.ac-dijon.fr>)

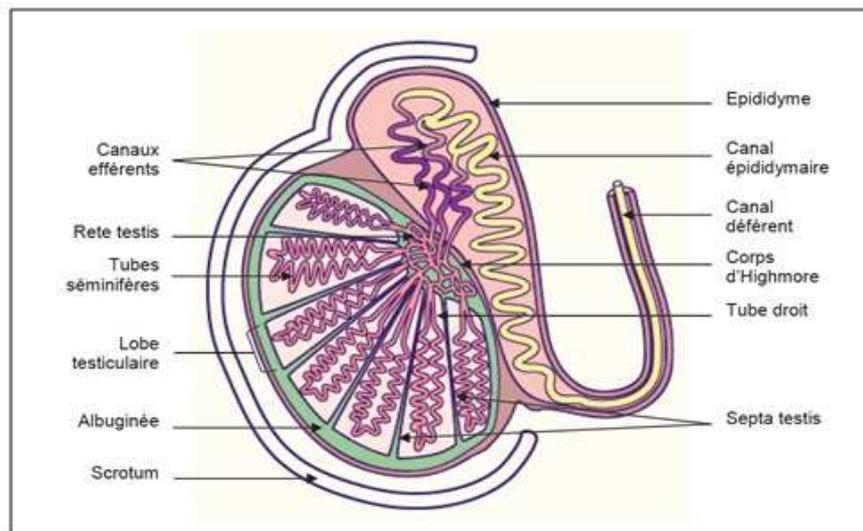


Figure 10: Structure interne du testicule humain en coupe longitudinale

## II. Le testicule

### A. Morphologie du testicule

Chez le mâle, l'appareil reproducteur comprend les gonades, le tractus génital et les glandes annexes (Figure 9).

Les gonades mâles ou testicules assurent deux fonctions essentielles : la production des gamètes mâles, les spermatozoïdes et la synthèse et sécrétion d'hormones stéroïdes (les androgènes, essentiellement de la testostérone).

Le tractus génital est formé des voies spermatiques intra et extra testiculaires. On trouve les tubes droits et le rete testis, les canaux efférents, l'épididyme, le canal déférent et l'urètre. Ces canaux assurent le transport des spermatozoïdes.

Les glandes annexes sont chargées de produire le liquide de transport et de nutrition des spermatozoïdes. Le sperme est constitué de ces sécrétions et des spermatozoïdes. Il y a trois glandes annexes : la prostate, les vésicules séminales et les glandes de Cowper.

Les testicules (Figure 10) sont deux organes pairs ovoïdes. Chaque testicule est logé dans un sac revêtu de peau appelé scrotum. Le testicule est entouré d'une capsule épaisse, riche en tissu conjonctif et fibres de collagènes, appelée albuginée. Au pôle supérieur, cette capsule s'épaissit et s'enfonce à l'intérieur du testicule pour former un cône fibreux, le corps d'Highmore. Du corps d'Highmore partent des cloisons conjonctives radiaires, les septa testis, délimitant 200 à 300 lobules testiculaires plus ou moins triangulaires. Chaque lobule contient 2 à 4 tubes séminifères très longs. Chez les rongeurs, il n'y a pas ce système de cloisons.

Dans les tubes séminifères se divisent et se différencient les cellules germinales jusqu'à la formation des spermatozoïdes. A l'intérieur des tubes séminifères, les cellules de la lignée germinale sont associées aux cellules de Sertoli avec lesquelles elles constituent l'épithélium séminal. Les espaces entre ces tubes sont occupés par le tissu interstitiel, c'est un conjonctif lâche, riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques et en fibres nerveuses. Le tissu interstitiel contient des cellules glandulaires, les cellules de Leydig. Ces cellules produisent la testostérone.

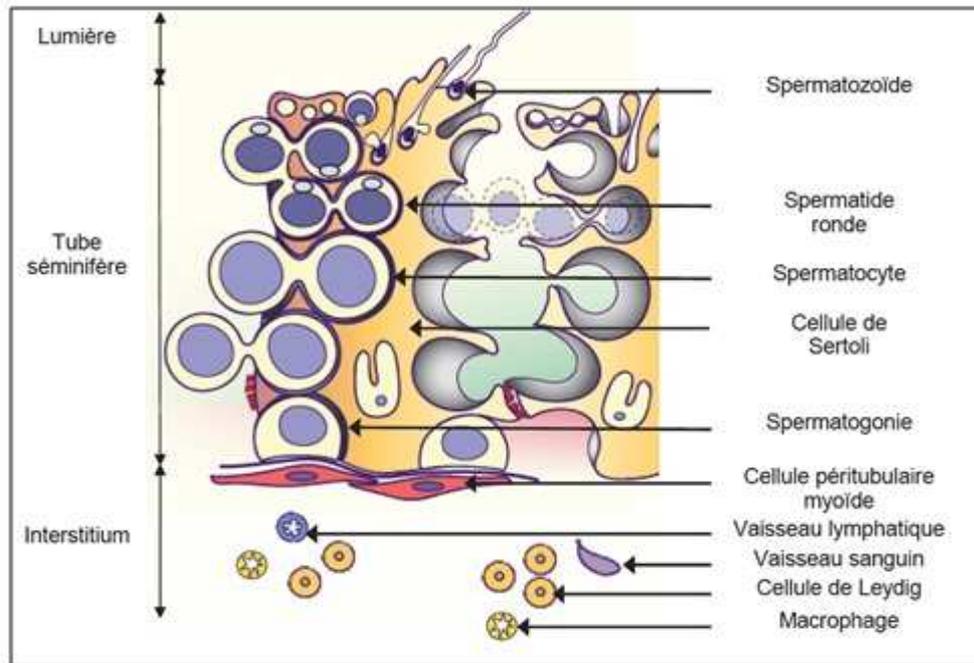


Figure 11: Représentation schématique de la compartimentation tubes séminifères /interstitium

Les tubes séminifères se prolongent par de petits tubes courts et rectilignes appelés tubes droits qui pénètrent ensuite dans le corps de Highmore et forment un réseau de canalicules, le rete testis. Le rete testis se poursuit par les cônes efférents qui relient le testicule et l'épididyme. L'épididyme est l'organe qui coiffe le testicule. On distingue 3 régions: la tête, le corps et la queue. Le passage des spermatozoïdes dans l'épididyme est nécessaire à l'acquisition de la mobilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Cependant, ce pouvoir fécondant ne s'exprimera qu'après des modifications des protéines membranaires des spermatozoïdes au cours du transit dans les voies génitales femelles. Le testicule est suspendu dans le sac scrotal par le cordon spermatique qui contient le canal déférent, des vaisseaux sanguins et lymphatiques, et des fibres nerveuses.

## B. Physiologie et fonctions du testicule

Le testicule est composé de deux compartiments distincts (Figure 11): les tubes séminifères, lieu de la spermatogenèse, et l'interstitium, entre les tubes séminifères, siège de la stéroïdogénèse. Les tubes séminifères représentent 90 % du volume testiculaire.

Les deux fonctions testiculaires, endocrine et exocrine, sont sous le contrôle d'hormones et de molécules synthétisées à différents niveaux : hypothalamique, hypophysaire et testiculaire (Themmen and Huhtaniemi, 2000; Amory and Bremner, 2001; Huhtaniemi and Bartke, 2001; Plant and Marshall, 2001; McLachlan *et al.*, 2002; Huhtaniemi, 2003; Holdcraft and Braun, 2004; Walker and Cheng, 2005).

En réponse à la sécrétion pulsatile de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) par l'hypothalamus, l'antéhypophyse sécrète les gonadotropines : la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone). Ces deux hormones vont agir sur le testicule pour réguler ses fonctions.

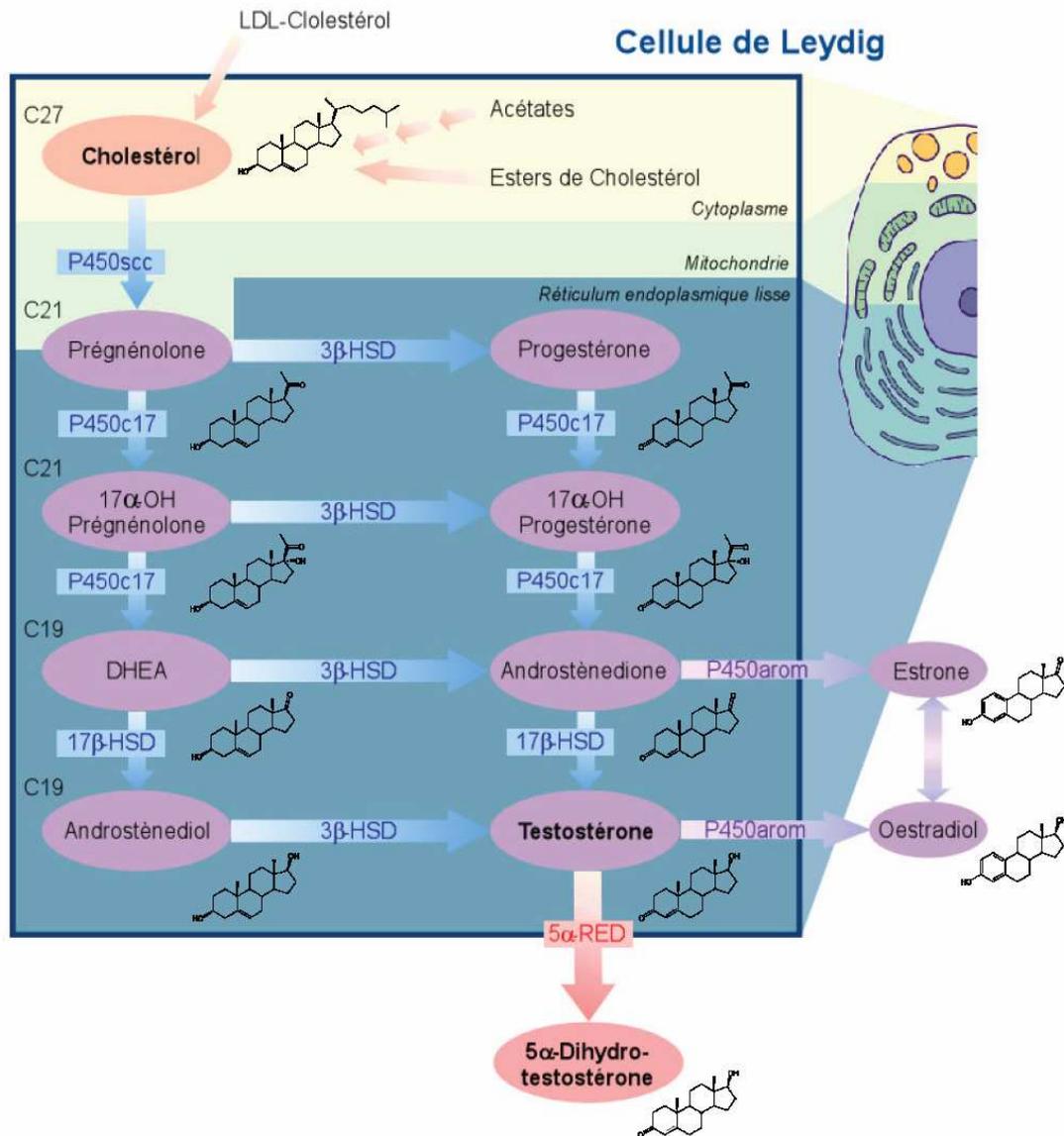


Figure 12: Synthèse de la testostérone par les cellules de Leydig

P450scc: Cytochrome P450scc

3β-HSD: 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase

P450c17: Cytochrome P450c17 (activités 17α-hydroxylase et C17-20-lyase)

17β-HSD: 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase

P450 arom: P450 aromatasase

5α-RED: 5α-réductase

## 1) Compartiment interstitiel et fonction endocrine

### a) L'interstitium

L'interstitium est composé d'un tissu conjonctif lâche. Ce tissu est riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il contient plusieurs types cellulaires tels que les cellules de Leydig, les fibroblastes et les macrophages (Leeson, 1963).

Chez le rat, les cellules de Leydig sont les cellules majoritaires de l'interstitium. Elles représentent moins de 5 % des cellules du testicule. Ces cellules sont de forme polygonale et contiennent un noyau ovoïde avec un nucléus caractéristique. Les cellules de Leydig ont un rôle endocrine. Elles possèdent d'ailleurs une ultrastructure caractéristique des cellules synthétisant des stéroïdes: présence de nombreuses gouttelettes intra-cytoplasmiques de cholestérol, d'un réticulum endoplasmique lisse abondant et des mitochondries à crêtes tubulaires (Christensen and Fawcett, 1966). Dès la puberté, les cellules de Leydig produisent une quantité importante de testostérone. La testostérone a un rôle déterminant sur le développement des caractères sexuels secondaires mâles. La testostérone agit également au niveau des tubes séminifères: elle a un rôle essentiel pour la réalisation des méioses des cellules germinales (Singh *et al.*, 1995)

Les macrophages sont capables de phagocyter les cellules de Leydig dégénérées.

Les vaisseaux lymphatiques permettent le drainage lymphatique du testicule. Des artéριοles et des capillaires sanguins sont également présents, ils délivrent notamment les facteurs de régulation endocrine, comme la LH et FSH mais aussi, les IGF et facteurs de croissance, aux cellules cibles du testicule.

### b) La stéroïdogénèse

Les cellules de Leydig sont le siège de la biosynthèse de la testostérone (Figure 12). Cette biosynthèse nécessite l'intervention d'un certain nombre d'enzymes agissant en cascade à partir d'un précurseur commun à tous les stéroïdes, le cholestérol (Saez 1994). Dans l'organisme, il existe différentes sources de cholestérol. Celui-ci provient soit des lipoprotéines circulantes HDL et LDL (High et Low Density Lipoprotein) (Morris and Chaikoff, 1959; Benahmed *et al.*, 1981), soit des esters de cholestérol qui sont contenus dans

les gouttelettes lipidiques intracellulaires, soit via une synthèse endogène à partir d'acétate (Hou et al., 1990).

Le transport du cholestérol du cytoplasme vers la membrane mitochondriale, est une étape clef. La membrane mitochondriale est le lieu de la première réaction enzymatique de la stéroïdogénèse. Plusieurs protéines interviennent dans le transport du cholestérol. La plus importante est la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) (Clark *et al.*, 1994).

La transformation du cholestérol en testostérone nécessite cinq étapes. La première étape est une étape permet la conversion du cholestérol en prégnénolone. Cette étape est assurée par le cytochrome P450<sub>sc</sub>, qui est situé dans la membrane interne de la mitochondrie et qui induit la coupure de la chaîne latérale du cholestérol (O'Shaughnessy and Murphy, 1991). La prégnénolone est ensuite transportée dans le réticulum endoplasmique lisse où elle est convertie en progestérone par la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase ou 3 $\beta$ -HSD. Ensuite, le cytochrome P450<sub>c17</sub> va transformer successivement la progestérone en 17 $\alpha$ -OH-progestérone puis, en androstènedione. Enfin, cette dernière est convertie en testostérone par la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD). Cette voie de biosynthèse  $\Delta$ 4 (prégnénolone-progestérone-androstènedione-testostérone) fut la première identifiée chez le rat (Slaunwhite and Samuels 1956) et elle est considérée comme la voie préférentielle chez cette espèce (Bell *et al.*, 1968). Il existe une voie parallèle ( $\Delta$ 5), prédominante chez l'homme (Hammar and Petersson, 1986), conduisant à la formation d'un intermédiaire, la déhydroépiandostérone (DHEA) à partir de la prégnénolone. L'importance relative de ces deux voies varie en fonction de l'espèce et du statut hormonal du mâle.

Dans la plupart des espèces, la testostérone est l'androgène majoritairement secrété par les cellules de Leydig. Ainsi, chez les rongeurs, les testicules sont la source principale des androgènes circulant dans le sang, alors que chez l'homme, ils proviennent à la fois des testicules et du cortex surrénal. Chez l'homme, la DHEA et l'androstènedione, sécrétées par le cortex surrénal (Baird *et al.*, 1969), sont des précurseurs à faible pouvoir androgénique et peuvent être convertis en testostérone au niveau de tissus extra-gonadiques. La testostérone ainsi produite par le cortex surrénal ne représente que 10 % de la quantité totale de testostérone circulante.

La testostérone et l'androstènedione peuvent être métabolisées de façon irréversible en oestrogènes sous l'action d'un cytochrome P450 aromatasase, codée par le gène Cyp19 (Conley

and Hinshelwood, 2001). Il a été montré que le testicule est responsable de 20 % de la production totale d'oestrogènes, la majeure partie étant produite au niveau des tissus périphériques (graisse, foie, reins, tissu osseux ou cerveau) (Payne and O'Shaughnessy, 1996; Simpson, 2000). Chez le rat, la P450arom est exprimée dans le testicule, non seulement au niveau des cellules de Leydig et de Sertoli mais, également au niveau des cellules germinales (Levallet *et al.*, 1998; Lambard *et al.*, 2005). De la naissance à la puberté, la source première d'oestrogènes dans le testicule est la cellule de Sertoli (Van der Molen *et al.*, 1981). Après la puberté, l'expression de l'aromatase diminue et disparaît. Ce sont les cellules de Leydig qui prennent alors le relai (Payne *et al.*, 1976; Carreau *et al.*, 1999).

La testostérone peut également être métabolisée de façon irréversible en un dérivé plus actif, la dihydrotestostérone (DHT), par la 5 $\alpha$ -réductase (Mahendroo and Russell, 1999). La production de DHT est réalisée dans certains tissus où la 5 $\alpha$ -réductase est présente comme dans les tissus reproducteurs mâles et le foie (Normington and Russell, 1992).

La testostérone et ses métabolites ont de multiples fonctions physiologiques au niveau de l'appareil reproducteur mâle.

### c) Rôle de la testostérone et de ses dérivés

La testostérone est une hormone ayant un grand nombre de fonctions. Elle agit en se fixant aux récepteurs aux androgènes (AR) à différents niveaux. Elle agit localement au niveau du testicule, sur les cellules de Sertoli afin de participer à la régulation de la spermatogenèse. Elle permet également la différenciation, la croissance et le fonctionnement des organes reproducteurs et elle est responsable des caractères sexuels secondaires (pilosité, mue de la voix, musculature,...). Elle est aussi connue pour stimuler l'érythropoïèse. Elle joue un rôle essentiel au cours de l'embryogenèse. Elle exerce sa propre régulation via un rétrocontrôle sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse.

Dans les cellules de Sertoli, la testostérone va se lier à son récepteur, le récepteur aux androgènes. Cette liaison est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse. Elle permet notamment le déclenchement et l'entretien de la spermatogenèse et inhibe l'apoptose des cellules germinales (Singh *et al.*, 1995). L'ABP permet de concentrer la testostérone dans le tube séminifère en assurant le transport des androgènes. Elle agit sur les récepteurs des androgènes localisés dans la cellule de Sertoli et stimule la maturation des cellules germinales

(De Gendt *et al.*, 2004). L'ABP (avec ou sans ligand) peut également se lier à des récepteurs situés sur la membrane cytoplasmique des cellules germinales (Frairia *et al.*, 1992; Porto *et al.*, 1992). Elle contribue indirectement au maintien de la spermatogenèse. Elle semble être impliquée dans les stades précoces de la spermatogenèse, en particulier lors de la prolifération des spermatogonies et lors de la méiose. Il a été démontré que des taux relativement modérés de testostérone dans le testicule sont suffisants pour maintenir une spermatogenèse (Zhang *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que les récepteurs aux androgènes, qui sont localisés sur les cellules de Sertoli, jouent un rôle clé pour la méiose des cellules germinales et qu'ils sont absolument indispensables pour la stéroïdogénèse mâle (Chang *et al.*, 2004; De Gendt *et al.*, 2004).

Dans une revue parue en 2010, Zhou rapporte les rôles des récepteurs aux androgènes (AR) qui ont été révélés via le KO total (Yeh *et al.*, 2002) ou les KO spécifiques comme le KO Sertoli-spécifique (de Gendt *et al.*, 2004). Le KO global du récepteur aux androgènes (ARKO) rend les mâles infertiles. L'extérieur du tractus de ces mâles est féminisé (courte distance ano-génitale, semblant de clitoris à la place du pénis et scrotum ; vagin). Et, ils n'ont ni vas deferens, ni épидидymes, ni vésicules séminales, ni prostate. L'analyse histologique montre des testicules montrant que la spermatogenèse est arrêtée précocement au stade spermatocytes pachytènes. Ce KO global des AR montre qu'ils sont essentiels pour le développement des organes reproducteurs mâles et la spermatogenèse, bien qu'ils ne soient pas requis pour la formation des testicules.

Contrairement aux mâles ARKO, les mâles invalidés pour les AR, spécifiquement dans les cellules de Sertoli (souris SCARKO ; Chang *et al.*, 2004 ; De Gendt *et al.*, 2004), présentent un développement du tractus interne normal. Les testicules présentent une taille réduite. L'analyse histologique de ces testicules montre une diminution du diamètre des tubes séminifères. La spermatogenèse n'est pas complète, la maturation des cellules germinales s'arrête au stade spermatocytes primaires diplotènes. Parfois, elle va jusqu'aux spermatocytes secondaires et plus rarement au stade spermatides rondes (De Gendt *et al.*, 2004 ; Holdcraft and Braun, 2004). Chez ces mâles, le nombre de cellules de Sertoli est normal (De Gendt *et al.*, 2004 ; Tan *et al.*, 2005), indiquant que les effets des androgènes sur les cellules de Sertoli ne sont pas dus à la voie de signalisation des AR. Des analyses plus poussées ont montré que les androgènes, agissant via les AR sertoliens, régulent le microenvironnement de l'épithélium séminifère en influençant un grand nombre de gènes dans les cellules de Sertoli (Denolet *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2006 ; Eacker *et al.*, 2007).

La génération adulte des cellules de Leydig n'est ni perturbé dans les souris ARKO, ni dans les souris SCARKO (De Gendt *et al.*, 2005).

Les oestrogènes jouent un rôle important dans la reproduction et la fertilité (Akingbemi, 2005). Comme la testostérone, les oestrogènes agissent via des récepteurs nucléaires, les récepteurs aux oestrogènes, ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Kuiper *et al.*, 1997). Chez le rat mâle adulte, ces récepteurs sont exprimés au niveau des cellules de Leydig (ER $\alpha$ ), des cellules de Sertoli (ER $\beta$ ) ainsi que dans les cellules germinales (ERs) (Pelletier *et al.*, 2000). De plus, de nombreuses études ont montré le rôle des oestrogènes en tant que modulateurs des effets des gonadotrophines et de la testostérone au niveau des fonctions testiculaires (Carreau *et al.*, 1999). Des modèles de souris KO pour le gène ER $\alpha$ , ER $\beta$ , ou double KO (ERKO) (Lubahn *et al.*, 1993; Eddy *et al.*, 1996), ainsi que pour le gène de la P450 aromatase (ArKo), ont également montré l'importance des oestrogènes pour la spermatogenèse et la fertilité (O'Donnell *et al.*, 2001; Hess, 2003). De plus, en 2008, Toda et ses collaborateurs ont montré un rôle critique du récepteur Esr1 (récepteur aux oestrogènes  $\alpha$ ) dans la régulation de la réabsorption du fluide testiculaire au niveau des canaux efférents. Les oestrogènes sont également impliqués dans le développement du système nerveux central, dans l'homéostasie du squelette et du système cardio-vasculaire. Ils sont nécessaires à la masculinisation du cerveau et impliqués dans le comportement sexuel et ils ont également des effets sur le foie et le tissu adipeux (Simpson, 2000).

La dihydrotestostérone (DHT) et la testostérone agissent via le même récepteur (AR) mais n'ont pas les mêmes fonctions physiologiques. La DHT possède une affinité beaucoup plus importante pour les ARs que la testostérone. Le complexe DHT-AR semble être plus stable et plus rapidement transporté jusqu'au noyau. Il est alors capable d'induire une réponse plus efficace que ne le fait la testostérone (Zhou *et al.*, 1995). La DHT est impliquée dans le développement des organes génitaux externes lors de l'embryogenèse, ainsi que dans la pilosité et la croissance prostatique.

#### d) Transport et mécanisme d'action des androgènes

Une fois synthétisées, les hormones stéroïdes sont transportées dans le sang jusqu'aux différents organes cibles. Peu solubles, la majorité des hormones stéroïdes sont liées à des

protéines plasmiqnes telles que la Sex Hormone Binding Globuline (SHBG) et l'albumine. On trouve également l'ABP (Androgen Binding Protein), qui est sécrétée par la cellule de Sertoli. Cette protéine est sécrétée grâce à un peptide signal de sécrétion (Joseph *et al.*, 1987), c'est une protéine de transport des androgènes. Seulement 2 à 3 % de la testostérone circulant dans le sérum se retrouve sous sa forme libre. Étant un stéroïde, la testostérone pénètre dans les cellules cibles par diffusion à travers les membranes cellulaires. Les effets des androgènes sont exercés par le biais d'un récepteur nucléaire qui, après liaison de la testostérone ou de la DHT, se fixe sur des séquences d'ADN spécifiques situées en amont de gènes cibles, et active la transcription de ces gènes.

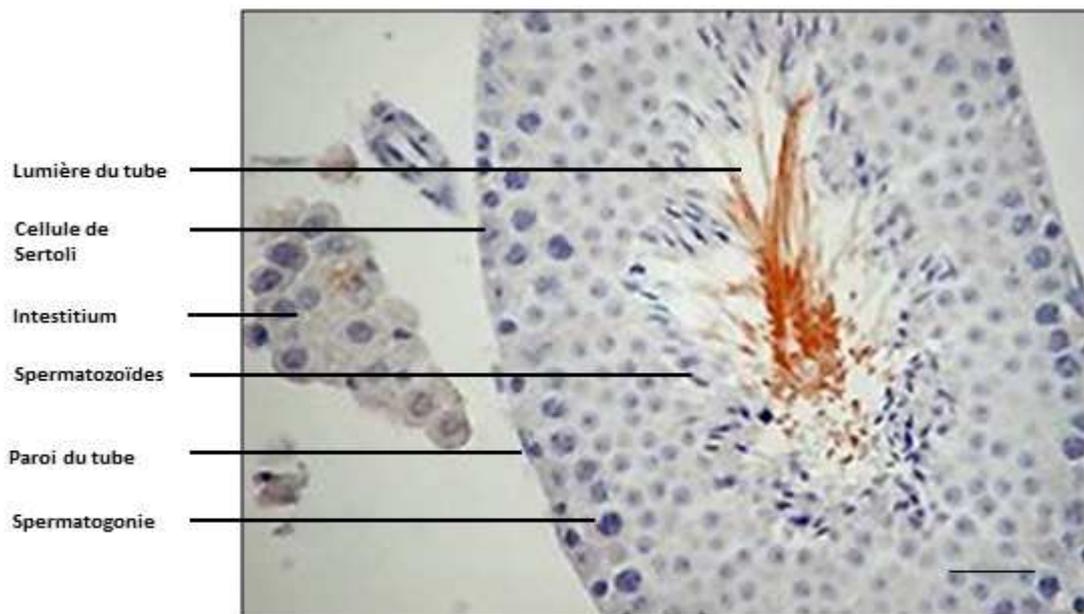


Figure 13: Coupe transversale d'un tube séminifère de souris adulte  
Coloration à l'hématoxyline. Barre d'échelle: 25µm.  
(D'après:<http://www.inrp.fr>)

### e) Régulation de l'activité endocrine

La LH est l'hormone qui contrôle la fonction endocrine du testicule en agissant sur ses récepteurs, situés à la surface des cellules de Leydig. Elle stimule la production de testostérone.

Il existe une interaction très forte entre les tubes séminifères et le compartiment interstitiel, au travers d'un dialogue entre les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig.

Les oestrogènes issus de l'aromatisation de la testostérone et produits par les cellules de Leydig et de Sertoli, régule également la sécrétion et l'action de la GnRH. L'oestradiol agit au niveau de l'hypothalamus pour inhiber la sécrétion de GnRH et au niveau de l'adénohypophyse pour inhiber la sécrétion des gonadotropines stimulée par la GnRH (Hayes *et al.* 2000). De plus, de nombreuses études suggèrent que le testicule et plus spécifiquement les cellules de Leydig sont la cible des oestrogènes. Il a été montré que les récepteurs aux oestrogènes (ERs) sont présents dans les cellules de Leydig (Pelletier *et al.*, 2000; Lambard *et al.*, 2005). Il est supposé que les oestrogènes ont une influence inhibitrice sur la stéroïdogénèse des cellules de Leydig matures, de façon directe en inhibant certaines enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la testostérone ou en limitant le développement et la prolifération des cellules de Leydig (Abney, 1999).

Les macrophages jouent un rôle important dans la régulation de la fonction endocrine des cellules de Leydig (Hales, 1996). Ces cellules sont capables d'inhiber la synthèse des stéroïdes par le biais de cytokines (IL-1) et de TNF-alpha, ainsi que de réguler la prolifération et le développement des cellules de Leydig (via des cytokines et facteurs de croissance).

## 2) Compartiment tubulaire et spermatogénèse

### a) Les tubes séminifères

Les tubes séminifères (Figure 13) contiennent des cellules germinales à différents stades de leur développement ainsi que des cellules somatiques, les cellules de Sertoli. Cette association de cellules germinales et de cellules de Sertoli forme l'épithélium séminifère.

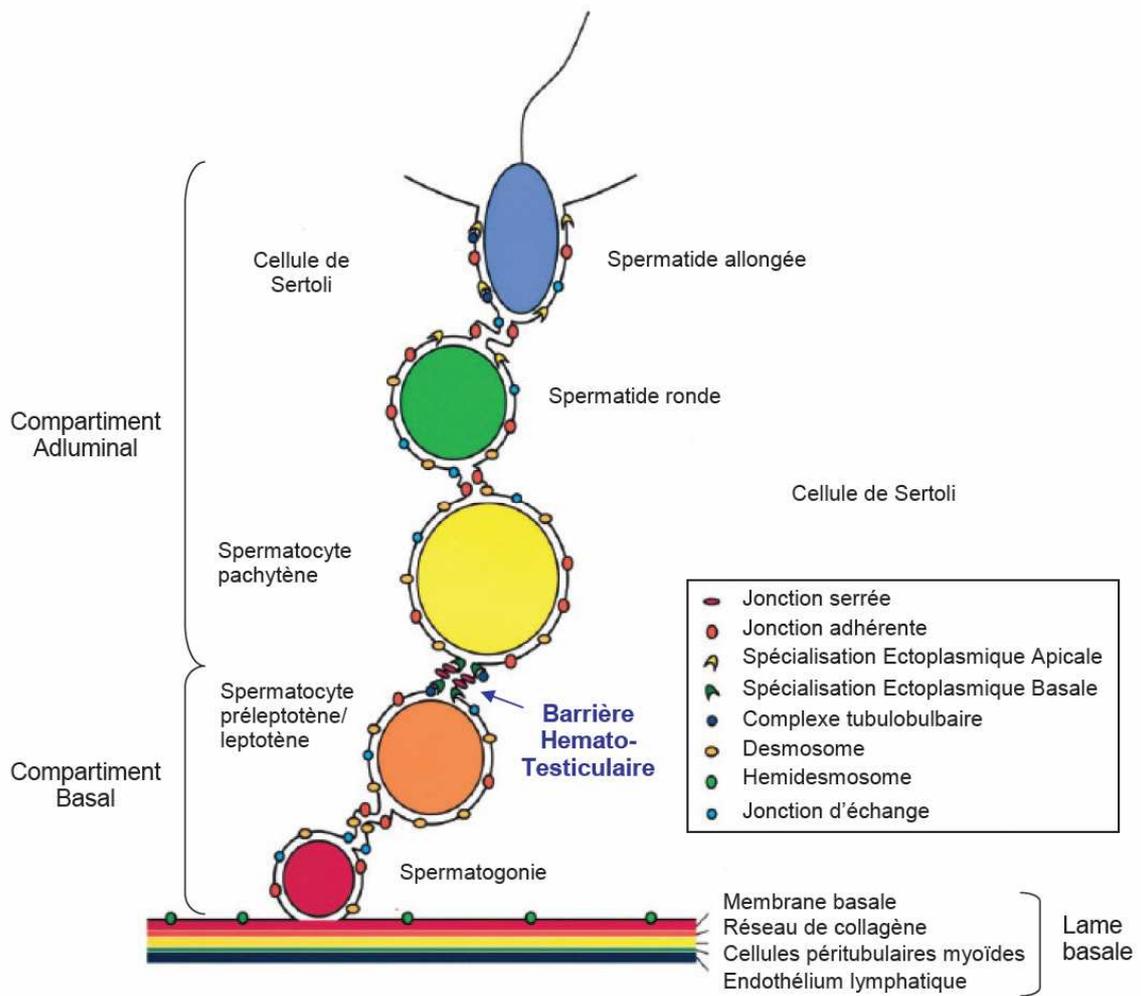


Figure 14: Schéma des différentes jonctions spécialisées du tube séminifère (d'après Mruk and Cheng, 2004)

Les cellules germinales sont hautement organisées dans l'épithélium séminifère. Les cellules les moins différenciées (spermatogonies) sont situées du côté basal du tube séminifère, vers la lame basale et les cellules les plus matures (spermatides allongées) sont situées du côté apical du tube séminifère, vers la lumière. L'épithélium séminifère repose sur la lame basale du tube séminifère. Cette lame basale est constituée de tissus conjonctifs et d'une fine couche de cellules myoïdes périvitubulaires (Maekawa *et al.*, 1996). Ces cellules sont des cellules contractiles qui participent à la propulsion et à l'évacuation des spermatozoïdes qui ne sont pas mobiles dans le testicule. Les cellules myoïdes périvitubulaires jouent aussi un rôle de relai, entre les cellules de Leydig et les tubes séminifères. En effet, elles médient les effets de la testostérone ainsi que d'autres hormones et facteurs de croissance.

Le facteur PModS est sécrété par les cellules myoïdes périvitubulaires. L'activité de ce facteur a été montrée comme influençant les fonctions des cellules de Sertoli, une fois qu'elles sont différenciées (Norton *et al.*, 1992 et 1994). La production du PModS est sous le contrôle des androgènes (Verhoeven *et al.*, 1992). PModS a également été montré comme régulateur de la production de lactate, la sécrétion d'inhibine et l'expression des ARNm de la transferrine (Mullaney *et al.*, 1994; Skinner *et al.*, 1989; Norton and Skinner, 1992). En 1995, Chaudhary et ses collaborateurs ont montré que le PModS promeut la différenciation des cellules de Sertoli. PModS induit l'expression de la transferrine via activation précoce de *c-fos* (Whaley *et al.*, 1995).

#### b) Les jonctions intercellulaires spécialisées

Les cellules sont en contact entre elles et avec la matrice par l'intermédiaire de jonctions spécialisées. Ces jonctions permettent aux cellules de communiquer entre elles et de communiquer avec leur environnement.

Il existe trois types de jonctions (Figure 14) (Cheng and Mruk, 2002; Mruk and Cheng, 2004):

- Les jonctions serrées
- Les jonctions adhérentes

- Les jonctions d'échanges.

Dans le testicule, les jonctions serrées sont créées par le contact de deux cellules de Sertoli à proximité de la membrane basale. Ces jonctions séparent l'épithélium séminifère en compartiment basal et en compartiment adluminal. C'est cette jonction qui constitue la barrière hémato-testiculaire, créant ainsi le microenvironnement nécessaire au développement des cellules germinales. Ces jonctions sont composées de plusieurs molécules (Setchell, *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, 2008). On trouve les occludines (chez rats et souris, pas chez l'Homme ; Moroi *et al.*, 1998), claudines dont la claudine-11 (Hellani *et al.*, 2000), l'intégrine  $\alpha 6 \beta 1$  (Salanova *et al.*, 1995 et 1998) et des molécules d'adhésion jonctionnelles JAMs (Mruk *et al.*, 2004) associées à d'autres protéines telles que les Zonula occludens (ZO) 1 et 2, cingulines et symplekines entre autres.

Concernant les jonctions adhérentes, il en existe de plusieurs types. Ces jonctions permettent l'interaction entre protéines d'adhésion et cytosquelette avec d'autres cellules ou la matrice extra-cellulaire (MEC). On les distingue selon leur mode d'attachement. On trouve des jonctions adhérentes et d'adhésion focale, celles-ci utilisent des filaments d'actine au niveau de leur site d'attachement. On trouve aussi des desmosomes et hémidesmosomes, qui eux utilisent des filaments intermédiaires. Les protéines impliquées dans ces jonctions sont des cadhérines, des caténines, des intégrines et des vinculines.

Au niveau testiculaire, on retrouve également deux types de jonctions adhérentes modifiées, appelées spécialisation ectoplasmique et complexe tubulobulbaire. La spécialisation ectoplasmique est une jonction qui s'établit entre les cellules germinales en développement et les cellules de Sertoli (Russell, 1977). De récentes études ont montré qu'il en existe deux types, désignées par basale et apicale. Ces jonctions sont importantes pour les étapes de la spermiogenèse et probablement dans la stabilisation d'autres jonctions telles que les jonctions serrées. Le complexe tubulobulbaire se retrouve entre les cellules de Sertoli au niveau des jonctions serrées mais également entre les cellules de Sertoli et les spermatozoïdes matures prêts à être libérés dans la lumière du tube séminifère.

Enfin, les jonctions d'échange ou jonctions gap peuvent s'établir soit entre les cellules de Sertoli elles-mêmes, soit entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Ces jonctions

permettent l'échange d'ions et de petites molécules entre deux cellules adjacentes. Les protéines impliquées dans ces jonctions sont les connexines.

La connexine Cx43 est la connexine principale retrouvée dans le testicule (Pelletier, 1995 ; Batias *et al.*, 2000). Les connexines sont formées de chaînes polypeptidiques qui traversent la membrane. Elles s'assemblent en complexes de six unités pour former des connexons avec des pores de 2 nm de diamètre pour le passage des petites molécules.

La connexine Cx33 est spécifiquement localisée dans les tubes séminifères au niveau du compartiment basal. La connexine Cx43 est localisée dans l'interstitium et dans les tubes séminifères (Fiorini *et al.*, 2006). Les Cx33 inhibent la formation de jonctions communicantes en inhibant les Cx43 via la formation de complexes qui restent bloqués dans le cytoplasme (Fiorini *et al.*, 2004).

L'invalidation de la Cx43 ciblée dans les cellules de Sertoli engendre une réduction dramatique de la taille du testicule avec arrêt de la spermatogenèse au stade spermatogonies (Brehm *et al.*, 2007).

Il existe donc de nombreuses interactions qui s'établissent entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

### c) La spermatogenèse

La spermatogenèse est l'ensemble des phénomènes (mitoses, méiose et spécialisation morphologique et fonctionnelle) qui, des spermatogonies, cellules souches diploïdes à 2n chromosomes, aboutissent aux spermatozoïdes, gamètes masculins haploïdes à n chromosomes. Elle a lieu dans les tubes séminifères.

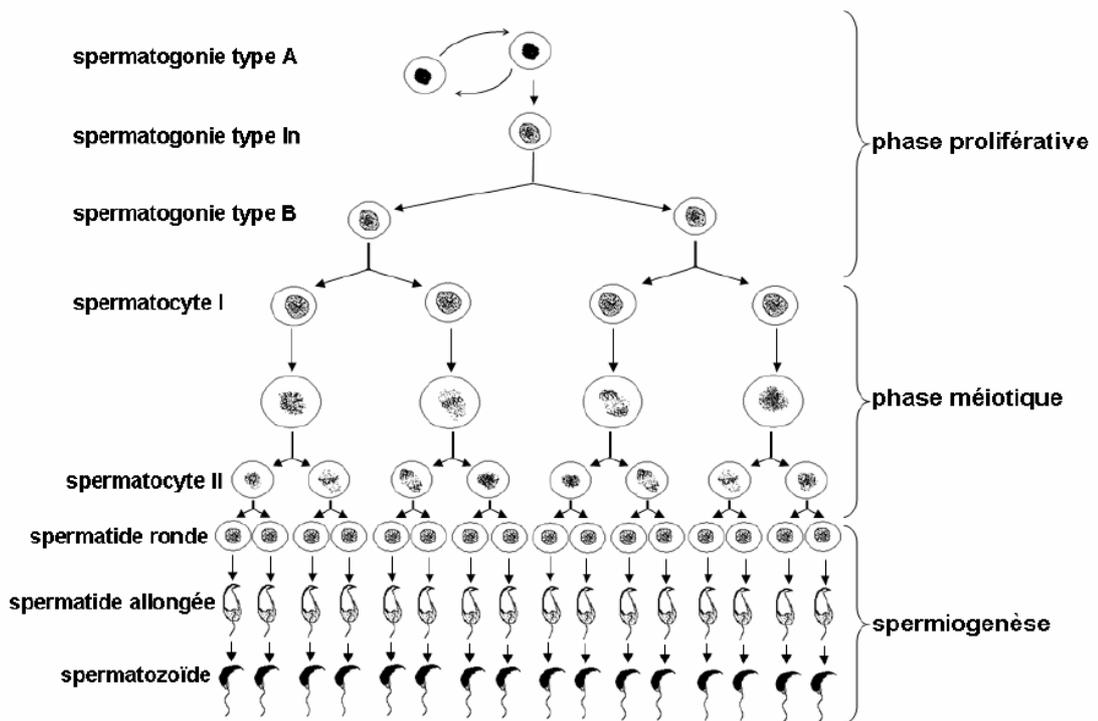


Figure 15: Déroulement de la spermatogénèse chez la souris

Chez les mammifères, sur le plan fonctionnel, la spermatogenèse comprend trois phases (Figure 15): la phase proliférative, la phase méiotique et la spermiogenèse (Bellve *et al.*, 1977; Jégou, 1995).

- La phase proliférative:

Elle met en jeu de nombreux stades intermédiaires de différenciation des spermatogonies de type A (de Rooij, 2001; Dym, 1994).

Les spermatogonies sont localisées le long de la membrane basale du tube séminifère. Un certain nombre de spermatogonies de type A se divisent par mitose. Une partie de ces cellules cesse de se multiplier et se différencie en spermatogonies de type B. La division mitotique finale des spermatogonies de type B donne naissance aux spermatocytes primaires préleptotènes.

- La phase méiotique:

Le passage de  $2n$  à  $n$  chromosomes se produit au cours de cette phase. Les spermatocytes primaires se divisent en spermatocytes secondaires. Ceux-ci se différencient en spermatides rondes haploïdes. La méiose est une succession de deux divisions cellulaires consécutives. Tout d'abord, il y a une première division méiotique, elle est appelée division réductionnelle. Elle comporte une prophase I -qui se subdivise en 5 stades: leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse- puis, une métaphase I, une anaphase I et une télophase I. La deuxième division méiotique est dite division équationnelle. Elle a lieu après une intercinèse très courte, superposée à la prophase II, elle-même très rapide. A l'issue de la télophase II, on obtient deux cellules filles à  $n$  chromosomes, ce sont des spermatides rondes.

- La spermiogenèse:

Les spermatides rondes immatures vont ensuite se différencier en spermatozoïdes. Ce processus implique plusieurs changements morphologiques : la formation d'un flagelle pour permettre aux spermatozoïdes de se mouvoir, l'élimination de « l'excès » de cytoplasme, la réorganisation des organites cytoplasmiques tels que la condensation du noyau qui va occuper la tête du spermatozoïde (l'ADN se condense, du fait du changement des histones somatiques par des histones spécifiques, d'abord des protéines intermédiaires puis, la protamine), le rassemblement des vésicules de l'appareil de Golgi pour former l'acrosome qui contient des

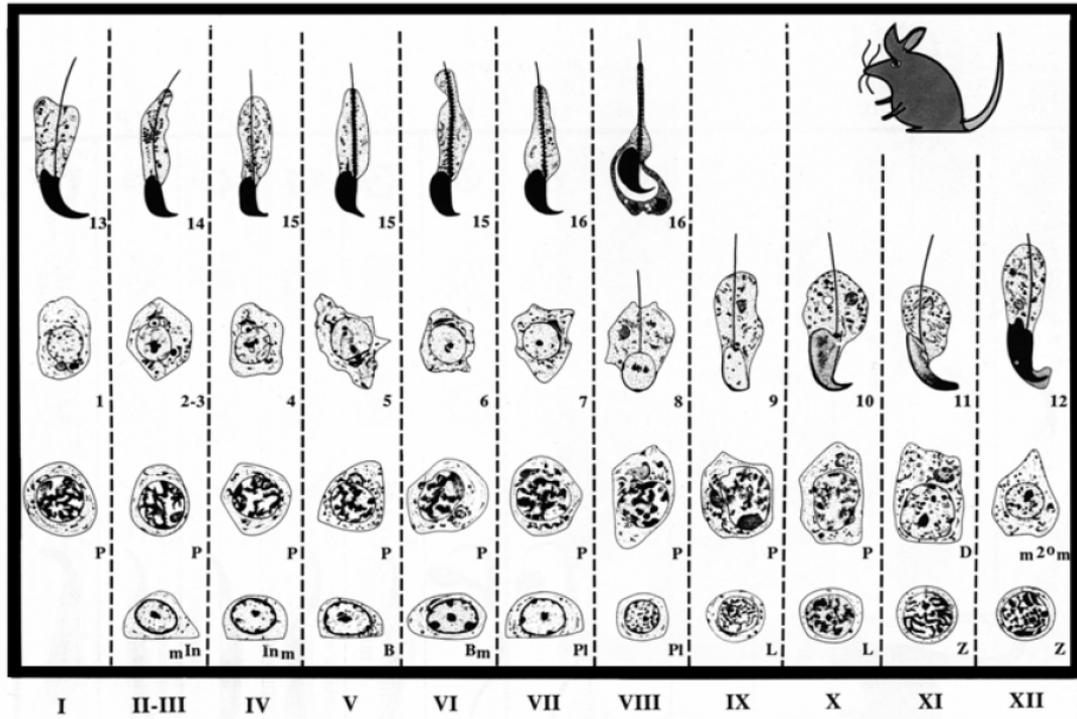


Figure 16: Le cycle de l'épithélium séminifère chez la souris  
 (d'après Russell et al., 1990)

enzymes protéolytiques nécessaires aux spermatozoïdes lors de l'interaction avec l'ovocyte, et le regroupement des mitochondries au niveau de la pièce intermédiaire.

La dernière étape consiste en une translocation des spermatozoïdes de la surface adluminale de l'épithélium à la lumière du tube, c'est la spermiation.

Des événements de dissociation et d'association des jonctions serrées et adhérentes entre les cellules de Sertoli, et des jonctions adhérentes entre les cellules de Sertoli et cellules germinales se succèdent, permettant le mouvement des cellules germinales en développement le long de l'épithélium séminifère. La dynamique de ces jonctions serrées est en étroite relation avec les stades de l'épithélium séminifère : les jonctions s'ouvrent et se ferment entre les stades X et XI. Ce mécanisme est essentiel à la migration des spermatocytes du compartiment basal vers le compartiment apical du tube séminifère.

De plus, les cellules de Sertoli sécrètent des protéases et des facteurs de croissance, qui jouent un rôle clef dans la migration des cellules germinales vers le pôle apical de l'épithélium séminifère (Longin *et al.*, 2001; Mruk and Cheng, 2004; Xia *et al.*, 2005). Il semblerait également que les cellules germinales puissent contrôler leur propre migration en régulant la synthèse des protéases par les cellules de Sertoli (Longin *et al.*, 2001).

Dans les tubes séminifères, on observe plusieurs types d'association de cellules germinales caractéristiques établissant les stades de l'épithélium séminifère. Tous les types de cellules germinales sont présents dans l'épithélium séminifère : les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides. Les cellules germinales sont hautement organisées : elles forment une série d'associations cellulaires ou stades de l'épithélium séminifère de telle manière qu'un même stade donné occupe la totalité d'une section transversale d'un tube séminifère (Russell *et al.*, 1990). Chez la souris (Figure 16), il existe douze stades dans le cycle de l'épithélium séminifère, ces stades sont notés de I à XII (Oakberg, 1956) et un cycle dure 8,8 jours (Russell *et al.*, 1990). Chez le rat, on compte 14 stades (Leblond and Clermont 1952) et un cycle dure 12,8 jours. La durée d'un cycle de l'épithélium séminifère correspond au temps nécessaire à une cellule germinale pour devenir une cellule plus différenciée du même stade du cycle de l'épithélium séminifère. Ces stades se déroulent de façon séquentielle le long de l'axe longitudinal du tube séminifère. La durée d'un cycle spermatogénique est également variable en fonction de l'espèce, elle est de 49 jours chez le rat et de 35 jours chez

la souris (Clermont, 1972). Ces cycles spermatogéniques sont répétés, formant des « vagues » successives.

Pendant la phase proliférative, on trouve les spermatogonies de type A. Elles sont réparties dans la totalité des stades. Les spermatogonies de type intermédiaires (In) sont présentes aux stades II-III et IV. Les spermatogonies de type B sont quant à elles localisées aux stades V et VI. De plus, toutes les cellules germinales associées à la phase proliférative sont situées du côté basal du tube séminifère. Elles sont en contact étroit avec la lame basale.

Pendant la phase méiotique, on trouve différents types de spermatocytes primaires. Les spermatocytes préleptotènes sont présents aux stades VII-VIII, les spermatocytes leptotènes aux stades IX-X, les spermatocytes zygotènes aux stades XI-XII, les spermatocytes pachytènes aux stades I à X et enfin, les spermatocytes diplotènes au stade XI uniquement. Les spermatocytes secondaires sont présents au stade XII. Les spermatocytes préleptotènes, leptotènes et zygotènes sont situés du côté basal du tube séminifère. Contrairement aux spermatogonies, ils sont moins excentrés et ne sont pas en contact avec la lame basale. Les autres spermatocytes forment la seconde couche qui se situe plus au centre du tube séminifère.

Pendant la spermiogénèse chez la souris, on distingue en fait 16 étapes et chaque étape est associée à un aspect caractéristique de l'acrosome des spermatides. Les spermatides associées aux étapes 1 à 8 sont rondes et celles associées aux étapes 9 à 16 sont en voie d'élongation. Les spermatides apparaissent à tous les stades de l'épithélium séminifère. A la fin de leur différenciation, les spermatides matures, les spermatozoïdes sont évacués dans la lumière du tube séminifère lors du processus de spermiation.

Dans l'épithélium séminifère, les spermatides des étapes 1 à 12 forment la troisième couche de l'épithélium séminifère alors que les spermatides des étapes 13 à 16 forment la quatrième et dernière couche (qui est la couche la moins excentrée).

Il a été établi qu'un phénomène de dégénérescence des cellules germinales s'effectue lors de la spermatogénèse. Ce phénomène limite le nombre de cellules germinales en développement, régulant ainsi le nombre de spermatozoïdes produits. De plus, cette dégénérescence permet de prévenir la formation de cellules germinales anormales lors de la spermatogénèse.

Il existe une interconnexion structurale et fonctionnelle très étroite entre les cellules de Sertoli et les cellules de la lignée germinale (Griswold, 1998; Mruk and Cheng, 2004). Les cellules de Sertoli influencent la différenciation, la prolifération, l'apoptose et l'activité physiologique des cellules germinales. Une même cellule de Sertoli communique avec plusieurs cellules germinales à différents stades de développement et doit donc pouvoir répondre à des besoins cellulaires différents selon l'étape de la spermatogenèse (mitose, méiose, spermiogenèse).

### 3) Les cellules de Sertoli

Tout au long de la spermatogenèse, les cellules germinales sont dépendantes d'une population de cellules somatiques : les cellules de Sertoli.

#### a) La cellule de Sertoli : une cellule polyvalente

En plus de ses fonctions de maintien de l'architecture de l'épithélium séminifère et de contrôle du bon déroulement de la spermatogenèse, la cellule de Sertoli assure de nombreuses autres fonctions. Elle sépare tout d'abord l'intérieur du tube séminifère de la circulation sanguine, fournissant ainsi un environnement adéquat pour la méiose et la spermiogenèse. Elle contrôle également, à l'intérieur du tube séminifère, la production de nutriments et de facteurs de croissance.

#### (1) Barrière hémato-testiculaire

Le contact entre les faces baso-latérales des cellules de Sertoli forme un complexe de jonctions continues essentiellement composé de jonctions serrées. Ces jonctions serrées apparaissent entre 10 et 16 jours après la naissance (Russell et Griswold, 1993). Elles créent une véritable séparation entre l'épithélium séminifère et le compartiment sanguin, on parle de barrière hémato-testiculaire. Cette barrière sépare le tube séminifère en deux compartiments, le compartiment basal et le compartiment apical. Les cellules du compartiment basal sont en contact avec le milieu extérieur du tube séminifère alors que les cellules du compartiment apical en sont isolées. La formation de cette barrière hémato-testiculaire permet de maintenir un environnement adéquat pour assurer le développement des cellules germinales. Cette barrière a un véritable rôle immunologique.

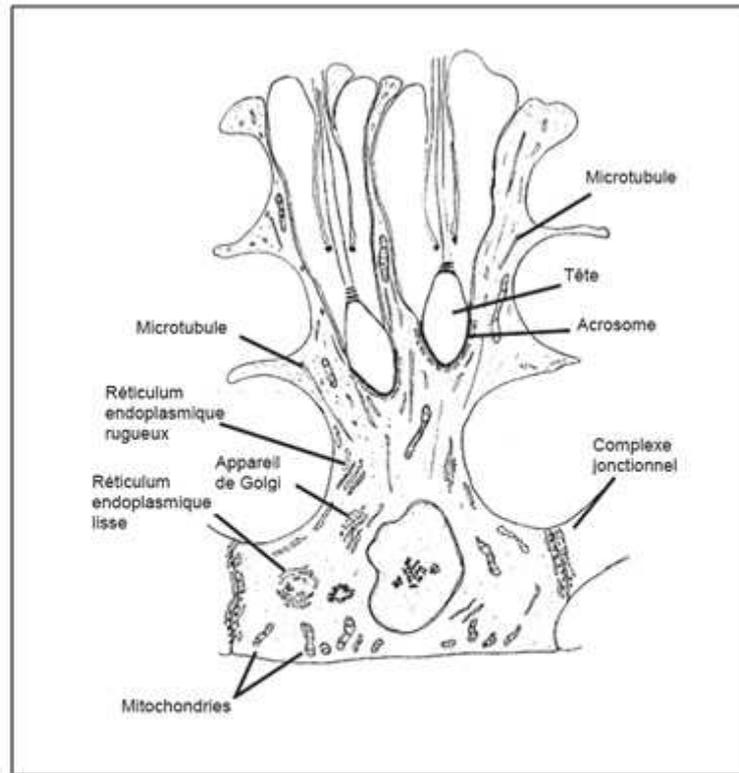


Figure 17: Représentation schématique d'une cellule de Sertoli

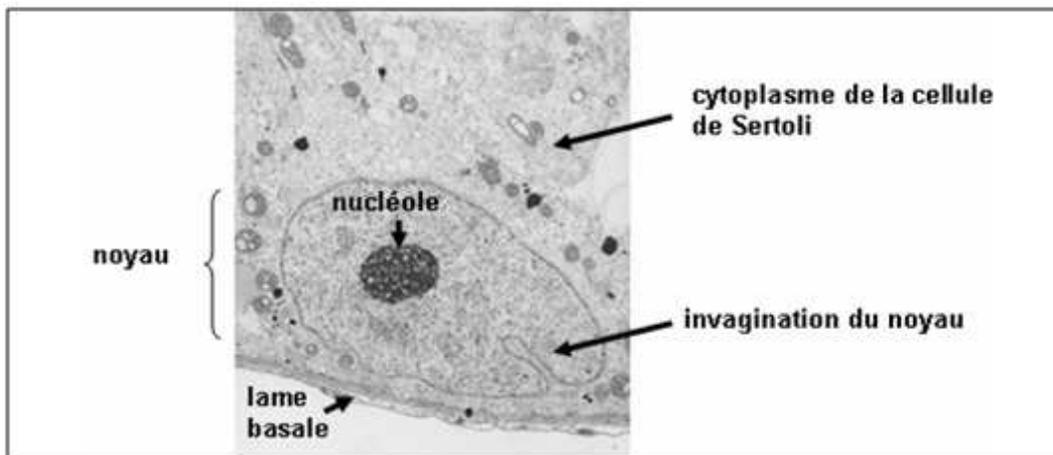


Figure 18: Observation en microscopie électronique d'une cellule de Sertoli de souris

La barrière hémato-testiculaire évolue en fonction du stade de l'épithélium séminifère. Les spermatogonies de type A et B ainsi que les spermatocytes préleptotènes et leptotènes sont localisés dans le compartiment basal. Entre les stades X et XI, les jonctions serrées s'ouvrent pour que les spermatocytes leptotènes rejoignent le compartiment apical. Toutes les autres cellules plus matures sont localisées dans le compartiment apical, notamment les spermatocytes zygotènes.

La barrière est permise grâce aux jonctions entre cellules de Sertoli dont la composition est détaillée précédemment.

## (2) Un rôle structural et de niche

La cellule de Sertoli est de forme pyramidale et repose sur la lame basale du tube séminifère (Figure 17) (Russell and Griswold, 1993). Elle constitue un véritable support pour les cellules germinales. Ses faces latérales sont en contact étroit avec environ cinq autres cellules de Sertoli et avec trente à cinquante cellules germinales (Weber *et al.*, 1983). Au cours du cycle de l'épithélium séminifère, la forme et le volume de la cellule de Sertoli varient de manière à optimiser l'adhérence des cellules germinales avec lesquelles elle est en contact.

Le noyau de la cellule de Sertoli est situé du côté basal du tube séminifère (Figure 18) (Russell and Griswold, 1993). Il a une forme irrégulière avec une invagination bien marquée. Son nucléole est très volumineux. Grâce à toutes ces caractéristiques, on peut aisément distinguer le noyau de la cellule de Sertoli des noyaux des cellules germinales, qui eux sont arrondis.

Les cellules de Sertoli, de par leur support physique et l'expression de nombreux facteurs, créent l'environnement optimal pour le développement des cellules germinales et l'auto-renouvellement des germinales souches, elles créent une véritable niche.

Lors de la phase proliférative de la spermatogenèse, les cellules germinales souches ou spermatogonies développent une forte activité mitotique pendant leur auto-renouvellement.

L'Erm (Ets related molecule) est un facteur de transcription spécifiquement exprimé dans les testicules par les cellules de Sertoli vers 3 à 4 semaines après la naissance semble être

indispensable à l'auto-renouvellement des cellules germinales. En effet, chez la souris, l'inactivation du gène *Erm* conduit à une disparition des cellules germinales souches après la première vague de spermatogenèse (Chen *et al.*, 2005; Hess *et al.*, 2006). *Erm* ne modifie pas la différenciation des cellules germinales mais son inactivation inhibe aussi bien l'auto-renouvellement que le maintien des cellules germinales souches conduisant à la stérilité des souris adultes (Chen *et al.*, 2005; Hess *et al.*, 2006).

Le GDNF est sécrété par les cellules de Sertoli, il initie le développement des cellules souches spermatogoniales, il joue un rôle important dans la régulation de l'évolution des spermatogonies vers la mitose ou la méiose (Meng *et al.*, 2000) et induit leur prolifération (Viglietto *et al.*, 2000; Tadokoro *et al.*, 2002). Il est impliqué dans le maintien de la niche.

### (3) Phagocytose

La cellule de Sertoli assure une triple fonction de phagocytose (Russell *et al.*, 1990). Son rôle premier est l'élimination des cellules germinales qui ont dégénéré au cours de la spermatogenèse. Elle a également pour rôle de phagocyter les reliquats de cytoplasme, appelés corps résiduels, qui se détachent des spermatozoïdes lors de la spermiation. Enfin, elle élimine les complexes de jonctions qui sont sans cesse renouvelés. Concernant son rôle premier (Nakanishi et Shiratsuchi, 2003), il a été montré que la cellule de Sertoli phagocyte les cellules germinales apoptotiques qui expriment de manière spécifique le phosphatidylsérine phospholipide (PS) qui est un marqueur caractéristique des cellules apoptotiques. La cause de l'induction de la phagocytose est controversée mais il semblerait que le signal inducteur serait donné par les cellules de Sertoli via la présence de la protéine Fas-ligand sur les cellules de Sertoli et de son récepteur Fas sur les cellules germinales. Pour la reconnaissance des PS sur les cellules apoptotiques, il semblerait que le récepteur SR-BI soit impliqué (récepteur scavenger de classe B type 1), des études *in vitro* ayant montré que l'utilisation d'un anticorps anti-SR-BI inhibe la phagocytose des cellules germinales apoptotiques par les cellules de Sertoli. La cellule de Sertoli est aussi impliquée dans la phagocytose des corps résiduels. Ces corps résiduels ont aussi des marqueurs apoptotiques comme l'ANXA5 (Blanco-Rodriguez *et al.*, 1999). Les cellules de Sertoli expriment deux types de récepteurs multi-ligands de classe B: SCARB1 et CD36 (Shiratsuchi *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 2005; Gillot *et al.*, 2005).

Des récepteurs appelés récepteurs TAM ont un rôle important pour la phagocytose par les cellules de Sertoli. Ils sont au nombre de trois : Tyro3, Axl et Mer. Ils ont rôle de pivot dans l'immunité innée testiculaire. Ils sont impliqués dans la promotion de la phagocytose des cellules apoptotiques et ils stimulent la maturation des cellules tueuses naturelles. Ce phénomène est dépendant des interactions et coopérations entre les récepteurs aux cytokines et les récepteurs TAM (Lemke *et al.*, 2008). Le KO des trois récepteurs TAM entraîne une stérilité, la spermatogenèse étant fortement perturbée (Chen *et al.*, 2008). Chez ces animaux, il y a mort des cellules germinales différenciées, du fait d'un défaut des cellules de Sertoli qui ne supportent plus la spermatogenèse (Lu *et al.*, 1999).

De plus, il a été montré que la transferrine dimérique est un modulateur de la phagocytose des corps résiduels, les dimères de transferrine inhibant *in vitro* l'ingestion des corps résiduels par les cellules de Sertoli (Yefimova *et al.*, 2008).

#### (4) Etablissement du ratio cellules germinales / cellules de Sertoli

Une vague d'apoptose des cellules germinales, indispensable pour le bon déroulement de la spermatogenèse chez l'adulte (Rodriguez *et al.*, 1997), se produit au cours de la première vague de la spermatogenèse (Wang *et al.*, 1998). Elle atteint un pic à l'âge de 10 à 13 jours après la naissance (Wang *et al.*, 1998), période pendant laquelle les cellules de Sertoli cessent de proliférer. Cette apoptose s'explique par le fait que le nombre de cellules germinales est fonction du nombre de cellules de Sertoli. L'établissement du ratio cellules germinales / cellule de Sertoli reflète le fait que les cellules de Sertoli ne peuvent soutenir qu'un nombre limité de cellules de la lignée germinale. Ceci est vrai dans toutes les espèces. Il a été montré que la réduction expérimentale du nombre de cellules de Sertoli dans les testicules de rat pré-pubères entraîne une diminution proportionnelle du nombre de spermatides rondes chez l'adulte sans affecter pour autant la spermatogenèse (Orth *et al.*, 1988).

#### b) Fonctions sécrétrices

L'activité de sécrétion de la cellule de Sertoli est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse (Russell and Griswold, 1993). Elle permet à la cellule de Sertoli de

communiquer directement et simultanément avec les cellules germinales. La cellule de Sertoli a un rôle prépondérant dans le contrôle de l'activité de l'épithélium séminifère. Elle est responsable d'une grande activité sécrétoire. Elle sécrète en particulier le fluide testiculaire, des nutriments, des protéines ainsi que différents facteurs de croissance.

Le fluide testiculaire est tout d'abord nécessaire à la formation de la lumière des tubes séminifères. Il permet également le transport des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère ainsi que le transit à l'intérieur du tube séminifère puis, le transport du tube séminifère vers le rete testis, les canaux efférents et l'épididyme.

Il permet également le transport de différentes molécules (nutriment, protéines ou facteurs de croissance) produites par la cellule de Sertoli (Russell *et al.*, 1989). Le fluide sécrété par les cellules de Sertoli joue un rôle important dans la distribution des nutriments aux cellules germinales et dans le transport de facteurs régulateurs impliqués dans la communication entre les deux parties du tube séminifère. La composition du fluide testiculaire diffère de celle du plasma sanguin, de la lymphe et du liquide interstitiel (Johnson et Everitt, reproduction, 2002, DeBoeck Université). Les protéines retrouvées sont sensiblement les mêmes et celles-ci ne passent la barrière que grâce à un transport actif assuré par des transporteurs spécifiques. De plus, la composition ionique est différente entre le fluide testiculaire et le plasma, le rapport sodium/potassium est inversé.

LES PRINCIPAUX FACTEURS SERTOLIENS	
Facteurs	Rôle supposé au niveau germinale
<b>Facteurs impliqués dans la prolifération, la différenciation et le métabolisme germinale</b>	
Activine	Stimule la prolifération des spermatogonies
Inhibine	Inhibe la prolifération des spermatogonies
TGF- $\beta$	Intervient dans les divisions et la différenciation germinale
IGF-I	Stimule la réplication de l'ADN dans les spermatogonies
Interleukines 1 $\alpha$ et 6	L'IL1- $\alpha$ stimule, alors que l'IL6 inhibe la réplication de l'ADN méiotique et mitotique
Facteur steel (SLF)	Chimiotactisme envers les gonocytes et stimule leur prolifération
3 $\alpha$ -hydroxy-4-pregnen-20-one	Stimule le développement des spermatocytes primaires
<b>Protéines de liaison et de transport</b>	
Transferrine et ceruloplasmine	Transport du fer et du cuivre respectivement
<i>Androgen binding protein</i> (ABP)	Transport des androgènes
<i>Retinol binding protein</i> (RBP)	Transport du rétinol aux cellules méiotiques et post-méiotiques qui le transforment en acide rétinoïque
<i>Sulfated glycoprotein 1</i> (SGP1/prosaposin)	Transport de précurseurs de lipides et d'acides gras spécifiques
<i>Sulfated glycoprotein 2</i> (SGP2/clusterine)	Transport de lipides
$\alpha$ 2-macroglobuline	Transport de facteurs impliqués dans les divisions germinales
$\gamma$ -glutamyl transpeptidase	Transport du glutathion
<b>Protéases et inhibiteurs de protéases</b>	
Activateurs du plasminogène (AP)	Dégradation des jonctions inter-sertoliennes et des jonctions Sertoli-cellules germinales
Cyclic protein 2/procathepsine L	Intervient dans la libération des spermatozoïdes
Cystatine C	Inhibiteur de la cathepsine L
Collagénase de type IV et autres métalloprotéases	Impliquées dans le remodelage permanent de l'épithélium séminifère
<b>Composants de la matrice extracellulaire</b>	
Collagène I et IV, laminine et protéoglycanes	La MEC est indispensable à la polarisation des cellules de Sertoli, au stockage et à l'action de divers facteurs dont les facteurs de croissance
<b>Métabolites énergétiques</b>	
Lactate et pyruvate	Indispensables aux cellules germinales qui ne peuvent pas métaboliser le glucose
<b>Agents antioxydants</b>	
Glutathion	Transfert vers les cellules germinales
<b>Autres</b>	
Testines	Protéines des complexes jonctionnels
Liver-regulating protein (LRP)	Régule les interactions entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales

Figure 19: Les facteurs sertoliens et leur rôle supposé (d'après Hennuy, 2000)

D'après: Clonage différentiel et identification de nouveaux ADNc correspondant à des gènes régulés par la FSH dans la cellule de Sertoli de rat, Liège, Université de Liège

## (1) Sécrétion d'hormones, de facteurs de croissance

La cellule de Sertoli est la cellule pivot autour de laquelle s'organise toute l'activité fonctionnelle du testicule et ce, dès la vie foetale. Pour cela, elle sécrète des hormones et autres molécules. Ces molécules sont impliquées dans différentes fonctions (Figure 19).

Dès la vie foetale, la cellule de Sertoli est responsable de la production d'une hormone primordiale pour le développement mâle : l'AMH (Anti-Müllerian Hormone ou MIS pour Müllerian Inhibiting Substance). Cette hormone de 140 kDa est responsable de la régression des canaux de Müller pendant le développement chez les mâles (Donahoe *et al.*, 1988). L'AMH fait partie de la super-famille du TGF $\beta$ . La FSH est un puissant régulateur de la production d'AMH (Kuroda *et al.*, 1990). L'AMH est produite dans le testicule foetal. A l'âge adulte, son niveau est faible (Blanchard *et al.*, 1974 ; Hutson *et al.*, 1981 ; Hayashi *et al.*, 1984). Cette hormone est principalement impliquée dans le développement sexuel et dans la différenciation du testicule foetal.

La cellule de Sertoli sécrète également de nombreuses hormones, cytokines et facteurs de croissance tels que le TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ), le FGF (Fibroblast Growth Factor), des IGFs (Insulin like Growth Factors), les interleukines Il-1 $\alpha$  et Il-6, le GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor) et le SCF (Stem Cell Factor).

Le SCF est produit par les cellules de Sertoli. Il est important pour la viabilité des cellules germinales primordiales et la migration cellulaire dans la gonade embryonnaire (Vincent *et al.*, 1998; Hakovirta *et al.*, 1999). Il contrôlerait la prolifération et l'apoptose des cellules germinales (Orth *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000; Yan *et al.* 2000). La nécessité du SCF pour le bon déroulement de la spermatogenèse a été clairement établie. Des souris mutantes déficientes en SCF ou en son récepteur (c-kit) sont stériles et leurs gonades sont dépourvues de cellules germinales (Loveland and Schlatt, 1997). Des études sur des rongeurs ont également montré que l'inhibine et l'activine modulent le nombre de spermatogonies et de cellules de Sertoli (de Kretser *et al.*, 2002).

De nombreux facteurs sont impliqués dans la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules germinales. Parmi eux, l'inhibine a pour rôle d'inhiber la production de FSH par l'hypophyse (Rivier *et al.*, 1987; Risbridger *et al.*, 1990). A l'inverse, l'activine est connue pour activer la production de FSH (Ying., 1988). L'inhibine B est l'isoforme

majeure sécrétée chez le mâle et sa synthèse serait dépendante du nombre de cellules de Sertoli présentes (Welt *et al.*, 2002).

Le GDNF est sécrété par les cellules de Sertoli, il initie le développement des cellules souches spermatogoniales (Meng *et al.*, 2000) et induit leur prolifération (Viglietto *et al.*, 2000; Tadokoro *et al.*, 2002). Il est impliqué dans le maintien de la niche. L'Erm (Ets related molecule) est un facteur de transcription spécifiquement exprimé dans les testicules par les cellules de Sertoli vers 3 à 4 semaines après la naissance semble être indispensable à l'auto-renouvellement des cellules germinales.

Le TGF $\beta$  régule la croissance cellulaire. Il est régulé par les gonadotropines (Skinner *et al.*, 1989 ; Mullaney *et al.*, 1992).

Plusieurs membres de la famille des FGFs régulent la croissance cellulaire et la différenciation. Le FGF $\beta$  est le plus exprimé par le testicule, son expression est activée par la FSH (Smith *et al.*, 1989 ; Mullaney *et al.*, 1992).

L'Il-1 $\alpha$  est connue également pour influencer la mitose et la croissance des cellules de Sertoli. Cette interleukine influence la réplication de l'ADN des cellules germinales, la stéroïdogénèse par les cellules de Leydig et elle est également impliquée dans la barrière hémato-testiculaire (Hedger et O'Bryan, 2008; Meinhardt et Hedger, 2011).

De plus, certains de ces facteurs sont impliqués dans le contrôle des productions hormonales. C'est le cas de l'inhibine et l'activine qui peuvent influencer la stéroïdogénèse par les cellules de Leydig (Hsueh *et al.*, 1987 ; Lin *et al.*, 1989).

L'Il-1 $\alpha$  est connue pour influencer l'expression du gène de la transferrine, impliquée dans le contrôle de la phagocytose. Elle influence également la production de lactate et de pyruvate qui sont les métabolites énergétiques indispensables aux cellules germinales (Petersen *et al.*, 2002 ; Huleihel *et al.*, 2002 ; Nehar *et al.*, 1998).

Enfin, certains facteurs ont un rôle immunologique : l'Il-6 est importante pour la communication avec les cellules immunitaires du compartiment interstitiel (Jenab *et al.*, 2000). D'autres facteurs, impliqués dans la régulation de l'épithélium séminifère, ont également un rôle immunologique, c'est le cas de l'Il-1a, du TNF $\alpha$  et de l'activine A (Hedger, 2011).

## (2) Sécrétion de protéines de transport et de protéases

La cellule de Sertoli sécrète également des protéines de transport. Ces protéines sont responsables de l'acheminement de nutriments, vitamines et hormones vers les cellules germinales. Parmi ces protéines de transport, la cellule de Sertoli sécrète des protéines liant les métaux notamment la transferrine qui lie le fer (Skinner *et al.*, 1980) et la ceruloplasmine qui transporte le cuivre (Skinner *et al.*, 1983). Elles sécrètent également des protéines de transport des lipides comme la clusterine (impliquée dans le transport des lipides notamment) et la saposine (protéine activatrice des sphingolipides) (Kissinger *et al.*, 1982). On trouve également des protéines pour le transport des hormones, par exemple les protéines de liaison aux androgènes, les ABP (Androgen Binding Protein) (Sanborn *et al.*, 1975 ; Hagenas *et al.*, 1975) ou à l'acide rétinoïque. Il y a également des protéines de transport des vitamines (A et D principalement).

La cellule de Sertoli sécrète aussi des protéases (cathepsine-L et métalloprotéases notamment) (Sang *et al.*, 1990; Erickson-Lauwrence *et al.*, 1991). Celles-ci seraient impliquées dans la migration des cellules germinales vers la lumière du tube séminifère via digestion des complexes jonctionnels formés entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales (Longin *et al.*, 2001; Mruk and Cheng, 2004; Xia *et al.*, 2005). De plus, à la fin de la spermatogenèse, les protéases seraient impliquées dans la digestion des complexes de jonctions reliant les spermatides matures aux cellules de Sertoli et permettraient donc la spermiation. Ces protéases sont donc impliquées dans le remodelage permanent des tubes séminifères.

La cellule de Sertoli sécrète également des protéases spécifiques appelées « plasminogen activators », qui catalysent la conversion du plasminogène en plasmine.

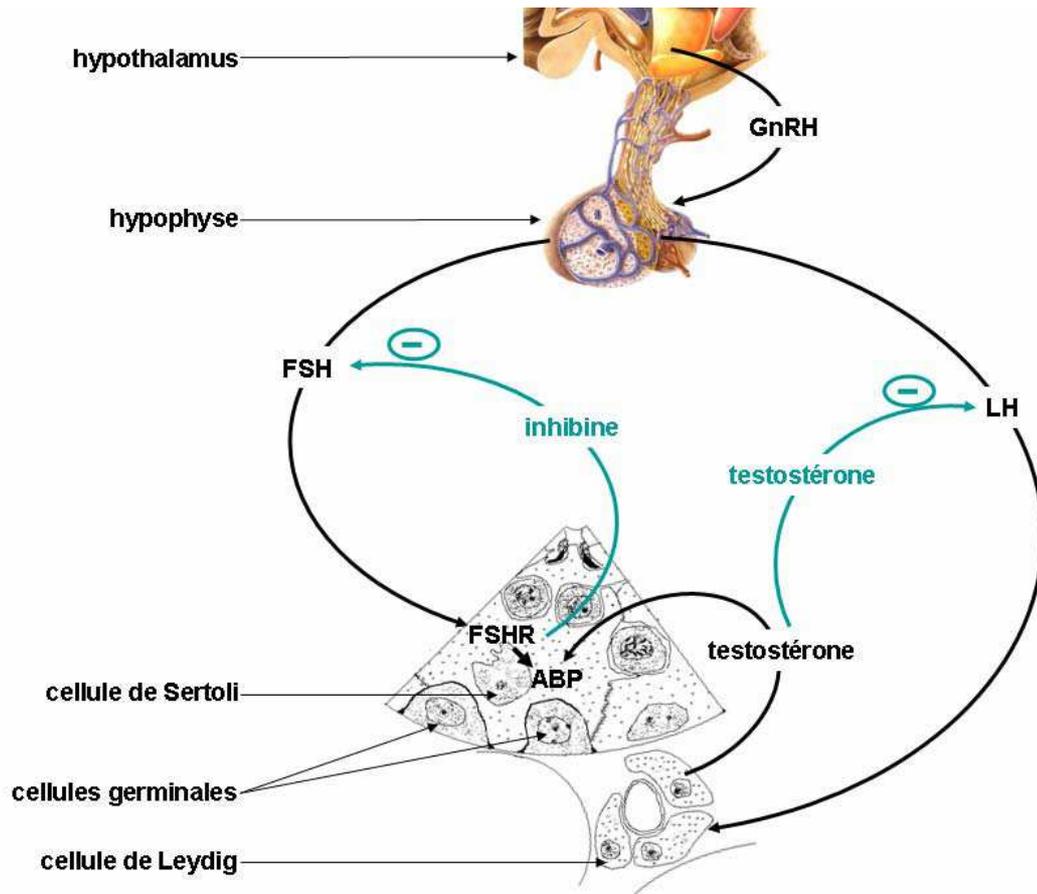


Figure 20: Mécanismes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique

L'hypothalamus sécrète la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) qui régule les sécrétions de l'hypophyse. L'hypophyse sécrète deux gonadotrophines, la FSH (hormone folliculostimulante) et la LH (hormone lutéinisante) qui vont agir sur les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig respectivement. Dans la cellule de Sertoli, la FSH stimule la synthèse de son récepteur (FSHR) et active la sécrétion d'une protéine de liaison des androgènes (ABP). La cellule de Sertoli sécrète également l'hormone peptidique inhibine, qui inhibe la sécrétion de FSH. Dans la cellule de Leydig, LH stimule la sécrétion de la testostérone qui va agir dans la cellule de Sertoli en se liant à la protéine ABP. La testostérone circulant dans le sang inhibe en retour la sécrétion de LH par un rétrocontrôle négatif.

### c) Régulation centrale de l'activité exocrine

Concernant le contrôle de la spermatogenèse (Figure 20), la FSH et la testostérone sont les deux hormones clés. Elles ont un rôle prépondérant dans le contrôle de la spermatogenèse. Elles agissent via les cellules de Sertoli, qui possèdent les récepteurs de la FSH à leur surface (FSHR) et ceux de la testostérone dans leur noyau. La FSH contrôle la prolifération des cellules de Sertoli pendant la période néonatale et pré-pubertaire. Elle régule la sécrétion de nombreux facteurs synthétisés par les cellules de Sertoli qui jouent un rôle important dans la spermatogenèse (McLean *et al.*, 2002; Sadate-Ngatchou *et al.*, 2004).

Les sécrétions de LH et de FSH sont sous contrôle de l'hypothalamus via la sécrétion de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone).

La testostérone, produite par les cellules de Leydig sous l'action de la LH, est indispensable à l'initiation et au déroulement de la spermatogenèse, qu'elle stimule et qu'elle maintient par une action paracrine. Ses récepteurs sont situés sur les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes péritubulaires, dont elle régule les fonctions. Contrairement à la testostérone, la FSH n'est pas indispensable au maintien de la spermatogenèse. En effet, les études réalisées chez des souris invalidées directement pour la FSH ou son récepteur, montrent que la spermatogenèse peut être conservée (ceci a également été montré chez l'homme, chez des patients porteurs d'une mutation inactivant le récepteur de la FSH) (Themmen and Huhtaniemi, 2000; Huhtaniemi, 2003).

Il est connu que la FSH régule également l'activité sécrétoire des cellules de Sertoli, en stimulant ou en inhibant la synthèse de facteurs locaux.

De plus, en réponse à l'action de la testostérone, de nombreux facteurs sont sécrétés par les cellules de Sertoli (Denolet *et al.*, 2006).

La testostérone et la FSH jouent un rôle dans l'assemblage/déassemblage des jonctions entre cellules de Sertoli. Ces deux hormones pourraient donc avoir une implication dans le processus de migration des cellules germinales au sein de l'épithélium séminifère et de spermiation (O'Donnell *et al.*, 2000; Denolet *et al.*, 2006; Sluka *et al.*, 2006). Mais, les sécrétions sertoliennes ne sont pas régulées que par ces deux hormones, elles sont également régulées par les cellules germinales elles même via la synthèse de facteurs paracrines. Le

TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) est sécrété par les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes. Il a pour rôle d'inhiber la production sertolienne d'inhibine et de stimuler celle de lactate et de transferrine (Benahmed, 1997).

Les liens entre les facteurs hormonaux et les facteurs locaux impliqués dans le contrôle de la spermatogenèse sont extrêmement complexes. De nombreux facteurs de croissance sont sous la dépendance d'une régulation hormonale et inversement. Par exemple, la synthèse du FGF2 est stimulée par la FSH (Mullaney and Skinner, 1992), alors que le TNF $\alpha$  exerce un effet antagoniste sur la FSH (Benahmed, 1997). Ainsi, les cellules de Sertoli exercent un rôle important sur l'initiation et le maintien de la spermatogenèse, en recevant les signaux locaux et hormonaux. En retour, les cellules germinales contrôlent l'activité des cellules de Sertoli et leur réponse aux hormones et facteurs paracrines.

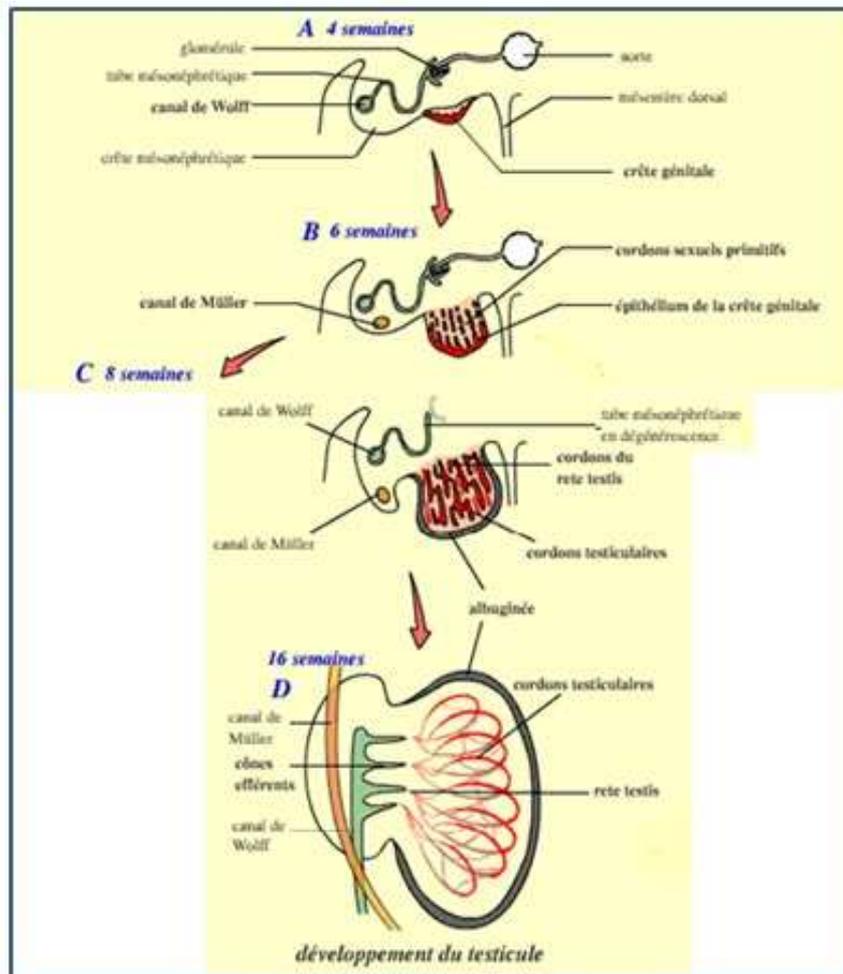


Figure 21: Ontogénèse de la gonade mâle chez l'Homme

A 4 semaines de développement, la crête génitale est visible. Elle comporte les cellules germinales. Elle se développe à côté de la crête mésonéphrétique, qui comporte le futur canal de Wolff.

B. Après 6 semaines de développement, le canal de Müller est apparu dans la crête mésonéphrétique. Les cordons sexuels primitifs se développent à partir de l'épithélium de la crête génitale.

C. Au stade 8 semaines, les cordons sexuels, vont se développer en pénétrant dans le tissu conjonctif et former un réseau relié au niveau interne par les cordons du rete testis. L'extrémité de l'ensemble des cordons sexuels va se détacher de l'épithélium de la crête génitale. Ces cordons seront séparés par une matrice extracellulaire, l'albuginée.

D. Au stade 16 semaines, les cordons sexuels ou testiculaires contenant des cellules germinales (précurseurs des gamètes) se développent, augmentant alors la taille du testicule. Le réseau formé par les cordons testiculaires et les cordons du rete testis est relié au canal déférent par les canaux efférents (reliquat de tube mésonéphrétique).

## C. Ontogenèse et mise en place des cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli apparaissent très tôt au cours de la vie embryonnaire où elles se multiplient et jouent un rôle crucial dans l'organisation architecturale du testicule. Lors de la période fœtale et néonatale, elles prolifèrent et jouent un rôle dans l'initiation de la spermatogenèse. Leurs caractéristiques changent au moment de la puberté. Enfin, dans le testicule adulte, elles régulent le cycle spermatogénétique et la production continue des spermatozoïdes.

### 1) Prémices au développement de la gonade mâle

Les gonades sont d'origine mésodermique et se différencient selon une chronologie précise (Figure 21) qui passe par une phase initiale identique dans les deux sexes, on parle de gonade indifférenciée puis, il y a établissement du dimorphisme sexuel.

Une première ébauche de la gonade se développe à la surface du mésonéphros de l'embryon, dont la paroi s'épaissit pour former la crête génitale. Deux facteurs sont importants pour le développement de la crête génitale : Sf-1 (Steoidogenic factor 1) et WT1 (Wilms tumor 1). Chez la plupart des mammifères, cette première ébauche est qualifiée de bi-potentielle, car elle possède la propriété d'évoluer en testicule ou en ovaire selon les signaux génétiques qu'elle reçoit.

Le gène contrôlant le déterminisme sexuel chez les mâles est le gène SRY. Il est localisé sur le bras court du chromosome Y. Quand ce gène est présent, il y a différenciation des cellules de Sertoli à partir de l'épithélium coelomique. Il s'agit du premier événement au cours de la différenciation de la gonade en testicule. Le gène Sox9 est également un gène important pour cette détermination.

### 2) Développement des cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli jouent un rôle crucial dans la mise en place de la gonade et dans la différenciation mâle au cours de la vie intra-utérine. Pendant la gestation, les cellules de Sertoli sont les premières cellules à se différencier au sein de la gonade indifférenciée, ce qui

permet notamment la mise en place des cordons testiculaires, la prévention de l'entrée en méiose des cellules germinales, ainsi que la différenciation des cellules de Leydig (Swain and Lovell-Badge, 1999; Koopman, 2001 and 2005; Brennan and Capel, 2004; Sharpe 2006).

#### a) Développement embryonnaire et pré-natal

Il y a une première phase de prolifération des cellules de Sertoli durant la vie fœtale et cette phase est indépendante de la FSH. Les cellules de Sertoli immatures forment alors des agrégats entre elles et entourent progressivement les cellules germinales primordiales (PGC) pour former les cordons testiculaires, qui sont les précurseurs des tubes séminifères du testicule adulte, et qui isolent les PGC du compartiment interstitiel. Les PGC naissent à partir d'une sous-population de cellules souches embryonnaires dans une zone proche de l'ectoderme extra-embryonnaire (appelée épiblaste) à un stade précoce du développement embryonnaire. Elles prolifèrent et migrent ensuite jusqu'au territoire occupé par la future gonade.

Les cellules de Sertoli synthétisent des facteurs locaux qui d'une part inhibent l'entrée en méiose des PGC, et d'autre part entraînent la migration de cellules mésenchymateuses qui se différencieront en cellules périvitubulaires ou en cellules de Leydig. Parmi les facteurs sécrétés par les cellules de Sertoli, le FGF9 (Fibroblast Growth Factor 9), qui est une molécule de signalisation impliquée dans de nombreux processus du développement, pourrait jouer un rôle clef. En effet, FGF9 serait impliqué dans la prolifération et la migration des cellules du mésenchyme au sein du testicule en formation, ainsi que dans la différenciation des cellules de Sertoli par un processus de régulation autocrine (Colvin *et al.*, 2001). D'autres facteurs de type IGF, synthétisés par les cellules de Sertoli, joueraient un rôle crucial dans la différenciation des cellules de Leydig.

Les cellules de Leydig fœtales commencent alors à produire la testostérone. La testostérone va alors induire le développement des canaux de Wolff en épидидymes, canaux déférents et vésicules séminales.

Les cellules de Sertoli synthétisent l'hormone anti-Müllérienne, AMH qui entraîne la régression des canaux de Müller. Chez la femelle, ce sont ces canaux qui sont à l'origine des trompes, de l'utérus et de la partie supérieure du vagin. L'AMH est également délétère pour l'entrée en méiose des cellules germinales (Josso *et al.*, 1998).

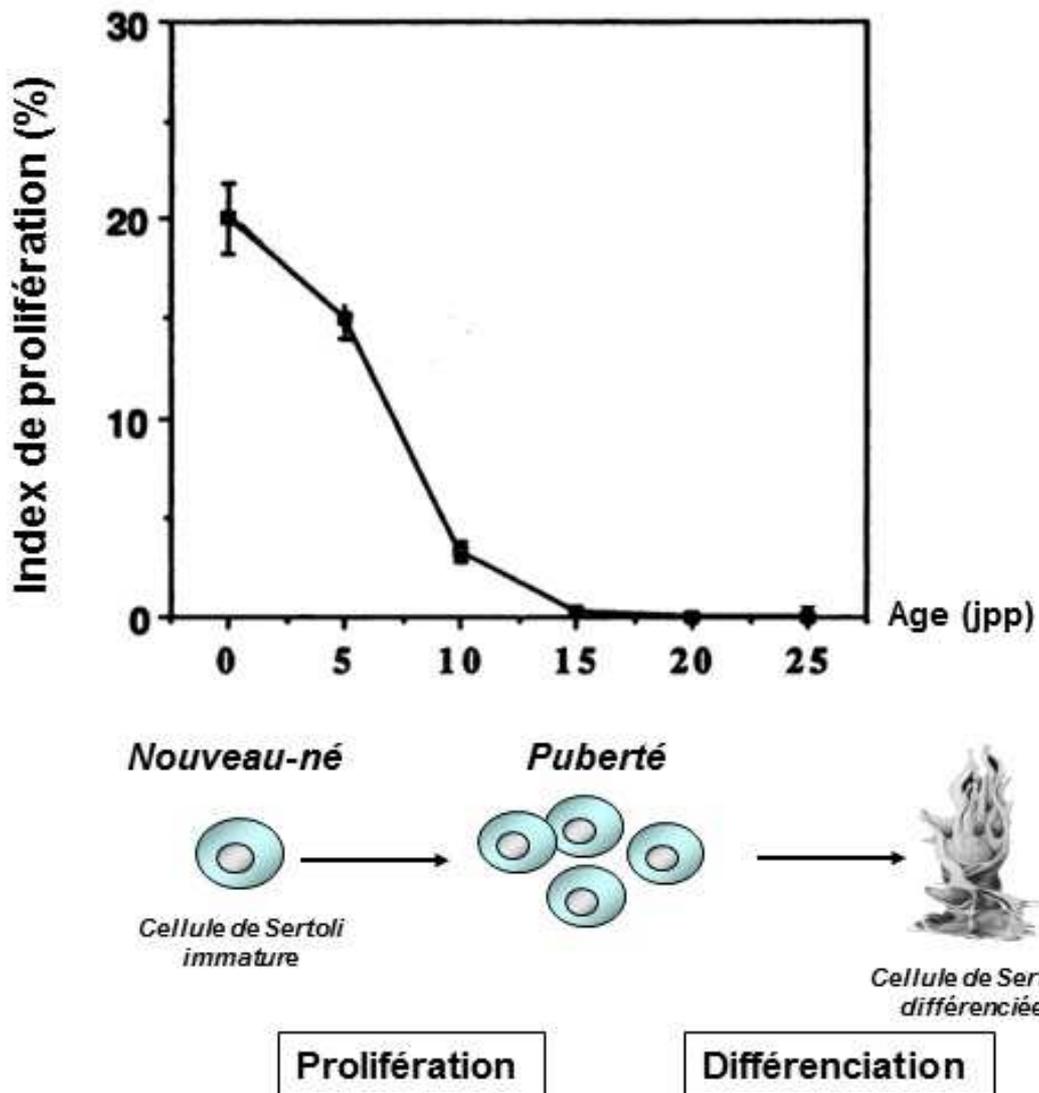


Figure 22: Prolifération post-natale des cellules de Sertoli chez la souris (adapté de Joyce et al., 1993)

La prolifération des cellules de Sertoli débute durant la vie fœtale, il y a une première phase de prolifération avant la naissance. Puis, à la naissance, il y a un pic de prolifération. Les cellules de Sertoli prolifèrent jusqu'à la mise en place de la barrière hémato-testiculaire, vers 12-15 jours post-partum chez la souris. A la puberté, le stock définitif de cellules de Sertoli est constitué. Les cellules se différencient pour donner des cellules de Sertoli matures.

## b) Développement néo-natal et pré-pubertaire

A la naissance, les cellules de Sertoli représentent 80% des cellules du tube séminifère (Bellve, 1993). Elles sont morphologiquement différentes de celles des souris adulte. En effet, elles ont des formes irrégulières et leur noyau contient un à deux nucléoles.

La période néonatale est caractérisée par la croissance importante des cordons testiculaires avec une phase de prolifération des cellules de Sertoli. Cette période est également caractérisée par l'initiation de la spermatogenèse (différenciation des pro-spermatogonies en spermatogonies et entrée en méiose de certaines d'entre elles).

La prolifération des cellules de Sertoli est une étape cruciale (Figure 22), puisque de leur nombre va dépendre la taille du testicule, ainsi que la production spermatique chez l'adulte (rat: Orth *et al.*, 1988). La durée de prolifération sertolienne est variable selon les espèces. Une fois le processus de prolifération terminé, le stock de cellules de Sertoli adulte est constitué de manière définitive. Chez l'homme, les cellules de Sertoli prolifèrent pendant la période néonatale et péripubertaire (Sharpe *et al.*, 2003). Chez la souris, il y a une phase de prolifération embryonnaire puis, une autre en post-natale (Sapsford *et al.*, 1967). Au cours des 10-12 premiers jours après la naissance, les cellules de Sertoli se divisent par mitose (Vergouwen *et al.*, 1993). Cette prolifération atteint un pic juste après la naissance. Puis, progressivement, la prolifération des cellules de Sertoli est ralentie, et celles-ci commencent un processus de maturations morphologique et fonctionnelle (Sharpe *et al.*, 2003). Chez la souris, à l'âge de 10-12 jours, les cellules de Sertoli ont obtenu leur structure définitive. Elles deviennent alors incapables de proliférer (Clermont and Perey, 1957). Les changements morphologiques sont bien visibles : leur noyau s'est élargi et le nucléole est devenu plus visible. Elles se sont allongées et ont émis des ramifications qui forment des zones de jonction avec les cellules germinales. Les cellules de Sertoli positionnées de manière adjacente mettent en place des connexions étroites entre elles. Ceci permet la formation d'un compartiment adluminal à l'intérieur duquel les processus méiotiques et post-méiotiques prendront place. Ce compartiment isole les cellules germinales de la circulation sanguine, en formant la barrière hémato-testiculaire, constituée des jonctions serrées.

En se différenciant, la cellule de Sertoli acquiert également un certain nombre de caractéristiques marquantes. Elle perd l'expression du gène de l'AMH. Elle acquiert les

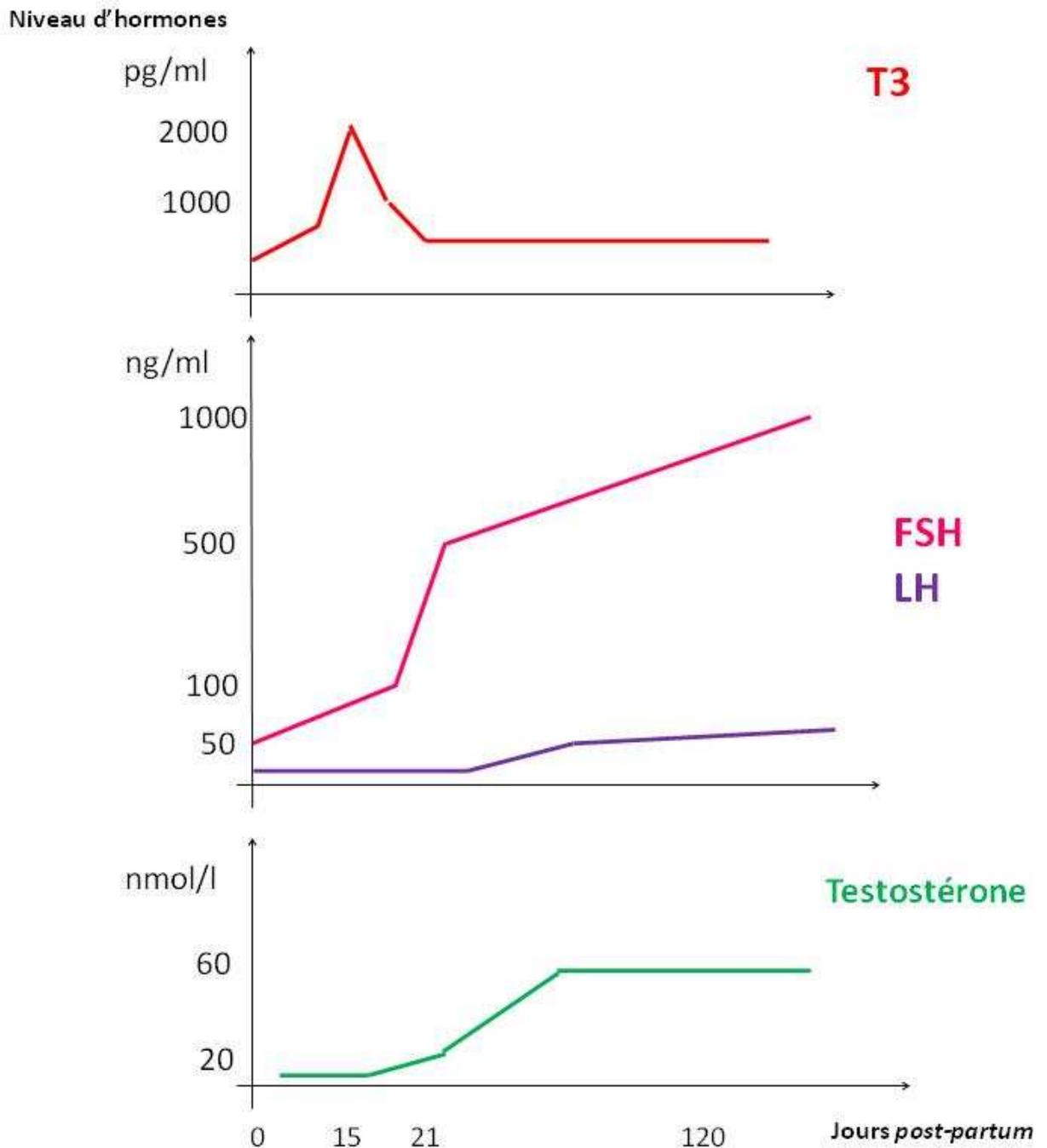


Figure 23: Niveaux circulants des hormones durant le développement post-natal chez la souris (Adapté de : Jean-Faucher et al., 1983 pour LH et FSH ; Hadj-Sahraoui et al., 2000 pour la T3 et Wu et al., 2010 pour la testostérone).

récepteurs aux androgènes. Cette maturation des cellules de Sertoli est induite par la FSH, la testostérone et les hormones thyroïdiennes (Sharpe *et al.*, 2003; Sharpe, 1994).

#### c) Développement post-pubertaire

Au sein de l'épithélium séminifère du testicule adulte, la cellule de Sertoli apparaît comme une grande cellule pyramidale qui s'étend sur toute la hauteur de cet épithélium, depuis la membrane basale jusqu'à la lumière du tube. En microscopie optique, seul le noyau cellulaire est visible, et la membrane cytoplasmique est indiscernable. Le noyau, avec sa forme typique, grossièrement triangulaire et à contours irréguliers, présente un nucléole bien visible. Il occupe une position basale. Au sein de l'épithélium, les cellules de Sertoli jouent un rôle crucial dans le développement des cellules germinales et dans la régulation de la spermatogenèse. Comme détaillé dans le chapitre B.3, ce sont elles qui reçoivent les messages hormonaux (FSH et testostérone) et les signaux locaux (paracrines ou autocrines), ce qui leur permet de sécréter d'autres facteurs qui moduleront leurs propres fonctions, mais aussi celles des cellules germinales et des cellules de Leydig (Walker and Cheng, 2005). Elles sécrètent notamment des facteurs tels que le TGF $\beta$ , les enzymes IDO et l'activine A qui ont un rôle immunosupresseur très important.

Dans le tube séminifère murin adulte, les cellules de Sertoli post-mitotiques représentent approximativement 3% des cellules du tube séminifère et ce sont les seules cellules somatiques en contact direct avec les cellules germinales (Bellve, 1993).

#### d) Niveaux circulants des hormones pendant le développement post-natal

Durant la période post-natale, la T3 est sécrétée dès la naissance, avec un pic à 15jpp (Figure 23). Sa sécrétion décroît ensuite jusqu'à environ 21jpp puis, son niveau reste stable à l'âge adulte. Le niveau de FSH circulant augmente de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Le niveau de la LH est augmenté après la puberté. Concernant la testostérone, sa sécrétion est fortement augmentée au cours de la période post-natale. La prolifération des cellules de Sertoli diminue alors que la sécrétion de la T3 augmente, le contrôle de la prolifération est T3-dépendant.

### III. Régulation de la balance

#### prolifération/différenciation des cellules de Sertoli

Comme détaillé précédemment, les cellules de Sertoli prolifèrent en deux temps, une première phase pendant la vie fœtale puis, la seconde pendant la vie post-natale. Elles cessent ensuite de proliférer, cela coïncide avec la mise en place de la barrière hémato-testiculaire (Vitale *et al.*, 1973) et la formation des lumières des tubes (Gondos and Berndston, 1993). Une fois la prolifération terminée, le nombre de cellules de Sertoli est alors considéré comme stable et définitif pour le reste de la vie (Steinberger and Steinberger, 1971; Nagy, 1974). La prolifération des cellules de Sertoli est contrôlée par la FSH ainsi que par les hormones thyroïdiennes, qui agissent via des récepteurs spécifiques (Holsberger and Cooke, 2005; McLachlan *et al.*, 2002; Walker and Cheng, 2005). Ces deux hormones ont un rôle antagoniste : la FSH stimule la prolifération sertolienne, alors que les hormones thyroïdiennes ont un rôle inhibiteur. Les oestrogènes pourraient également stimuler la prolifération des cellules de Sertoli (O'Donnell *et al.*, 2001).

#### A. Action de la FSH et autres facteurs

La FSH est connue pour être un important mitogène pour les cellules de Sertoli immatures, à la fois *in vitro* et *in vivo* (chez le rat: Griswold *et al.*, 1975 and 1977; Orth *et al.*, 1984 and 1990; Meachem *et al.*, 1996; chez la souris: Singh and Handelsman, 1996). C'est la FSH qui induit la dernière vague de prolifération, qui va déterminer la taille du testicule adulte et donc le rendement spermatogénique. Le premier à avoir montré l'effet mitogène de la FSH sur les cellules de Sertoli (de rat) est Murphy, en 1965.

La FSH est produite par l'antéhypophyse dès le développement fœtal. Puis, le niveau de FSH continue d'augmenter pendant le développement post-natal précoce.

En 2001, Crépieux et ses collaborateurs ont montré que les effets mitogènes de la FSH sur les cellules de Sertoli de rat à 5jpp entraînent une augmentation de l'expression de la cycline D1

Chez les souris hypogonadiques (hpg), les taux circulants de LH et FSH sont très faibles. Ceci entraîne une diminution de 35% du nombre de cellules de Sertoli (Baker and O'Shaughnessy, 2001). La même chose est observée chez les souris KO pour la sous-unité  $\beta$  de la FSH : le nombre de cellules de Sertoli est diminué de 30 à 39% (Wreford *et al.*, 2001).

La FSH a donc un rôle très important. Elle agit via ses récepteurs, les FSHR, présents sur les cellules de Sertoli.

En 2004, Allan et ses collaborateurs ont démontré via des modèles de souris transgéniques que la prolifération complète des cellules de Sertoli peut se faire grâce à l'activité de la FSH et en absence totale de LH.

Chez l'homme, des récepteurs à la FSH non fonctionnels induisent des testicules plus petits, suggérant un nombre de cellules de Sertoli fortement diminué et une activité de spermatogenèse diminuée, bien que certains de ces hommes soient fertiles (Tapanainen *et al.*, 1997). Plusieurs études ont montré que l'absence de FSH conduit à une baisse de la fertilité (Kumar *et al.*, 1997; Krishnamurthy *et al.*, 2000).

Si l'on considère les cellules de Sertoli capables de se diviser malgré l'absence de FSH, cela suggère que d'autres facteurs paracrines sont importants pour obtenir un nombre adéquat de cellules de Sertoli pour un testicule parfaitement fonctionnel. Des études *in vitro* ont montré sur les cellules de Sertoli des effets mitogènes de ces facteurs. Parmi ces facteurs, il y a notamment les IGF-1, le FGF et le GDNF (rat: Borland *et al.*, 1984; porc: Jaillard *et al.*, 1987; rat: Hu *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2002). Ces facteurs peuvent être produits par les cellules de Sertoli elles-mêmes (voir chapitre précédent).

D'autres facteurs sont aussi impliqués dans cette régulation (et produits également par les cellules de Sertoli elles-mêmes). L'inhibine est impliquée dans cette régulation via son action de feedback négatif sur la FSH (de Kretser *et al.*, 2000). En 1995, Boitani et ses collaborateurs ont démontré que les cellules de Sertoli de rat répondent à l'activine en influençant leur prolifération, l'activine ayant une fonction de stimulation de la sécrétion de la FSH par l'hypophyse, à l'inverse de l'inhibine.

Les oestrogènes peuvent aussi agir sur les cellules de Sertoli et influencer l'action de la FSH (chez la souris: MacCalman *et al.*, 1997). La testostérone et l'acide rétinoïque sont connus pour inhiber la prolifération des cellules de Sertoli immatures (rat: Buzzard *et al.*, 2003).

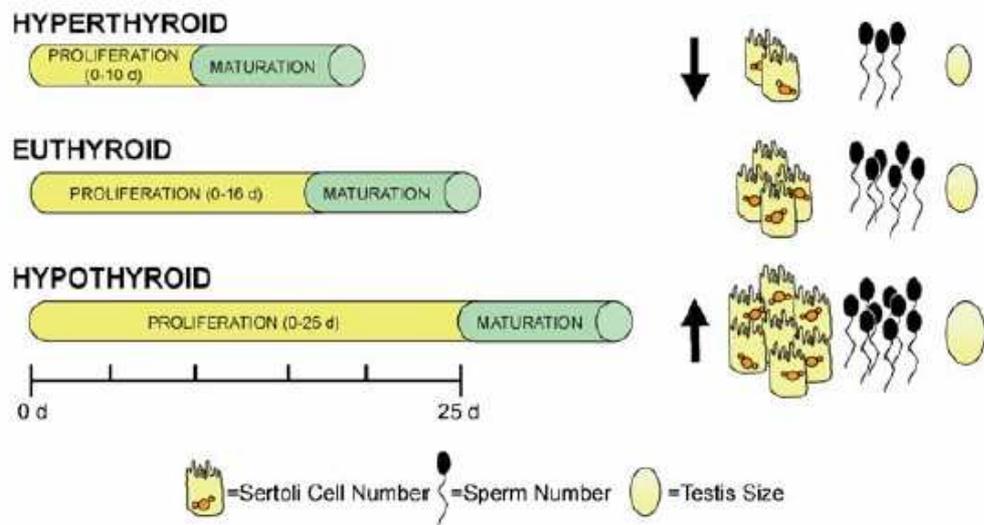


Figure 24: Action de la T3 sur le développement testiculaire (d'après Holsberger et Cooke, 2005)

Dans un cas normal d'euthyroïdie, la phase de prolifération des cellules de Sertoli a une durée normale, elle est suivie de leur maturation. Le testicule présente alors une taille normale.

Dans le cas d'une hyperthyroïdie, la phase de prolifération des cellules de Sertoli est considérablement diminuée. Le testicule est alors de taille restreinte et le rendement spermatique est diminué.

Dans le cas contraire, l'hyperthyroïdie conduit à un allongement de la phase de prolifération des cellules de Sertoli. Le testicule est plus gros car le nombre de cellules de Sertoli est augmenté, ce qui induit une augmentation du rendement spermatique.

## B. Régulation via l'hormone thyroïdienne T3

Les études chez la souris conduites par Holsberger et ses collaborateurs (2003) ont montré que l'hormone thyroïdienne est le signal initiateur de l'arrêt de la prolifération des cellules de Sertoli et de leur entrée en différenciation.

Les hormones thyroïdiennes ont un rôle important chez les Mammifères (et les Amphibiens). Elles sont impliquées dans la croissance, le développement et le métabolisme. Dans le testicule, la triiodothyronine T3 est connue pour jouer un rôle clé dans le développement (rat: Jannini *et al.*, 1984; Buzzard *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont montré que des changements des niveaux d'expression des hormones thyroïdiennes pendant le développement testiculaire affectent la maturation testiculaire et par conséquent la reproduction (Figure 24) (rat: Jannini *et al.*, 1995).

Dans de nombreuses espèces, un hypothyroïdisme néonatal entraîne une augmentation du poids testiculaire (rat: Cooke *et al.*, 1991). De plus, il a été montré chez le rat que des niveaux d'hormones thyroïdiennes très hauts durant la période néonatale entraîne une diminution du poids testiculaire et de la production spermatique (Van Haaster *et al.*, 1993; Cooke *et al.*, 1994; Palmero *et al.*, 1995; Arambepola *et al.*, 1998).

La T3 est responsable de l'augmentation du niveau d'ARNm des récepteurs aux androgènes dans les cellules de Sertoli post-natales alors que la testostérone est impliquée dans la différenciation et la survie des cellules de Sertoli immatures (rat: Walczak-Jedrzejowska *et al.*, 2004). Il a été également démontré que la T3 stimule la prise de glucose par les cellules de Sertoli de rat immatures (Ulisse *et al.*, 1992) et la sécrétion d'IGF-1, celle-ci stimulant la synthèse d'ADN dans les cellules germinales mitotiques de rat (Palmero *et al.*, 1990).

Toutes ces études démontrent bien l'importance de la T3 pour le développement testiculaire et son importance dans la régulation de la balance prolifération/différenciation des cellules de Sertoli.

## 1) Les déiodases testiculaires

Les déiodases sont les enzymes qui convertissent la T4 en sa forme active T3. Elles modulent la concentration en hormones dans les tissus et donc leur action. Leur présence a été démontrée dans les testicules des rongeurs, à la fois durant la vie fœtale et à l'âge adulte (Bates *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 2003; Wajner *et al.*, 2007). Dans le testicule de rat, il a été montré que les trois formes de déiodases D1, D2 et D3 sont présentes (Bates *et al.*, 1999). Pendant le développement, la forme D3 prédomine puis, elle décroît à l'âge adulte. La D2 est la forme qui est majoritairement exprimée à l'âge adulte. En 2007, Wajner et ses collaborateurs ont montré chez le rat que la D2 est exprimée dans les spermatides allongées. Elle est absente dans les autres cellules germinales et les cellules de Sertoli.

## 2) Rôle de la T3 dans la prolifération des cellules de Sertoli

Chez le rat, la prolifération des cellules de Sertoli débute pendant la vie fœtale et s'arrête à environ 16 jours post-partum (Orth, 1982; Wang *et al.*, 1989). Chez la souris, le timing de prolifération est le même.

Chez le rat, il a été démontré qu'une hypothyroïdie pendant la vie fœtale n'a pas d'effet sur le développement testiculaire (Francavilla *et al.*, 1991; Hamouli-Said *et al.*, 2007). Par contre, si l'hypothyroïdisme est induit chez le nouveau-né, le développement testiculaire est perturbé, il y a des défauts de maturation des cellules germinales et de formation des tubes séminifères (Palmero *et al.*, 1989; Francavilla *et al.*, 1991). De plus, il a été montré que des hypothyroïdies transitoires, en périodes néonatale et prépubertaire, allongent la durée de prolifération en retardant la maturation des cellules de Sertoli (Francavilla *et al.*, 1991; Van Haaster *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 1993; Joyce *et al.*, 1993; De Franca *et al.*, 1995). L'hypothyroïdisme néonatal transitoire chez le rat induit une augmentation du nombre de cellules de Sertoli de 157% chez l'adulte (Hess *et al.*, 1993). L'hypothyroïdie juvénile transitoire provoque une cessation précoce de la prolifération des cellules de Sertoli et une maturation plus précoce entraînant une diminution de la taille du testicule et de la production spermatique (rat: Van Haaster *et al.*, 1993; Cooke *et al.*, 1994; Palmero *et al.*, 1994).

La T3 a une action inhibitrice sur la prolifération des cellules de Sertoli et stimulatrice pour leur entrée en différenciation. Ceci a été montré chez les rongeurs (Cooke et Meisami, 1991; Joyce *et al.*, 1993; Kirby *et al.*, 1992) et d'autres Vertébrés (chez la volaille par Kirby *et al.*,

1996; chez le taureau, Majdic *et al.*, 1998; chez le tilapia, Matta *et al.*, 2002 et chez le hamster, Jansen *et al.*, 2007).

Marchlewska et ses collaborateurs ont montré en 2011 que la T3 a un effet bi-phasique sur le contrôle du nombre de cellules de Sertoli chez le rat. Il y a d'abord une phase de stimulation de la prolifération, elle est restreinte aux premiers jours post-nataux puis, il y a la phase d'inhibition qui apparaît pendant le développement des tubes séminifères.

La T3 apparaît donc comme le signal majeur pour l'entrée en différenciation et donc l'acteur majeur du contrôle de la balance prolifération/différenciation des cellules de Sertoli.

### 3) Les TRs impliqués

Comme détaillé dans le chapitre I, les hormones thyroïdiennes agissent via leurs récepteurs les TRs. Ils sont présents dans le testicule, de la naissance à la vie adulte (rat: Buzzard *et al.*, 2000; homme: Jannini *et al.*, 2000), confirmant qu'ils jouent un rôle important dans le développement testiculaire. De plus, plusieurs isoformes de TRs sont exprimées au niveau testiculaire.

L'isoforme TR $\alpha$ 1, que ce soit sous forme ARNm ou protéine, est abondant dans le testicule de rat en développement et notamment dans les cellules de Sertoli (Jannini *et al.*, 1994; Arambepola *et al.*, 1998).

Les isoformes TR $\alpha$ 2 et TR $\alpha$ 3 sont également exprimées dans les cellules de Sertoli (rat : Jannini *et al.*, 1994; Arambepola *et al.*, 1998; homme: Jannini *et al.*, 2000). Cependant, ces deux isoformes ne lient pas la T3 (souris: O'Shea *et al.*, 2002). Toutefois, le TR $\alpha$ 2 peut se lier aux TREs malgré l'absence de fixation du ligand, ce qui fait de lui un antagoniste constitutif dans la signalisation de la T3. Il est ainsi capable d'inhiber l'expression des gènes cibles de la T3. Parmi les produits du gène *THRA*, l'isoforme TR $\alpha$ 1 apparaît donc comme l'isoforme prédominante dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli.

Le TR $\beta$ 1 pourrait également être impliqué dans le développement des cellules de Sertoli. En effet, Tagami et ses collaborateurs ont montré en 1993 que le TR $\beta$ 1 est exprimé dans le testicule de rat au cours du développement. De plus, les ARNm de TR $\beta$ 1 sont exprimés dans les testicules de rats juvéniles et adultes (Rao *et al.*, 2003). Les ARNm de TR $\beta$ 1 ont

également été détectés dans des cellules de Sertoli de rats prépubères (Palmero *et al.*, 1995; Buzzard *et al.*, 2000). Ils ont également été détectés chez d'autres espèces comme le verrat (Palmero *et al.*, 1995). Toutefois, d'autres études ont montré que le TR $\beta$ 1 n'est pas détecté dans les cellules de Sertoli de rat et humaines (Jannini *et al.*, 1994 and 2000; Canale *et al.*, 2001). Le TR $\beta$ 2 lui n'a pas été trouvé dans le testicule. Ce récepteur est principalement détecté dans le système nerveux.

Les effets de la T3 sur les cellules de Sertoli semblent donc impliqués TR $\alpha$ 1 et/ou TR $\beta$ 1. Les souris TR $\alpha$ KO et TR $\beta$ KO ayant été générées (Forrest *et al.*, 1996; Fraichard *et al.*, 1997; Wikstrom *et al.*, 1998; Gauthier *et al.*, 2001), Holsberger et ses collaborateurs ont étudié leurs phénotypes testiculaires afin de discerner l'implication de chaque isoforme (2005).

Le TR $\alpha$ 1 est critique pour la mise en place de la lumière des tubes séminifères. Cette mise en place est un bon indicateur de l'effet de la T3 sur les cellules de Sertoli car l'apparition des lumières est stimulée par la T3. Contrairement aux TR $\beta$ KO, chez les TR $\alpha$ KO, le traitement à la T3 est incapable d'induire l'apparition des lumières au sein des tubes séminifères donc, le TR $\alpha$ 1 est indispensable pour « médier » les premiers effets de la T3 sur la maturation des cellules de Sertoli.

Le TR $\alpha$ 1 serait également nécessaire pour l'inhibition de la prolifération des cellules de Sertoli et leur maturation. En effet, chez les TR $\beta$ KO, la prolifération des cellules de Sertoli est diminuée et cela est d'autant plus accentué en réponse à la présence de T3. Cela suggère que le TR $\beta$  ne serait pas le récepteur responsable des effets inhibiteurs de la T3 sur les cellules de Sertoli.

L'analyse des TR $\alpha$ KO révèle un phénotype comparable à ce qui est observé chez les modèles d'hypothyroïdisme : augmentation du poids testiculaire, de la production spermatique et du nombre de cellules de Sertoli à l'âge adulte.

L'étude d'Holsberger et ses collaborateurs suggère donc que le récepteur TR $\alpha$ 1 serait l'isoforme prédominante quant à la médiation des effets de la T3 sur les cellules de Sertoli durant leur développement, au cours de la période néonatale.

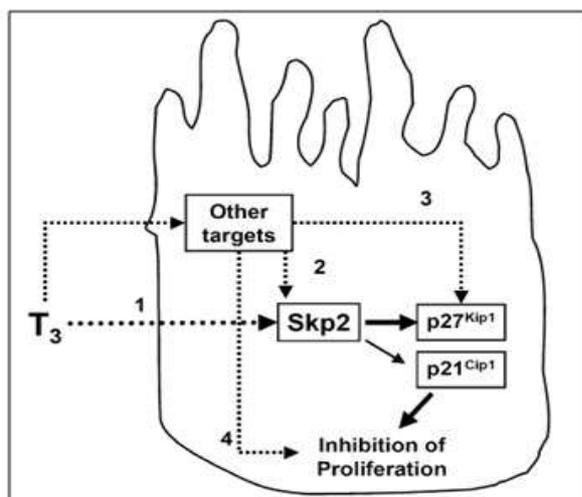


Figure 25: Mécanismes hypothétiques du contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli par la T3 (d'après Holsberger et Cooke, 2005)

La T3 pourrait inhiber Skp2 pour réguler la prolifération des cellules de Sertoli, soit de manière directe (1), soit de manière indirecte (2) via d'autres cibles de la T3 en amont de Skp2.

L'inhibition de Skp2 conduirait à une augmentation des niveaux de p27 et de p21. D'autres protéines pourraient moduler les niveaux de p21 et p27 (3).

Les actions de ces cibles potentielles de la T3 pourraient inhiber la prolifération des cellules de Sertoli via les effets des protéines du cycle cellulaire, n'impliquant pas p21 et p27 ou Skp2 (4).

Sur la figure, les flèches continues indiquent des voies connues. Les flèches en pointillés indiquent des voies hypothétiques.

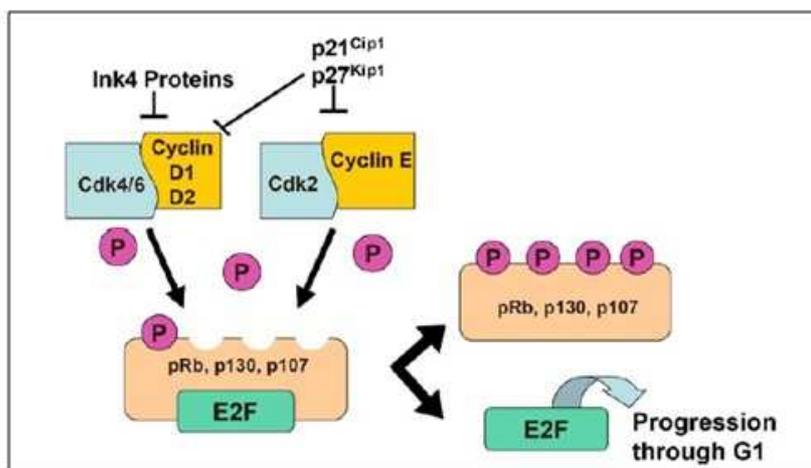


Figure 26: Mécanismes contrôlant le passage de G1 à S lors du cycle cellulaire (d'après Holsberger et Cooke, 2006)

Les cyclines D sont associées aux kinases dépendantes des cyclines Cdk4 et 6. La cycline E est associée à la Cdk2. Les complexes cycline/Cdk, une fois activés, vont phosphoryler les protéines pRb, p130 et p107. Leur phosphorylation va permettre la libération du facteur de transcription E2F. E2F peut alors activer la transcription de gènes cibles en entraînant le passage de G1 à S du cycle cellulaire.

Il existe une régulation de ce passage de G1 à S via deux familles de protéines: la famille des protéines Ink4 (comprenant p15, p16, p18 et p19) et la famille des Cip/Kip (comprenant p21, p27 et p57). Ces protéines ont pour rôle d'inhiber l'activité kinase des complexes cycline/Cdk.

#### 4) La T3 et les mécanismes supposés impliqués dans la prolifération des cellules de Sertoli

Les mécanismes par lesquels la T3 arrête la prolifération et induit la différenciation des cellules de Sertoli sont à l'heure actuelle inconnus (Figure 25).

Des études récentes posent l'hypothèse que la T3 pourrait contrôler la prolifération des cellules de Sertoli en agissant via des CDKIs spécifiques, appartenant à la famille des protéines qui interagissent directement avec le cycle cellulaire, p21Cip1 et p27Kip1 (Holsberger *et al.*, 2005). Ces acteurs seraient régulés par Skp2, qui serait lui-même régulé par la T3 mais, ceci n'est qu'hypothétique.

Concernant les mécanismes généraux contrôlant le passage G à S lors du cycle cellulaire. Le contrôle de la prolifération met en jeu des acteurs du cycle cellulaire (Figure 26). Il y a des protéines clés pour la progression du cycle cellulaire et le passage du point de restriction G1. On trouve la catégorie des cyclines. Les cyclines D sont associées aux kinases dépendantes des cyclines Cdk4 et 6. La cycline E est associée à la Cdk2. Les complexes cycline/Cdk, une fois activés, vont phosphoryler les protéines pRb, p130 et p107. La phosphorylation de ces petites protéines va permettre la libération du facteur de transcription E2f. E2f peut alors activer la transcription de gènes cibles en entraînant le passage de G1 à S du cycle cellulaire.

Il existe une régulation de ce passage de G1 à S via deux familles de protéines: la famille des protéines Ink4 (comprenant p15, p16, p18 et p19) et la famille des Cip/Kip (comprenant p21, p27 et p57). Ces protéines ont pour rôle d'inhiber l'activité kinase des complexes cycline/Cdk. Les protéines de la famille Ink4 sont connues pour inhiber les complexes cyclines D1/ D2 et Cdk4/6. Les p21Cip1 et p27Kip1 peuvent inhiber également ces complexes mais également les complexes cyclineE/Cdk2.

p27Kip1 est connu dans plusieurs types cellulaires pour jouer le rôle de régulateur de la prolifération (fibroblastes murins: Coats *et al.*, 1996; prostate humaine: Lu *et al.*, 2002, oligodendrocytes de rats: Tokumoto *et al.*, 2002). Son expression est inversement corrélée avec la prolifération des cellules de Sertoli chez l'homme et chez la souris (Beumer *et al.*, 1999).

Les souris p27KO, p21KO et double KO présentent de gros testicules avec un nombre de cellules de Sertoli et une production spermatique augmentés (Holsberger *et al.*, 2003; Holsberger *et al.*, 2005).

L'implication de p21 et p27 comme mécanisme expliquant le contrôle de la balance prolifération/différenciation par la T3 n'est qu'hypothèse, en effet, cela n'a jamais été démontré et l'article d'Holsberger et ses collaborateurs ne se base que sur des corrélations.

*In vitro* et *in vivo*, dans des cellules de Sertoli, il a été montré que la T3 induit l'expression de deux CDKs, p27Kip1 et p21Cip1 et qu'un hypothyroïdisme est corrélé à la diminution de l'expression de p27Kip1 (rat : Buzzard *et al.*, ; souris : Holsberger *et al.*, 2003).

Toutes ces études suggèrent donc que l'effet suppresseur de la T3 sur la prolifération des cellules de Sertoli pourrait impliquer des acteurs du cycle cellulaire. Toutefois, les mécanismes sont inconnus. De plus, nous ne savons pas s'il existe une action directe ou indirecte de la T3 sur le testicule.

La T3 pourrait réguler la prolifération des cellules de Sertoli via un autre mécanisme impliquant la connexine Cx43, qui est une protéine des jonctions gap (Holsberger *et al.*, 2005; Gilleron *et al.*, 2006). En effet, il a été suggéré l'implication de, la connexine Cx43. L'effet inhibiteur de la T3 sur la prolifération des cellules de Sertoli est corrélée à l'augmentation du niveau de Cx43 dans le testicule post-natal (Gilleron *et al.*, 2006). Le KO spécifique de la Cx43 dans les cellules de Sertoli (souris SC-Cx43KO) montre que la perte de Cx43 est corrélée à une augmentation de la prolifération et un retard dans la maturation des cellules de Sertoli chez la souris à l'âge adulte (Brehm *et al.*, 2007; Sridharan *et al.*, 2007). De plus, chez ces souris, seules des cellules de Sertoli et des spermatogonies sont observées, le KO de la Cx43 empêche donc l'initiation de la spermatogenèse et conduit à une infertilité (Sridharan *et al.*, 2007).

## 5) T3 et marqueurs de maturation des cellules de Sertoli

Il existe différents marqueurs de l'état de maturation des cellules de Sertoli.

La maturation des cellules de Sertoli est une cascade de changements qui affectent leurs morphologie et leurs fonctions (Sharpe *et al.*, 2003; Brehm et Steger, 2005). Ce processus est

caractérisé par la perte ou le gain de protéines ou molécules spécifiques associées à la différenciation des cellules de Sertoli (Sharpe et al., 2003).

La T3 affecte l'expression de plusieurs de ces marqueurs. En effet, les hormones thyroïdiennes sont également connues pour stimuler la synthèse de protéines dans les cellules de Sertoli immatures (Palmero *et al.*, 1995 et 1996). La T3 et la T4 induisent l'accumulation d'acides aminées dans les cellules de Sertoli (Menegaz *et al.*, 2006).

La T3 inhibe de l'expression de l'AMH. Chez le rat, un hypothyroïdisme néonatal retarde la chute de l'expression des ARNm de l'AMH (Bunick *et al.*, 1994). Les cellules de Sertoli néonatales de rats en culture, traitées à la T3, montrent une diminution des ARNm de l'AMH (Arambepola *et al.*, 1998).

Cependant, une étude a montré chez des rats pré-pubères que le taux d'AMH des cellules de Sertoli décline avec l'âge sans que le statut thyroïdien soit impliqué, suggérant que la T3 n'est pas impliqué (Mendis-Handagama et Siril Ariyaratre, 2008).

Chez la souris, la T3 diminue l'activité aromatasase des cellules de Sertoli par inhibition directe de la transcription du gène de l'aromatase (Catalano *et al.*, 2003). *In vitro*, si on traite des cellules de Sertoli de rats prépubères à la T3, il y a diminution de l'expression de l'aromatase (Ulisse *et al.*, 1994; Palmero *et al.*, 1995; Ando *et al.*, 2001). Or, l'activité de l'aromatase disparaît dans les cellules de Sertoli matures. La perte de l'activité de l'aromatase est le signe de la maturation finale des cellules de Sertoli chez le rat (Sharpe *et al.*, 2003).

La T3 est également impliqué dans la régulation de l'expression de composants de la membrane basale comme la laminine, l'entactine et le collagène de type IV dans les cellules de Sertoli de rats *in vitro*. La T3 augmente le nombre de cellules exprimant la laminine et l'entactine alors qu'elle diminue le nombre de cellules exprimant le collagène de type IV (Ulisse *et al.*, 1998).

Ces études *in vitro* suggèrent que la T3 en induisant des changements des composants de la membrane basale pourrait influencer la différenciation morphologique et/ou le maintien de l'état différencié des cellules de Sertoli. Mais, cela n'a jamais été montré *in vivo*.

## 6) Effets de la T3 sur le métabolisme du glucose des cellules de Sertoli

Le développement des cellules germinales dans les tubes séminifères dépend des sécrétions des cellules de Sertoli. Les cellules de Sertoli métabolisent le glucose. Elle le convertisse en lactate, qui sert de substrat énergétique aux cellules germinales (Jutte *et al.*, 1981; Robinson et Fritz, 1981; Mita et Hall, 1982; Grootegoed *et al.*, 1986). La T3 stimule la production de lactate dans les cellules de Sertoli immatures (Palmero *et al.*, 1995). L'augmentation de la production de lactate est associée à l'augmentation du taux d'ARNm du transporteur Glut-1 (Ulisse *et al.*, 1992). Cette augmentation est le mécanisme qui pourrait expliquer l'augmentation de la production de lactate mais, l'action directe de la T3 sur le promoteur du gène Glut-1 n'est pas démontrée car il n'y a pas de TRE dans cette région (Carosa *et al.*, 2005).

# Objectifs

L'objectif de mon travail de thèse était de mieux comprendre les rôles de l'hormone thyroïdienne T3 dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation des cellules de Sertoli à l'aide de modèles d'inactivation génomiques chez la souris.

Comme cela a été décrit dans l'introduction générale, les hypo et hyperthyroïdies, d'origine pathologique chez l'homme ou expérimentale chez l'animal de laboratoire, altèrent la fonction testiculaire.

De nombreuses études *in vitro* ont suggéré le rôle direct de la T3 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli et dans la différenciation des cellules de Leydig et le contrôle de leur activité stéroïdogène. Cependant, l'interprétation de ces mécanismes en dehors du contexte physiologique reste difficile à extrapoler à l'échelle de l'organisme car l'approche *in vitro* ne prend pas en compte la complexité des régulations indirectes et des rétro-contrôles hormonaux. Un autre degré de complexité s'ajoute: c'est celui de l'existence de plusieurs récepteurs à la T3. Ainsi, l'utilisation des outils de génomique fonctionnelle utilisant des modèles transgéniques *ad hoc* paraissent pertinents pour identifier les rôles de ces récepteurs à la T3 dans les fonctions des cellules testiculaires.

Nous nous sommes particulièrement intéressés au récepteur TR $\alpha$ 1, dont l'inactivation totale a été réalisée par Gauthier *et al.* (2001) et dont le phénotype testiculaire a été décrit par Holsberger *et al.* (2005). Ces auteurs ont suggéré l'implication de ce récepteur TR $\alpha$ 1 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli. C'est pourquoi suite à cette publication, il nous est apparu pertinent de poursuivre l'étude de la fonction de ce récepteur TR $\alpha$ 1 dans le testicule: 1- en disséquant son niveau d'action testiculaire en étudiant son rôle dans les cellules de Sertoli (stade post-natal) et les cellules de Leydig (chez l'adulte); 2- en évaluant l'implication de sa forme mitochondriale p43.

Pour atteindre ces deux principaux objectifs de ma thèse, nous avons analysé plusieurs lignées de souris transgéniques présentant soit une inactivation des gènes codants pour les récepteurs TR $\alpha$ 1 et p43, soit une modification génomique sur le locus du récepteur TR $\alpha$ 1. En effet, comme indiqué dans l'introduction générale, le TR $\alpha$ 1 inhibe la transcription de gènes cibles en absence de T3 (aporécepteur, lié aux co-répresseurs) et, la stimule en présence de T3 (holorécepteur, lié aux co-activateurs). Dans le cas de la lignée TR $\alpha$ KO, l'absence de récepteur fonctionnel conduit à une transcription basale des gènes cibles, situation moins délétère que la présence de la forme aporécepteur. De ce fait, pour aborder l'impact répresseur

du récepteur, nous avons utilisé un modèle de souris exprimant un récepteur dominant négatif du TR $\alpha$ 1, le TR $\alpha^{\text{AMI}}$  (Quignodon *et al.*, 2007), qui permet de mimer une hypothyroïdie, par répression constitutive de la transcription des gènes cibles. Dans ce modèle, la mutation (transformation de la leucine 400 en arginine) abolit les interactions avec les co-activateurs à activité histone acétyltransférase. De ce fait, dans ce modèle de dominant négatif, les co-répresseurs sont toujours liés au TR, en absence et en présence de T3.

Dans le cadre de mon premier objectif, pour étudier le rôle de TR $\alpha$ 1 dans les cellules de Sertoli, nous avons fait exprimer le récepteur TR $\alpha^{\text{AMI}}$  dans les cellules de Sertoli via croisement avec la lignée AMH-Cre (Lécureuil *et al.*, 2002), lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC. Nous avons également étudié le rôle de TR $\alpha$ 1 dans les cellules de Leydig adulte afin d'étudier l'effet sur l'activité stéroïdogénique, via croisement avec la lignée Aromatase Cre (thèse de P. Froment *et al.*, données non publiées). Ces deux lignées ont été phénotypées en comparaison avec le KO général de ce récepteur.

Concernant le deuxième objectif de ma thèse, on sait que le gène *THRA* code pour plusieurs isoformes de récepteurs à la T3. Nous avons dans la première partie de cette thèse démontré l'implication du récepteur nucléaire TR $\alpha$ 1 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli mais, il existe un autre récepteur capable de lier la T3 et l'ADN, il s'agit du récepteur mitochondrial p43. Aussi, nous avons envisagé la possibilité que le génome mitochondrial puisse être une cible d'action de la T3 pour le contrôle de l'arrêt de la prolifération des cellules de Sertoli. Nous avons voulu discerner la part des effets génomiques de la T3 et la part du génome mitochondrial dans cette régulation. Via l'analyse d'une autre lignée de souris disponible, la lignée p43KO (Blanchet *et al.*, 2011), nous avons évalué l'implication de l'isoforme mitochondriale p43 (issue de l'ARNm de TR $\alpha$ 1) dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli.

# Résultats

# I. Impact phénotypique de l'inactivation du récepteur TR $\alpha$ 1 dans les cellules de Sertoli et cellules de Leydig, par inactivation ciblée

## A. Conséquences de l'expression du dominant négatif TR $\alpha^{\text{AMI}}$ dans les cellules de Sertoli sur la fonction du testicule

### 1) Contexte

De nombreuses études ont montré que des changements dans le statut thyroïdien - hypothyroïdie ou hyperthyroïdie- altèrent la fonction testiculaire. L'hormone thyroïdienne T3 agit via des récepteurs nucléaires appelés TRs. Les travaux de Cooke et ses collaborateurs ont montré que l'invalidation de ce récepteur TR $\alpha$ 1 (lignée TR $\alpha$ 0) conduit à un phénotype testiculaire chez l'adulte comparable à ce que l'on peut observer dans le cas d'un hypothyroïdisme.

Du fait du contexte complexe des actions de la T3 à différents niveaux de l'axe hypothalamus/hypophyse/testicule et de la présence de différentes isoformes de TRs, les mécanismes cellulaires de son action *in vivo* sont encore méconnus. Dans le testicule, l'hypothèse de l'implication de TR $\alpha$ 1 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli est fortement suggérée par Holsberger en 2005.

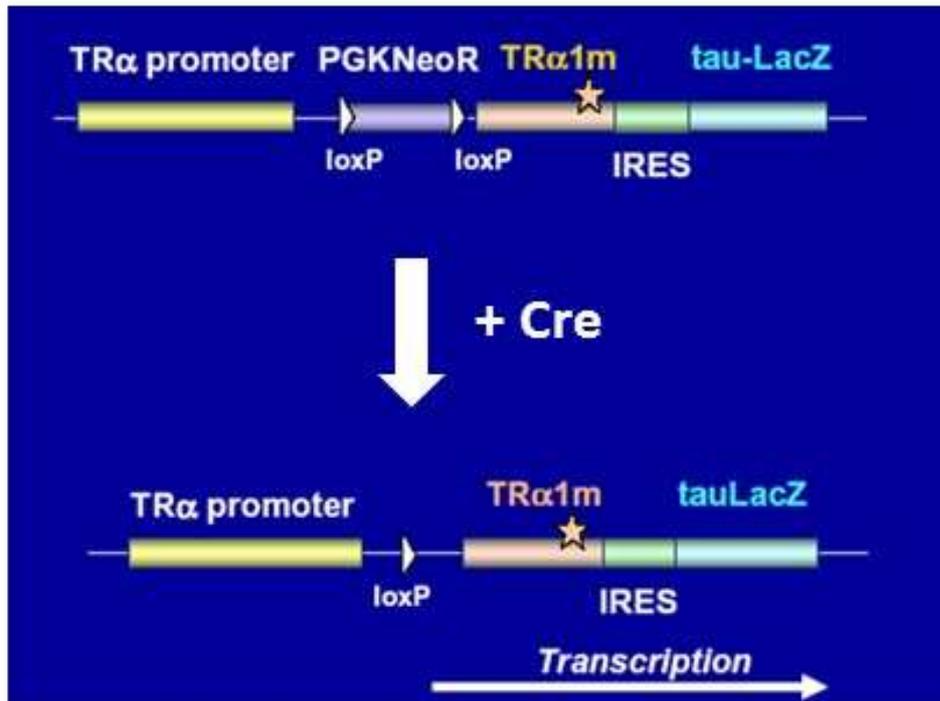


Figure 27: La construction TR $\alpha^{AM1}$

Les souris TR $\alpha^{AM1}$  ont été créées par Frédéric Flamant (Quignodon et al., 2007). Ces souris possèdent un récepteur TR $\alpha 1$  qui porte la mutation L400R, qui a été introduite par mutagenèse dirigée. Cette mutation correspond à la transformation de la leucine 400 en arginine, elle abolit les interactions avec les co-activateurs à activité histone acétyltransférase. Le récepteur TR $\alpha^{AM1}$  est un récepteur mutant à effet dominant négatif. Grâce à la présence de sites LoxP, l'utilisation d'une Cre recombinase permet d'exprimer ce récepteur de façon conditionnelle.

Nous avons décidé de tester l'hypothèse que la régulation de la prolifération des cellules de Sertoli T3-dépendante est autonome et directe via le TR $\alpha$ 1 grâce à la disponibilité d'outils génomiques adéquats.

Pour cela, nous avons généré la lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC. Dans cette lignée, il y a expression d'un récepteur dominant négatif de TR $\alpha$ 1, uniquement dans les cellules de Sertoli via l'utilisation de la lignée AMH-Cre.

Les souris TR $\alpha^{\text{AMI}}$  ont été créées par Frédéric Flamant (Quignodon *et al.*, 2007). Ces souris possèdent un récepteur TR $\alpha$ 1 qui porte la mutation L400R, qui a été introduite par mutagenèse dirigée. Cette mutation correspond à la transformation de la leucine 400 en arginine, elle abolit les interactions avec les co-activateurs à activité histone acétyltransférase. Le récepteur TR $\alpha^{\text{AMI}}$  est un récepteur mutant à effet dominant négatif. Grâce à la présence de sites LoxP, l'utilisation d'une Cre recombinase permet d'exprimer ce récepteur de façon conditionnelle. La mutation L400R a été introduite dans la séquence d'ADNc de TR $\alpha$ 1 par mutagenèse dirigée. Un vecteur d'expression conditionnelle a été construit pour exprimer de façon conditionnelle le TR $\alpha$ 1L400R ainsi qu'un gène rapporteur Tau-LacZ. Il y a présence d'une séquence IRES (Internal Ribosome Entry site). Elle permet d'initier la traduction à l'intérieur d'un transcrit. L'expression conditionnelle consiste en l'utilisation du système Cre/LoxP (Figure 27). En amont de la séquence TR $\alpha$ 1L400R/IRES/Tau-LacZ, la construction possède une cassette floxée contenant le gène de résistance à la néomycine NeoR et un signal de polyadénylation qui arrête la transcription. Cette cassette bloque l'expression et du récepteur muté et, du gène rapporteur. Lorsque la recombinase Cre est exprimée, la cassette est excisée, le TR $\alpha$ 1 muté est exprimé, de même que le gène rapporteur. La construction a ensuite subi une recombinaison homologe dans des cellules souches embryonnaires. Les clones cellulaires détectés comme recombinants ont ensuite été injectés dans des blastocystes pour l'obtention des fondateurs de la lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ .

Nous avons croisé les souris homozygotes TR $\alpha^{\text{AMI}}$  avec la lignée hétérozygote AMH-Cre pour faire exprimer le récepteur dominant négatif uniquement dans les cellules de Sertoli dès 14,5 jpc (Lécureuil *et al.*, 2002). Les animaux d'intérêt sont nommés TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC et les témoins, présents dans les portées, sont nommés Cre-. Dans ce modèle, seule la forme TR $\alpha$ 1 est mutée.



Figure 28: Expression de TR $\alpha$ 1 dans le testicule de souris

L'ARNm de TR $\alpha$ 1 est détecté par RT-PCR (720pb) dans le testicule entier de 0 jpp à 22 jpp et dans des fractions enrichies de cellules de Sertoli et de cellules interstitielles provenant de testicules à 10 jpp. En contrôle, l'expression de l'actine (411pb) est présentée.

Les souris TR $\alpha^{0/0}$  (aussi notées TR $\alpha 0$ ) ont été caractérisées par Karine Gauthier (Gauthier *et al.*, 2001). Elles ont été utilisées par Holsberger et collaborateurs pour leurs études. Ces souris sont KO pour l'isoforme TR $\alpha 1$ , qui est issue du gène *THRA*. Nous les avons utilisés pour les comparer aux souris TR $\alpha^{AM1}$ -SC afin de faire la part des niveaux de l'axe impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli par la T3.

## 2) Résultats et discussion

L'ensemble des résultats est présenté dans l'article 1 « Thyroid hormone limits post-natal Sertoli cell proliferation by activation of its alpha1 isoform (TR $\alpha 1$ ) receptor and regulation of Cdk4/JunD/c-myc mRNA levels » (soumis à *Endocrinology* le 21 Octobre 2011). Je vais résumer et discuter les principaux résultats, en les complétant de données supplémentaires (figures 26 à 30).

Nous avons tout d'abord vérifié la présence de TR $\alpha 1$  dans les cellules de Sertoli car cette donnée n'était pas montrée chez la souris (Figure 28).

A l'âge adulte, les souris qui expriment le dominant négatif TR $\alpha^{AM1}$  dans les cellules de Sertoli, présentent un poids testiculaire et une réserve spermatique significativement plus élevés, comparés aux contrôles. Les animaux TR $\alpha^{AM1}$ -SC et TR $\alpha 0$  présentent une fertilité normale. L'histologie testiculaire est également normale, tous les stades de différenciation des cellules germinales sont observés. Les niveaux de testostérone, basaux et sous stimulation hCG, ne sont pas modifiés pour les deux lignées, suggérant que le statut androgénique est normal et que l'activité leydigienne n'est pas altérée.

La présence du récepteur dominant négatif dans les cellules de Sertoli suffit à reproduire le phénotype observé chez les TR $\alpha 0$ . C'est donc le récepteur TR $\alpha 1$  sertolien qui est à l'origine du phénotype testiculaire caractéristique de l'hypothyroïdie néonatale. Nous avons analysé la prolifération des cellules de Sertoli au cours du développement post-natal afin de vérifier l'hypothèse que l'augmentation de la réserve spermatique avait pour origine une augmentation du nombre de cellules de Sertoli, comme suggéré (mais non démontré) par Holsberger *et al.* (en 2005) pour les souris TR $\alpha 0$ .

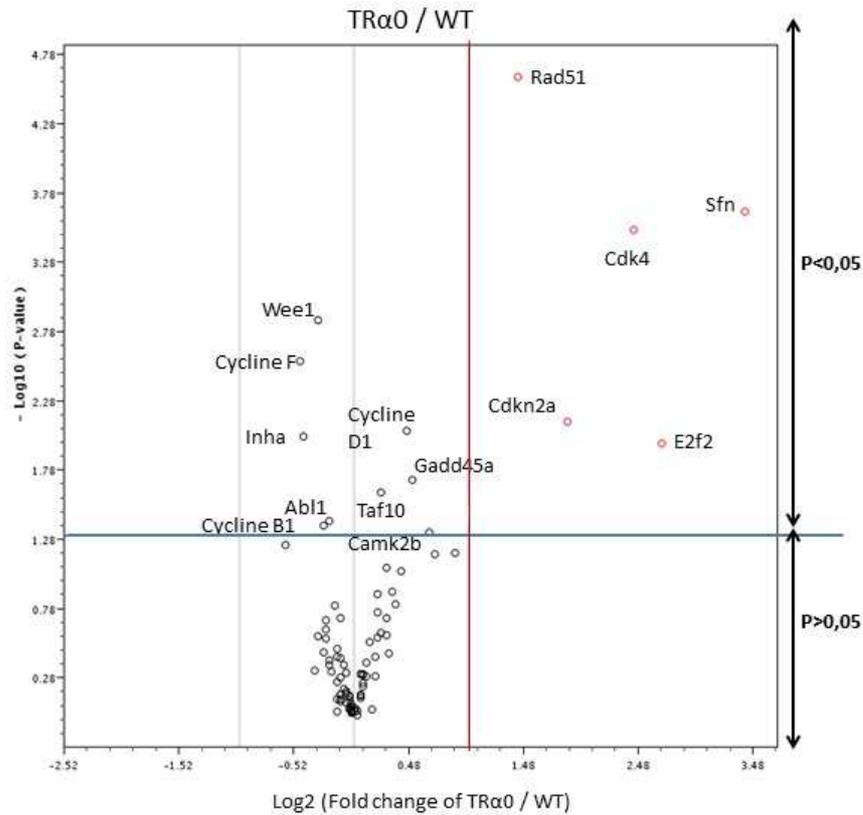


Figure 29: L'expression des gènes du cycle cellulaire est impactée dans les testicules TRα0 à 3 jpp

Ce graphe est une représentation arbitraire en « Volcano Plot » du fold change (FC) pour chaque gène analysé. Il représente le Log2 du fold change pour chaque expression de gène en comparant le groupe TRα0 (n=4) au groupe contrôle WT (n=4) versus le -Log10 de la p-value issue d'un test t. La 3ème ligne verticale (rouge) indique un changement supérieur à 2. La ligne horizontale (bleue) indique le seuil de significativité de la p-value qui est de 0,05.

5 gènes sont sur-exprimés chez les TRα0 (cercles rouges).

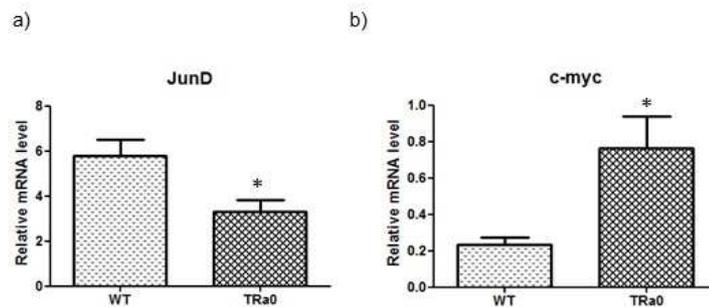


Figure 30: Les expressions de JunD et c-myc sont modifiées dans les testicules TRα0 à 3 jpp. Le niveau d'ARNm de JunD est significativement diminué chez les TRα0 (a; p<0,05). A l'inverse, l'expression de c-myc est augmenté significativement chez les TRα0 (b; p<0,05). (n=4/génotype).

A 0 et 3 jours *post-partum*, l'index de prolifération des cellules de Sertoli est significativement augmenté chez les TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC par rapport aux témoins. Cette augmentation à 3 jpp est également observée chez les TR $\alpha$ 0 et l'amplitude est similaire. A 10 jpp, la prolifération est stoppée dans les deux lignées, comme chez leurs témoins. On a donc une augmentation de l'efficacité de la phase de prolifération mais, la durée de la phase de prolifération ne semble pas affectée. Nos travaux montrent que le phénotype des adultes TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC et TR $\alpha$ 0 a pour origine une augmentation de la prolifération des cellules de Sertoli. Nos résultats de cultures organotypiques de testicules à 3 jpp, en présence ou non de T3, démontrent que l'effet de la T3 sur la prolifération des cellules de Sertoli est direct. Nous avons recherché les cibles de l'action de la T3 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli. Nous avons montré que l'expression du dominant négatif ou l'inactivation du récepteur TR $\alpha$ 1 induit une augmentation de 28 fois de l'expression de Cdk4 ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes Apbb1, Cdkn2a et Sfn (Figure 29). Enfin, nous avons identifié des facteurs de transcription qui régulent l'expression de Cdk4. L'expression de JunD est significativement diminuée et l'expression de c-myc est significativement augmentée (Figure 30).

Contrairement aux travaux de Cooke, le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli n'implique pas p21Cip1 et p27Kip1. Nous montrons que Cdk4, Cdkn2a et Sfn sont impliqués dans ce contrôle dans les deux lignées TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC et TR $\alpha$ 0, cette voie est donc prédominante. De plus, chez les deux lignées, l'augmentation de Cdk4 s'accompagne d'une diminution de l'expression de JunD et une augmentation de celle de c-myc.

Il y a d'autres gènes du cycle cellulaire qui sont touchés chez les TR $\alpha$ 0, ce qui est logique car, dans ce modèle, l'inactivation totale du récepteur TR $\alpha$ 1 a pour conséquence des perturbations des différents niveaux de l'axe hypothalamus/hypophyse/testicule, certaines perturbations pouvant être la résultante de rétro-contrôles et de phénomènes compensatoires. Parmi les gènes qui n'ont pas été observés comme « répondant » à l'inactivation de TR $\alpha$ 1 dans les cellules de Sertoli, on trouve: E2f2 (+6,43 fois) et Rad51 (+2,70 fois). Les cyclines B1 et F sont significativement diminuées de -1,20 et -1,38 fois respectivement et la cycline D1 est significativement augmentée de 1,38 fois. Les E2f sont des facteurs de transcription responsables de la progression en G1 lors du cycle cellulaire. Il a été montré *in vitro* sur des cellules précurseurs d'oligodendrocytes en différenciation que la T3 inhibe de manière directe

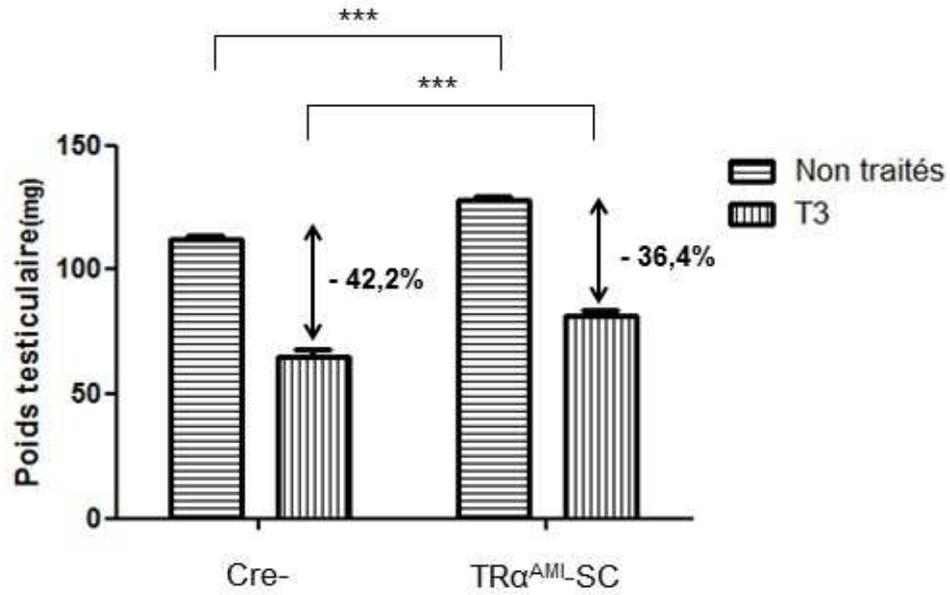


Figure 31: Effets du traitement à la T3 sur le poids testiculaire des TR $\alpha^{AMI}$ -SC à 4 mois

Le poids testiculaire des témoins à 4 mois est diminué de 42,2% lorsque les animaux sont traités à la T3 pendant les 15 premiers jours de vie post-natale. Chez les TR $\alpha^{AMI}$ -SC, la diminution de poids testiculaire est aussi significative mais moins importante: 36,4% de diminution suite aux injections de T3.

(Non traités: n= 20 pour les Cre- et n=28 pour les TR $\alpha^{AMI}$ -SC; traités T3: n=8 et n=6).

les E2f (Nygard *et al.*, 2003). Pibiri et ses collaborateurs (2001) ont montré que la T3 augmente l'expression des E2f dans des hépatocytes de rat en prolifération. L'inhibition de la prolifération des cellules de Sertoli induite par la T3 pourrait donc impliquer des effets directs de la T3 sur E2f.

L'expression de Rad51 est étroitement associée à l'état de prolifération des cellules et probablement impliqué dans la réparation de l'ADN couplée à la réplication (Yamamoto *et al.*, 1996).

L'augmentation de l'expression de la cycline D1 va de pair avec l'augmentation de Cdk4 puisque la cycline D1 est connue pour se complexer avec les Cdk4; Cdkn2a est d'ailleurs connus pour inhiber ces complexes.

Pour poursuivre la caractérisation de cette lignée, nous avons analysé son phénotype testiculaire en conditions stimulées *in vivo*. L'idée était de voir si la présence du TR $\alpha^{\text{AMI}}$  dans les cellules de Sertoli (qui induit une « hypothyroïdie locale ») pouvait réduire l'impact de l'effet d'une hyperthyroïdie sur la fonction testiculaire. Pour cela, nous avons réalisé des injections de T3 à nos souris TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC: 1,5  $\mu\text{g/g}$  de souriceau de la naissance jusqu'à 15 jpp, c'est-à-dire durant la période de prolifération post-natale des cellules de Sertoli) puis, regardé le poids testiculaire à l'âge adulte.

Une diminution du poids testiculaire induite par la T3 est observée chez les TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC et contrôle (Figure 31). Cependant, elle est significativement plus faible chez les souris exprimant le dominant négatif TR $\alpha^{\text{AMI}}$ . Cette faible réduction pourrait être en partie expliquée par la présence d'un allèle sauvage (les animaux étudiés étant hétérozygotes). Mais, cela suggère l'existence d'une compensation par un autre récepteur (comme par exemple TR $\beta$ 1).

### 3) Perspectives

La comparaison entre le KO général de TR $\alpha$ 1 et le modèle d'inactivation ciblée dans les cellules de Sertoli, nous a permis de mettre en évidence le rôle du TR $\alpha$ 1 sertolien dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli. L'analyse du TR $\alpha$ 0 est difficilement interprétable car l'inactivation générale de TR $\alpha$ 1 a pour conséquence des perturbations des

différents niveaux de l'axe hypothalamus/hypophyse/testicule, certaines perturbations pouvant être la résultante de rétro-contrôles et de phénomènes compensatoires. Aussi, il serait intéressant de faire exprimer le TR $\alpha^{\text{AMI}}$  dans d'autres types cellulaires. Il serait pertinent d'évaluer une possible contribution de l'hypophyse dans le phénotype observé chez les TR $\alpha^0$ . Pour cela, il faudrait générer une nouvelle lignée exprimant le récepteur dominant négatif TR $\alpha^{\text{AMI}}$  spécifiquement dans les cellules gonadotropes en utilisant une autre Cre, telle que la  $\beta\text{LH-Cre}$  (Charles *et al.*, 2008).

Enfin, nous montrons dans cette étude que le phénotype est lié à une augmentation de l'efficacité de la prolifération. A 10 jpp, nous montrons que la prolifération est stoppée suggérant que la phase de prolifération ne serait pas allongée et que la phase de différenciation ne serait pas décalée dans le temps. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser l'expression de marqueurs de la différenciation dans nos modèles afin de le confirmer. Il serait intéressant d'analyser l'expression de facteurs sertoliens différenciellement exprimés au cours de la maturation des cellules de Sertoli: AMH, connexine 43, laminine, entactine et collagène de type IV (Ulisse *et al.*, 1998).

Plusieurs travaux montrent que l'expression de ces facteurs est régulée par la T3. Par exemple l'effet inhibiteur de la T3 sur la prolifération des cellules de Sertoli est corrélé à l'augmentation du niveau de Cx43 dans le testicule post-natal (Gilleron *et al.*, 2006). De plus, le KO spécifique de la Cx43 dans les cellules de Sertoli montre que la perte de Cx43 est corrélée à une augmentation de la prolifération et un retard dans la maturation des cellules de Sertoli chez la souris à l'âge adulte (Brehm *et al.*, 2007; Sridharan *et al.*, 2007).

**Thyroid hormone limits post-natal Sertoli cell proliferation by activation of  
its alpha1 isoform (TR $\alpha$ 1) receptor and regulation of Cdk4/JunD/c-  
myc mRNA levels**

**Betty Fumel**, Marie-Justine Guerquin, Gabriel Livera, Christophe Staub, Michèle  
Magistrini, Frédéric Flamant, Florian Guillou, Sophie Fouchécourt

Publication soumise à **Endocrinology** le 21 Octobre 2011

1 **Thyroid hormone limits post-natal Sertoli cell proliferation by activation of its alpha1**  
2 **isoform (TR $\alpha$ 1) receptor and regulation of Cdk4/JunD/c-myc mRNA levels**

3

4 Abbreviated title: TR $\alpha$ 1 limits Sertoli cell proliferation

5 Key words: Sertoli cells, T3, TR $\alpha$ 1

6

7 Betty Fumel<sup>1</sup>, Marie-Justine Guerquin<sup>2</sup>, Gabriel Livera<sup>2</sup>, Christophe Staub<sup>3</sup>, Michèle

8 Magistrini<sup>1</sup>, Frédéric Flamant<sup>4</sup>, Florian Guillou<sup>1</sup>, Sophie Fouchécourt\*<sup>1</sup>

9

10 1 UMR 085 INRA - CNRS - Université de Tours – Institut Français du Cheval et de l'Équitation, 37380 NOUZILLY, France

11 2 INSERM U967, CEA/DSV/iRCM/SCSR/LDG, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, T-92265 FONTENAY-AUX-  
12 ROSES, France

13 3 UE 1297 – INRA – Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière, 37380 NOUZILLY, France

14 4 IGFL UMR 5665 ENSL/CNRS INRALA 913, IFR128 Biosciences Lyon Gerland, 69364 LYON, France

15

16 \*corresponding author address:

17 PRC INRA F-37380 Nouzilly

18 Phone: 33 (0)2 47 42 72 71

19 Fax: 33 (0)2 47 42 77 43

20 sfouchecourt@tours.inra.fr

21

22

23

24 This work was supported by INSERM ("PNRRE grant" ; 2006-2007) and Agence Nationale pour la  
25 Recherche ("Biodiversité, évolution des écosystèmes, écosystèmes productifs, agronomie » grant;  
26 2011-2013). B Fumel is a fellowship of Région Centre, France

27

28 **ABSTRACT**

29

30 Hypo- and hyperthyroidism alter testicular functions in the young. Among T3 receptors, TR $\alpha$ 1 is  
31 ubiquitous and its invalidation (TR $\alpha$ 0/0 line) leads to an adult testicular phenotype characteristic of  
32 hypothyroidism. We tested the hypothesis that TR $\alpha$ 1-dependent regulation of Sertoli cell proliferation  
33 was autonomous and directly regulated by TR $\alpha$ 1 present in these cells. We generated and analyzed the  
34 TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC line which expressed a dominant-negative TR $\alpha$ 1 isoform (TR $\alpha^{\text{AMI}}$ ) in Sertoli cells (SC)  
35 (after crossing with the AMH-Cre line). Adult TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC mice exhibited similar phenotypic features  
36 to the TR $\alpha$ 0/0 line: heavier testicular weight and higher sperm reserve compared to controls. Sertoli  
37 cell density increased significantly as a result of a higher proliferative index at ages P0 and P3. When  
38 testis explants were cultured (at age P3), Sertoli cells responded to an excess of T3 by a drastic  
39 decrease in proliferation in controls. This response was abolished in both TR $\alpha$ 0/0 and TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC.  
40 The inactivation of TR $\alpha$ 1 specifically in Sertoli cells was sufficient to reproduce the same phenotype  
41 observed in adult TR $\alpha$ 0/0. It could be concluded from these results that Sertoli cell proliferation was  
42 cell-autonomously controlled by TR $\alpha$ 1 and was T3-regulated. Quantitative RT-PCR evidenced that  
43 regulation of the Cdk4/JunD/c-myc pathway was involved in this control.

44

45 **INTRODUCTION**

46 Sertoli cells (SC) are essential in spermatogenesis as they play various important roles in  
47 seminiferous tubules. They create cytoplasmic crypts around germ cells and provide nutrients and  
48 growth factors. They also play an immunological role through the creation of specialized tight  
49 junctions and the establishment of the blood-testis barrier. It is well established that SC numbers  
50 condition the efficiency of spermatogenesis as one SC can only support a limited number of germ cells  
51 (1). The number of SC is determined, during the pre-pubertal period, by the efficiency of the  
52 mechanisms controlling their early proliferative phase and entry into differentiation. SC proliferate at  
53 birth, the proliferation rate then declines rapidly during the neonatal period before ceasing completely  
54 at around the age of 15 days in rodents. This event coincides with the establishment of the blood-testis  
55 barrier and the entry into differentiation (2); the number of SC is then considered as definitive (3, 4).

56 It is well established that FSH (Follicle Stimulating Hormone) is mitogenic for immature SC  
57 both *in vitro* and *in vivo* (5-9). The second major endocrine regulator controlling SC proliferation and  
58 entry into differentiation is the thyroid hormone T3 (T4 being the pro-hormone). The T3 receptors are  
59 numerous and ubiquitous and in the latter contrary to the FSH receptor. T3 plays an important role in  
60 several homeostatic biological processes in mammals such as growth, metabolism and the  
61 development of various organs, including the testes. In humans, neo-natal hypothyroidism leads to  
62 testicular enlargement in prepubertal boys (10). In rats, numerous *in vivo* pharmacological studies have  
63 established a correlation between T3 levels and testicular development, including SC proliferation  
64 during the neonatal/prepubertal period or germ cell differentiation. Experimental neonatal  
65 hypothyroidism in rats leads to an increase in the size of testes and the reproductive organ, and daily  
66 sperm production in adults (11-15). More recently, Marchlewska and coll. (16) analyzed  
67 hyperthyroidism in rats to show that T3 modulates the initiation of spermatogenesis. In mice, early  
68 hypothyroidism leads to an increase in the size of adult testes and the reproductive organ (17).  
69 However, whether T3 acts directly on the testis and/or via another central component of the  
70 hypothalamo-pituitary-testis (HPT) axis is not yet clear. Indeed, Kirby et al (18) showed that neonatal  
71 hypothyroidism leads to significant modification in circulating LH (Luteinizing-Hormone) and FSH  
72 levels as a putative consequence of gonadal feedback, suggesting a T3-dependent regulation of

73 gonadotrop cell activity. T3 acts directly on gene transcription by binding to thyroid hormone  
74 receptors (TRs). While unliganded receptors recruit transcription corepressors, their conformation  
75 changes upon T3 binding and this enables coactivator recruitment and corepressor release, followed by  
76 activation of the transcription of target genes (19). TRs are encoded by two different genes that are  
77 ubiquitously transcribed: *THRA* and *THRB*. Using alternative splicing and two different promoters,  
78 *THRA* produces 5 mRNAs of which TR $\alpha$ 1 mRNA. The latter, which produces three proteins, the  
79 nuclear isoform TR $\alpha$ 1 and two mitochondrial receptors (p28 and p43; (20)), is ubiquitously expressed  
80 (brain: (21); skin: (22); intestine: (23) ; liver: (24); skeleton: (25); heart: (26)) and is present in rat and  
81 human testicular cells, including SC (10, 27). Holsberger et al. (28) analyzed the TR $\alpha$ 1 knockout  
82 phenotype: so-called TR $\alpha$ 0/0 males have significantly higher testicular weights compared to the wild-  
83 type and a tendency towards a higher daily sperm production and SC numbers in adults; this study  
84 established that the ubiquitous TR $\alpha$ 1, among T3 functional receptors, mediates T3 testicular effects, at  
85 least in the most part. However, the degree of involvement of the HPT axis in this regulation could not  
86 be elucidated with the TR $\alpha$ 0/0 line because of total *THRA* invalidation and increased sensitivity to  
87 thyroid hormones in the pituitary of these mice (29), pituitary being one site of *THRA* expression in  
88 wild-type mice. According to the complex and broad action of T3 in various organs *in vivo*, including  
89 the pituitary, and various testicular cell types (30), including SC, Leydig and germ cells (31), only  
90 targeted functional invalidation of T3 receptors using the Cre-lox system may help to discriminate  
91 indirect from autonomous mechanisms for a specific cell-type and allow local effects to be  
92 distinguished from systemic effects.

93 That is why in the present paper we conducted an *in vivo* functional study by generating a new  
94 mouse line in which a dominant-negative inactivating isoform of TR $\alpha$ 1, the TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> receptor, was  
95 targeted in SC. The mutation prevents interaction with co-activators, while interaction with co-  
96 repressors is maintained so that transcription of T3-regulated genes is repressed, even in the presence  
97 of T3. The line was obtained by crossing two previously characterized lines: TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> (32) and AMH-  
98 Cre (33) and is called TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>- SC. The AMH-cre line has been described perfectly and characterized  
99 as inducing Cre expression only in SC (34-36). The TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>- SC line thus allows us to investigate

100 direct endocrine T3-regulation of SC proliferation through TR $\alpha$ 1. We also aimed to bring to light the  
101 actors in the cell cycle that may be involved in the control of T3-dependent SC proliferation. Our  
102 findings *in vivo* demonstrate that the TR $\alpha$ 1 dominant negative form expressed specifically in SC  
103 increases the proliferation rate in the young and the density in adults. Interestingly and newly, this  
104 phenomenon is accompanied by a strong increase in the mRNA of actors in the cell cycle such as  
105 Cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) and Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Cdkn2a).

## 106 **Materials and methods**

### 107 • Animals

108 Mice were fed a standard laboratory diet and tap water *ad libitum* and maintained under half  
109 light/half dark photoperiods in a temperature-controlled room at 21–23°C. All animal studies were  
110 conducted in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals issued by the  
111 French Ministry of Agriculture and with the approval of a local ethical review committee, under  
112 number 2011-09-10 (Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire).

113 Two lines were analyzed in the present study: 1) Total invalidation of TR $\alpha$ 1: the TR $\alpha$ 0/0 line  
114 (compared to its control 129SV line) was generated by Gauthier et al. (37); its male reproductive  
115 function was first described by Holsberger et al. (28) ; 2) Targeted dominant-negative isoform of  
116 TR $\alpha$ 1 in SC: we crossed heterozygous AMH-Cre mice (33) with homozygous TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> mice and  
117 obtained in the litter heterozygous TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Cre+ referred to TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> allele targeted in  
118 Sertoli Cells) and heterozygous TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Cre- which were used as control mice. TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> mice were  
119 generated and characterized by Quignodon et al. (32), and were used in a previous study (38). The  
120 TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> allele for the *THRA* gene encodes a TR $\alpha$ 1 receptor with an AF-2 mutation that corresponds to  
121 a point mutation changing a leucine to an arginine (L400R). This mutation prevents the recruitment of  
122 histone acetyltransferase coactivators while preserving interaction with histone deacetylase  
123 corepressors and results in a dominant-negative activity (repression of transcription maintained), even  
124 in the presence of T3. Cre recombination is required to express the mutated allele inactivating the  
125 TR $\alpha$ 1 receptor (knock-in).

126 The AMH-Cre line induces Cre-mediated recombination specifically in SC, beginning at the age  
127 of 14.5 days *post-coitum* (33). This line has been used for the functional study of various SC genes by  
128 specific invalidation (34-36). PCR genotyping of CRE, TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> and TR $\alpha$ 0/0 have been described  
129 previously (32, 33, 37).

### 130 • Determination of testis weight and sperm reserve

131 TR $\alpha$ 0/0 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and their respective control mice were sacrificed, one testis was  
132 weighed then frozen for sperm reserve determination as described previously (39). Briefly, testes were

133 disrupted in a glass potter in 3ml of L15 medium (Gibco-Invitrogen) before sonication for 30 seconds.  
134 Remaining sperm nuclei were counted by hemocytometry and whole sperm reserve was determined.  
135 The testicular sperm reserve included spermatozoa and elongating spermatids (stages II-VII) (17). The  
136 testicular sperm reserve/mg was obtained after dividing whole testicular sperm reserve by the weight  
137 of the testis.

138 • Plasma testosterone

139 Mice were treated with an intraperitoneal injection of 15IU/animal of human chorionic gonadotropin  
140 (hCG) (Chorulon). Blood was collected before and two hours after this injection. The plasma was  
141 stored at -20°C until tritium-based testosterone radio-immunoassays were carried out as described  
142 previously (40).

143 • Determination of *in vivo* SC proliferation index

144 TR $\alpha$ 0/0 mice at P3 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC mice at P0, P3, P10 were injected with 50 $\mu$ g/g (of body weight) of  
145 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) (Sigma) that was incorporated in proliferating cells 3 hours before  
146 sacrifice. Testes were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin, and sectioned (4 $\mu$ m). After antigen  
147 retrieval in a boiling sodium citrate buffer (pH 6.0), endogenous peroxidase activity was quenched  
148 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. BrdU immunodetection was performed using a mouse immunoglobulin G monoclonal  
149 antibody (Roche; 1/200), and revealed using a peroxidase labeled polymer conjugated to goat anti-  
150 mouse immunoglobulins (Dako) and a 3-3'-diaminobenzidine chromogen (DAB) (Dako). Negative-  
151 controls were processed without the BrdU antibody. After counterstaining with hematoxylin,  
152 proliferating (BrdU-stained) and quiescent SC were counted (blindly) for a total of 1000 SC per  
153 animal using Histolab (GT Vision) analysis software.

154 • Organotypic cultures of TR $\alpha$ 0/0 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC testicular explants

155 Testes of TR $\alpha$ 0/0 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> mice at P3 were cut into small pieces for organotypic cultures on  
156 floating membranes. Culture conditions were set exactly as described previously (41, 42), except that  
157 T3 (0.2 $\mu$ M) or a vehicle (1X PBS-0.025N NaOH) was added to the medium. Explants were cultured  
158 for 72 hours, BrdU was added (at a final concentration of 0.01 mg/ml) for the last 3 hours and then  
159 they were fixed in Bouin's fixative for BrdU immunostaining.

160 • Histology, diameter, surface measurement, and cell counting

161 In order to measure the seminiferous tubule diameters and surface areas (using Morphostrider  
162 software) and to determine SC and round spermatid (RS) densities, testes (n=4 per genotype) were  
163 fixed in 4% 0.1M glutaraldehyde/cacodylate buffer and further fixed in 1% osmium tetroxide in  
164 cacodylate buffer prior to being embedded in Epoxy resin. Tissue sections of 1 $\mu$ m were prepared and  
165 stained with toluidine blue.

166 Two testicular pieces were prepared per animal and three series of tissue sections (25 $\mu$ m apart so as to  
167 avoid analyzing the same area) per piece were processed. A total of 200 round tubules (per animal)  
168 were selected for diameter measurements. In parallel, 200 randomly-picked tubules (per animal) were  
169 visualized: 1) to count SC and RS (from stages I to VI of the seminiferous epithelium cycle (43))  
170 inside each tubule; 2) to measure the surface area (in  $\mu$ m<sup>2</sup>) of each tubule. The SC and RS densities per  
171 unit area (cell number/ $\mu$ m<sup>2</sup>) of tubule were calculated using these parameters.

172 • RNA extraction and quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

173 Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's  
174 instructions.

175 To quantify the expression of genes involved in the cell cycle, we used Mouse Cell cycle RT<sup>2</sup>  
176 Profiler PCR Array technology (Qiagen; <http://www.sabiosciences.com/PCRArrayPlate.php>) as  
177 recommended by the manufacturer and used by others (44). Gene expression levels were normalized  
178 using five reference genes including in the array: glucuronidase  $\beta$ , hypoxanthine guanine, heat-shock  
179 protein90ab1, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and  $\beta$ actin. The comparative cycle  
180 threshold (Ct) method was used to calculate the relative quantification of gene expression. The fold  
181 change (FC), which represents the variation in the level of expression between TR $\alpha$ <sup>AM1</sup>-SC and the  
182 control, was calculated using the web-based RT<sup>2</sup> profiler PCR Array Data Analysis program. A list of  
183 differentially expressed genes was identified using a 2-tailed *t*-test, the criteria being a *P* value <0.05  
184 (*t*-test) and a mean difference equal to or greater than 2-fold (top right area).

185 To determine JunD, c-myc and  $\beta$ actin mRNA levels by qRT-PCR, RT was performed using  
186 M-MLV-RT (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Quantitative RT-PCR  
187 reactions were performed using SYBR Green SuperMix (Biorad) according to the manufacturer's

188 instructions and run in triplicate in an iCycler (Biorad). Specific primers and hybridization  
189 temperatures are indicated in Table 1. Each target gene transcript level was normalized on the basis of  
190 the transcript levels for the constitutive housekeeping gene  $\beta$ actin in order to control the differences in  
191 RNA concentrations between each sample.  $\beta$ Actin mRNA levels were almost similar in samples.

192 • Statistical analysis

193 All data are presented as means  $\pm$  SEM. To compare means between two groups, the Student's *t*  
194 test or Mann-Whitney test, in case of differences in variance (Fisher test), was performed. Other  
195 comparisons were performed using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test.  $P < 0.05$   
196 was considered significant. Statistical analyses for the interpretation of the "Volcano Plot" in Figure  
197 6a (see details in the legend) were proposed by the web-based RT<sup>2</sup> profiler PCR Array Data Analysis  
198 program.

199 **Results**

200 **TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC testicular phenotype is similar to that of TR $\alpha$ 0/0 in adulthood**

201 In wild-type mice, TR $\alpha$ 1 mRNA was present in the whole testes during post-natal  
202 development and in SC-enriched fractions from P10 testes (data not shown). TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC mice were  
203 obtained by crossing heterozygous AMH-Cre mice with homozygous TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> mice, and were  
204 compared with control mice (referred to as Cre-) present in the litters. Moreover, we carried out a  
205 phenotypic comparison with TR $\alpha$ 0/0 males (whose own controls are referred to as WT). At 4 months,  
206 both TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and TR $\alpha$ 0/0 exhibited a significant increase in testis weight compared to the  
207 respective controls (Fig 1a) but without any change in body weight. This increase in testis weight was  
208 the consequence of a significant increase in whole testicular sperm reserve (Fig1b). Moreover,  
209 testicular sperm reserve expressed per mg of testis also exhibited a significant increase in both lines  
210 (Fig1c). No change in fertility and no qualitative histological alterations in seminiferous tubule  
211 structures were observed in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC, with all germ cell differentiation stages being present (data  
212 not shown). In order to investigate a putative effect on Leydig cell steroidogenic activity, we measured  
213 testosterone levels in two conditions: basal and hCG stimulation levels. As expected, the latter induced  
214 a significant increase in blood testosterone levels in all lines (Fig2). No significant difference between

215 the lines was observed for the basal and stimulated levels. Dominant negative TR $\alpha$ 1 specifically in SC  
216 was sufficient to reproduce the same phenotype observed in adult TR $\alpha$ 0/0.

217 **Testicular phenotype of adult TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC is the consequence of increased SC proliferation index**  
218 **during post-natal development**

219 To investigate further the testicular phenotype in adult TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC, we examined the SC  
220 density in seminiferous tubules (see details in Material and Methods). At the age of 4 months, TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-  
221 SC exhibited a significant increase in SC density (Fig 3a; TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC :  $0.96 \cdot 10^{-3} \pm 0.02 \cdot 10^{-3}$  SC/ $\mu\text{m}^2$  ;  
222 *versus* Cre-:  $0.78 \cdot 10^{-3} \pm 0.01 \cdot 10^{-3}$  SC/ $\mu\text{m}^2$ ), whereas the RS density (stages I to VI of the seminiferous  
223 epithelium cycle) did not change (TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC:  $5.9 \cdot 10^{-3} \pm 0.08 \cdot 10^{-3}$  RS/ $\mu\text{m}^2$  *versus* Cre-  $6.0 \cdot 10^{-3}$   
224  $\pm 0.05 \cdot 10^{-3}$  RS/ $\mu\text{m}^2$ ). The RS/SC ratio was 6.1 and 7.7 for TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and the controls, respectively.  
225 This observation was correlated with a decrease in diameter of the seminiferous tubules (Fig 3b). To  
226 explain the increase in SC density, we evaluated the proliferation rate of these cells (Fig 4). In TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-  
227 SC, the percentage of SC incorporating BrdU within 3 hours was counted at age P0, P3, and P10 and  
228 in TR $\alpha$ 0/0 at P3 (Fig 4a). The SC proliferation index was significantly higher in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC testes  
229 than in Cre- controls at P0 and P3, whereas at P10, it was similar to the controls (Fig 4b). A similar  
230 increase in the SC proliferation index was also observed for TR $\alpha$ 0/0 at P3 compared to WT. Both  
231 control lines (Cre- and WT 129SV) had similar proliferation indices. All together, from these results it  
232 can be concluded that: 1) the phenotype in adult TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC originated from the increased SC-  
233 proliferation index in the young before P10; 2) as SC had similar proliferative features in both lines,  
234 the SC deficit in TR $\alpha$ 0/0 explains the testicular phenotype in this line, confirming that dominant  
235 negative TR $\alpha$ 1 specifically in SC was sufficient to reproduce the same phenotype observed in adult  
236 TR $\alpha$ 0/0. It can thus be concluded that SC proliferation efficiency is controlled cell-autonomously by  
237 SC TR $\alpha$ 1.

238 **The increase in SC proliferation in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and TR $\alpha$ 0/0 mediated by TR $\alpha$ 1 during post-**  
239 **natal development is T3-dependent**

240 We wished to investigate if the control exerted by TR $\alpha$ 1 on the SC proliferation index  
241 described above was modulated in the presence of T3. To do so we used organotypic cultures in which  
242 SC proliferation was measured in testes explanted at P3 from both TR $\alpha$ 0/0 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC, and from  
243 their respective controls, in the presence or not of exogenous T3. The advantage of this system was  
244 that local effects could be observed without interference from putative systemic effects (that would be  
245 observed in the case of *in vivo* treatment).

246 Firstly, in basal conditions (without T3) the SC proliferation index in both lines was not  
247 different from their respective controls. Secondly, T3 induced a significant decrease in the SC  
248 proliferation index in both control lines (Cre- and WT). Thirdly, the proliferation index did not change  
249 under T3 stimulation in either TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (Fig5a) or TR $\alpha$ 0/0 (Fig5b), which both exhibited the same  
250 index with or without T3. The loss of T3 action in both TR $\alpha$ 0/0 and TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC testes proved that the  
251 characterized testicular phenotype in both lines was T3-dependent. In both controls, SC responded to  
252 an excess of T3 by a drastic decrease in proliferation. This response was abolished in both TR $\alpha$ 0/0 and  
253 TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC. This supports the notion that the inability of SC to respond to T3 in both mutants was  
254 sufficient to explain the observed phenotype.

### 255 **Cell cycle gene expression is changed in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC P3 testes**

256 In order to highlight actors in the cell cycle putatively involved in the increase in SC  
257 proliferation observed in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC at P3, we analyzed 84 candidate genes (Supplemental table 1)  
258 which are known to be involved in the cell cycle using the RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array. We found 4  
259 significantly upregulated genes (Fig 6a, triangles) (2-tailed t-test; p<0.05; main difference equal to or  
260 greater than 2-fold): Cdk4 (Cyclin-dependent kinase 4; 27.99 fold), Sfn (Stratifin; 4.36 fold), Apbb1  
261 (Amyloid beta A4 precursor protein-binding, family B, member 1; 3.42 fold) and Cdkn2a (Cyclin-  
262 dependent kinase inhibitor 2A; 2.84 fold). No downregulated genes were found (Supplemental table  
263 1). mRNA levels of cyclins (Ccn), cyclin-dependent kinase (Cdk) or cyclin-dependent kinase  
264 inhibitors (Cdkn) including Cdkn1b (p27<sup>kip1</sup>) were unchanged.

265 It is known that Cdk4 transcription is controlled by two main regulators: JunD (repressor, (45, 46))  
266 and c-myc (activator, (47, 48)), whose mRNA were not present in the array. So, to consolidate our  
267 finding regarding the involvement of Cdk4, we measured their mRNA levels in P3 TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC testes

268 using quantitative RT-PCR with specific primers (Table1). A 3-fold decrease in JunD mRNA (Fig 6b)  
269 and a 2-fold increase in c-myc mRNA (Fig 6c) were observed.

## 270 **Discussion**

271 We generated a new line called TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC where the TR $\alpha$ 1 function is abrogated only in  
272 Sertoli cells. We found that this led to a testis phenotype that is very similar to the phenotype in  
273 TR $\alpha$ 0/0 knockout mice. Indeed, introducing a dominant-negative TR $\alpha$ 1 isoform specifically in SC  
274 increased the testicular sperm reserve and testis weight, as observed in the case of induced post-natal  
275 hypothyroidism and in TR $\alpha$ 0/0 mutant mice. This strongly suggests that the TR $\alpha$ 0/0 testicular  
276 phenotype resulted from the inactivation of the T3/TR $\alpha$ 1 pathway in SC. The similarity between the  
277 two mouse models (see supplemental table 2) leads us to conclude that the consequences of expressing  
278 the dominant-negative TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> (TR $\alpha$ 1L400R) receptor in SC are no more detrimental than the absence  
279 of TR $\alpha$ 1 in this cell type. This is in contrast with the situation observed in several other cell types  
280 where the dominant negative mutation has a much stronger effect than the knockout (32, 38, 49, 50).

281 Previous pharmacological studies using neonatal hypothyroid rats suggest that T3 influences  
282 Leydig cell numbers and activity (51, 52) as well as plasma testosterone levels (53). TR $\alpha$ 1  
283 inactivation in TR $\alpha$ 0/0 or dominant-negative TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC did not impair testosterone levels (basal or  
284 stimulated) compared to the controls. We thus hypothesized that the alterations observed in  
285 pharmacological models may involve other TRs, putatively TR $\beta$ 1, also expressed during testis  
286 development (28).

287 To investigate further the TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC testicular phenotype, we performed SC and RS counts  
288 for densities determination. We observed that the SC density increased in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC testes compared  
289 with controls, while the RS density remained unchanged. The increase in the SC density is in  
290 accordance with the tendency toward an increase in SC numbers described in TR $\alpha$ 0/0 testes (28). As a  
291 consequence of the increase in the SC density and the unchanged RS density, the number of RS per  
292 SC was reduced by 21%. The decrease in the RS/SC ratio reflects the attenuated ability of Sertoli cells  
293 to support a normal number of germ cells during differentiation and this is completely in accordance  
294 with what has been described in adult rats after neonatal hypothyroidism by Hess and coll. (54) where

295 the germ cell differentiation yield decreased by 28%. In both our model and that of the hypothyroid rat  
296 of Hess and coll., despite the decrease in yield, the testicular production (whole testis reserve)  
297 increased, reflecting the compensation via an increase in the total number of SC. From the result in  
298 TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC it can be concluded that the SC T3/TR $\alpha$ 1 pathway influences germ cell differentiation as  
299 expected. We also evidenced a decrease in diameter of seminiferous tubules in adult TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC  
300 compared to controls which could be a consequence of a shrinking process consecutive to spatial  
301 competition between SC. This result is in accordance to the result of Holsberger and coll. : they found  
302 a significant decrease in the lumen diameter at P10 in TR $\alpha$ 0/0 (28). Hess and coll. (54) measured this  
303 parameter in an adult rat model after neonatal hypothyroidism and found larger diameters (+10%)  
304 compared to controls. This may be due to the fact that hypothyroidal rats obtained after neonatal PTU-  
305 treatment exhibit different alterations as a result of numerous additional effects (systemic and local,  
306 involving all testicular cells and other TRs other than TR $\alpha$ 1). This may also be due to variations  
307 between species. On the contrary, our model only allows the contribution of SC in the “high testis  
308 weight” characteristic of hypothyroidism to be deciphered and this is why more alterations (involving  
309 the global T3 regulation with its various receptors) are observed in pharmacological hypothyroidism  
310 models.

311 To understand the increase in SC density observed in adults we investigated the SC  
312 proliferation index early during the post-natal period when it is the highest (i.e. at P0/P3). In both  
313 TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and TR $\alpha$ 0/0 SC proliferation index is significantly higher than in their respective controls.  
314 The control mice exhibited a proliferation index similar to published data (17). No more differences  
315 between controls and the animal of interest were observed at P10, in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC or TR $\alpha$ 0/0,  
316 confirming the results of Holsberger et al. at the same age (28). Finally, SC proliferation efficiency is  
317 controlled cell-autonomously by SC TR $\alpha$ 1 but probably not the length of the proliferative phase.  
318 Joyce et al. (17) showed that compared to controls a greater difference in the SC proliferative index  
319 measured in neonate PTU-treated mice was observed at P10 than at P0, followed by an extension of  
320 the proliferative period (to J20). Once again, in this model all the TRs in the various organs of the  
321 HPT axis were “affected” by hypothyroidism, thus the extension of the proliferative phase described  
322 may involve either other TRs or systemic feed-back regulations. Finally, our results based on two

323 TR $\alpha$ 1 invalidation models allowed us to conclude that the phase length is not dependent on this  
324 receptor and that the increase in the TR $\alpha$ 1-dependent proliferation index of SC is sufficient to cause  
325 the “high testicular weight” observed in adulthood. Thus, the entry into differentiation of SC is  
326 probably dependent on other TRs, putatively TR $\beta$ 1.

327 Another interesting result from our study was obtained using the well-established organotypic  
328 culture system (41, 42) that enabled us to observe the effect of molecules directly on testis cells,  
329 without interference from central or endocrine regulation. Interestingly, the T3 maximal binding  
330 capacity of testicular homogenates by nuclear extracts gradually decreased from birth to adulthood  
331 (55). When Holsberger et al. injected T3 *in vivo* at P10, they observed the result of local testicular and  
332 central/endocrine T3-perturbations, and this probably explains why the response to T3 they did  
333 observe was only partially abolished. On the contrary, at P3, when we added T3 to testis explants, the  
334 decrease in the SC proliferation index observed in control mice (similar to that observed above *in vivo*)  
335 was totally abolished in both TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and TR $\alpha$ 0/0. Overall, our results evidenced the autonomous  
336 T3-regulation of SC through TR $\alpha$ 1 negatively controls their proliferation rate.

337 We then focused on actors of the cell cycle related to the proliferative state of SC in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-  
338 SC. Several studies have evidenced that T3 impacts cell cycle regulation in various cell types (56-60),  
339 and T3 target gene(s) related to the cell cycle have been described such as cyclins D1 and E, and Cdk2  
340 (61-63), and CDKs, such as p18 (64, 65). We profiled candidate genes in testes at P3 because this is  
341 an early age range in which the proliferative index is significantly higher in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC than in WT.  
342 Moreover, at this age the testicular cords are mostly made up of SC (66), in such a way that  
343 differences in gene expression will be due to variations in SC gene expression correlated to the  
344 presence of TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>. Our study highlighted changes in the expression of the following genes: Appb1,  
345 Sfn, Cdkn2a and Cdk4/ JunD /c-myc pathway. In TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC the decrease in JunD might contribute to  
346 the considerable increase in Cdk4 that we observed, which might in turn explain the increase in c-myc  
347 expression and SC proliferation. To our knowledge this is the first time that CDK4 upregulation has  
348 been evoked in proliferating SC and interestingly studies of Cdk4<sup>-/-</sup> mice (67) have revealed growth

349 retardation and reproductive dysfunction associated with testicular atrophy and hypoplastic  
350 seminiferous tubules in the testes.

351 Interestingly, in TR $\alpha$ 0/0 we also found that mRNA levels of Cdk4, Cdkn2a and Sfn were  
352 significantly increased as in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (these results are presented in Supplemental data 1) and these  
353 consolidate our observations in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC; however in this model, there were numerous changes in  
354 genomic expression (14 genes significantly altered, like Cylin B1 or E2f2 transcription factor) that  
355 may be the consequence of various levels of perturbations and/or feed-back responses and are thus  
356 difficult to analyze. Finally, our results established a correlation between TR $\alpha$ 1-dependent regulation  
357 of SC proliferation and the CDK4/Jun/myc pathway. This pathway seems to predominate the others,  
358 particularly those which inhibit cell proliferation (increase in Sfn, Apbb1, Cdkn2a). However, our  
359 results do not exclude the implication of other actors of the cell cycle at protein or activity level and  
360 further investigations would be necessary to answer this question. Holsberger et al. showed significant  
361 increase in Cdkn1b (p27<sup>kip1</sup>) protein levels in P10 mice SC subjected to experimental hyperthyroidism  
362 (T3 treatment) (68). However, in TR $\alpha$ 0/0 testes at P10 (euthyroid mice), they did not find any change  
363 in p27<sup>kip1</sup> protein level compared to controls (28) (see supplemental table 2), and this is in accordance  
364 to the observation that Cdkn1b/ p27<sup>kip1</sup> mRNA was not altered in TR $\alpha$ 0/0 testes at P3 (see  
365 Supplemental table 1) and to our result that Cdkn1b/ p27<sup>kip1</sup> mRNA was not altered in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC at  
366 P3 (Fig6a).

367 Expression and/or activity of genes involved in SC differentiation (around puberty) are altered  
368 in the case of hypothyroidism; this is the case for connexin Cx43 (69) and aromatase (70). In parallel  
369 to cell cycle genes involved in T3-regulation of SC proliferation, it would be interesting to study such  
370 genes expression in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC, at ages where differentiation takes place (around puberty).

371 Notably, T3 plays a crucial role in the post-natal development of SC (and probably other  
372 testicular cells), as described in various organs (bone, cerebellum and heart...), post-natal development  
373 being the period when a peak of T3 secretion is observed (71). Overall, the results in adulthood and in  
374 the young evidenced a “superposition” of the phenotypes described in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and TR $\alpha$ 0/0,  
375 clarifying that the higher testicular weight observed in hypothyroidism is, at least for the most part, the

376 result of the SC TR $\alpha$ 1 function. Our results evidenced the autonomous T3-regulation of SC through  
377 TR $\alpha$ 1 that impacts their proliferation rate during post-natal life and increases CDK4 expression.

378

### 379 **Figure Legends**

380 **Figure 1: Testis weight (a), whole testicular sperm reserve (b) and testicular sperm reserve per**  
381 **mg of testis (c) in adult TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC and TR $\alpha$ 0/0 (4 months).** TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC and TR $\alpha$ 0/0 mice exhibited  
382 a significant increase in testis weight compared to controls ( $p < 0.001$ ;  $n = 20$  for cre- and  $n = 28$  for  
383 TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC;  $n = 12$  for WT and TR $\alpha$ 0/0). Whole testicular sperm reserve and sperm reserve expressed  
384 per mg of testis significantly increased in TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively), and in  
385 TR $\alpha$ 0/0 ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  respectively). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM and statistical  
386 analyses were performed using the *t*-test. White squares: cre-; Lined: TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC; Dotted: WT; Double  
387 lined: TR $\alpha$ 0/0

388 **Fig2: Blood testosterone levels in TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC and TR $\alpha$ 0/0 mice, in basal conditions and after**  
389 **hCG stimulation, compared to respective control mice.** No significant difference between the lines  
390 was observed for the basal and stimulated levels; hCG induced a significant increase in testosterone  
391 secretion and this increase was similar in all lines. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM; statistical  
392 analyses: two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test.  $n = 26$  for Cre- and  $n = 16$  for TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -  
393 SC;  $n = 9$  for WT and TR $\alpha$ 0/0. Squares with horizontal lines: basal levels; squares with vertical lines:  
394 stimulated levels.

395 **Figure 3: Sertoli cell density and seminiferous tubule diameter alteration in adult TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC**  
396 **mice.** At 4 months, Sertoli cell density (SC number / tubule surface area in  $\mu\text{m}^2$ ) significantly  
397 increased in TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC ( $p < 0.001$ ) ( $n = 4$  animals per genotype and 200 seminiferous tubules / animal)  
398 (a). TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC mice exhibited a significant decrease in round seminiferous tubule diameters  
399 ( $p < 0.001$ ) ( $n = 4$  animals per genotype and 200 seminiferous tubules / animal) (b). Data are shown as  
400 the mean  $\pm$  SEM and statistical analyses were performed using the Mann-Whitney *U* test. White  
401 squares: cre-; Lined: TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC.

402 **Figure 4: Percentage of *in vivo* proliferating Sertoli cells in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (at P0, P3 and P10) and**  
403 **in TR $\alpha$ 0/0 (at P3).** Immunohistochemical labeling of proliferating SC (stars) and gonocytes (arrow  
404 heads) (bar represents 20 $\mu$ m) revealed BrdU incorporation injected three hours before death in P3  
405 testis (a). BrdU negative and positive Sertoli cells were counted and SC proliferation index was  
406 calculated (b). In TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC testes, proliferation of Sertoli cells increased in P0 and P3 testes  
407 compared to the control, whereas at P10 there was no longer any difference (n=4 / genotype / age). In  
408 TR $\alpha$ 0/0 testes at P3 (n=6), proliferation of Sertoli cells was higher than in the control (n=7) (p<0.001).  
409 Data are shown as the mean +/- SEM; statistical analyses: two-way ANOVA followed by Bonferroni's  
410 post-test. White squares: cre-; Lined: TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC; Dotted: WT; Double lined: TR $\alpha$ 0/0

411 **Figure 5: SC proliferation index in testicular explants from TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and TR $\alpha$ 0/0 mice at P3,**  
412 **using organotypic cultures with or without exogenous T3.** Organotypic cultures of P3 testes from  
413 TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (a; n=6 for controls and n=5 for TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC) and TR $\alpha$ 0/0 (b; n=4 for WT and TR $\alpha$ 0/0)  
414 mice were performed with T3 (200nM) or a vehicle (PBS1X-0.025N NaOH). After 3 days of culture,  
415 BrdU was added three hours before explant fixation. SC proliferation was evaluated as with *in vivo*  
416 proliferation. The SC proliferation index significantly decreased in both controls in the presence of T3  
417 compared to the vehicle (p<0.001). In contrast, T3 had no effect on the SC proliferative index in  
418 TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and TR $\alpha$ 0/0 mice. Data are shown as the mean +/- SEM; statistical analyses: two-way  
419 ANOVA followed by Bonferroni's post-test. White squares: cre-; Lined: TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC; Dotted: WT;  
420 Double lined: TR $\alpha$ 0/0

421 **Figure 6: cell cycle gene expression is impacted in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC testes at P3.**

422 The "Volcano Plot" (a) is an arbitrary representation (proposed by the web-based RT<sup>2</sup> profiler PCR  
423 Array Data Analysis program) of the fold change (FC) for each of the 84 genes in the array. It  
424 represents the Log<sub>2</sub> FC of each gene expression between the TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC group (n=6) and the control  
425 group (n=6) *versus* the negative Log<sub>10</sub> P values from the t-test. The first vertical line indicates fold  
426 changes of 1 (no variation between group). The second vertical line (dotted line) indicates that the  
427 gene expression fold change threshold is 2. The horizontal line indicates that the P value of the t-test

428 threshold is 0.05. There were 4 genes (triangles) which are significantly upregulated between TR $\alpha$ <sup>AM1</sup>-  
429 SC and controls. p27<sup>kip1</sup> (Cdkn1b) mRNA level was not altered. As JunD (b) and c-myc (c) were not  
430 present in the array, RT-qPCR analyses for these genes were performed with TR $\alpha$ <sup>AM1</sup>-SC and control  
431 testes at P3 (n=6 for each group) using specific primers (see Table1). Normalization was achieved  
432 using  $\beta$ -actin levels. JunD mRNA levels significantly decreased (P<0.001) and c-myc increased  
433 (P<0.01). Data are shown as the mean +/- SEM and statistical analyses were performed using the  
434 Student *t* test. White squares: cre-; Lined: TR $\alpha$ <sup>AM1</sup>-SC.

### 435 **Acknowledgements**

436 The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this  
437 scientific work. The authors would like to thank I Fontaine, C Gauthier, B Delaleu and T Delpuech for  
438 their routine technical help; C Duquenne, S Moreno and S Messiaen for their advice in  
439 immunohistochemistry; C Cahier for animal care; K Gauthier, M Govoroun and P Monget for their  
440 helpful discussions.

441

### 442 **References**

- 443 1. **Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA** 1988 Evidence from Sertoli cell-depleted rats  
444 indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells  
445 produced during perinatal development. *Endocrinology* 122:787-794
- 446 2. **Vitale R, Fawcett DW, Dym M** 1973 The normal development of the blood-testis  
447 barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *The Anatomical record*  
448 176:331-344
- 449 3. **Steinberger A, Steinberger E** 1971 Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat  
450 testis in vivo and in organ culture. *Biology of reproduction* 4:84-87
- 451 4. **Nagy F** 1974 An autoradiographic study of the post-natal changes in (3H)leucine  
452 incorporation by Sertoli cell nuclei in rat testes. *J Reprod Fertil* 37:353-359
- 453 5. **Griswold M, Mably E, Fritz IB** 1975 Stimulation by follicle stimulating hormone  
454 and dibutyryl cyclic AMP of incorporation of 3H-thymidine into nuclear DNA of  
455 cultured Sertoli cell-enriched preparations from immature rats. *Current topics in*  
456 *molecular endocrinology* 2:413-420
- 457 6. **Griswold MD, Solari A, Tung PS, Fritz IB** 1977 Stimulation by follicle-stimulating  
458 hormone of DNA synthesis and of mitosis in cultured Sertoli cells prepared from  
459 testes of immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 7:151-165
- 460 7. **Orth JM** 1984 The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell  
461 proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 115:1248-1255

- 462 8. **Meachem SJ, McLachlan RI, de Kretser DM, Robertson DM, Wreford NG** 1996  
463 Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult  
464 Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biology of reproduction* 54:36-44
- 465 9. **Singh J, Handelsman DJ** 1996 Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell  
466 numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *The Journal of*  
467 *endocrinology* 151:37-48
- 468 10. **Jannini EA, Ulisse S, D'Armiento M** 1995 Thyroid hormone and male gonadal  
469 function. *Endocr Rev* 16:443-459
- 470 11. **Cooke PS, Hess RA, Porcelli J, Meisami E** 1991 Increased sperm production in  
471 adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology* 129:244-248
- 472 12. **Cooke PS, Zhao YD, Bunick D** 1994 Triiodothyronine inhibits proliferation and  
473 stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for  
474 increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen  
475 treatment. *Biol Reprod* 51:1000-1005
- 476 13. **van Haaster LH, de Jong FH, Docter R, de Rooij DG** 1993 High neonatal  
477 triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate  
478 tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels.  
479 *Endocrinology* 133:755-760
- 480 14. **Cooke PS, Meisami E** 1991 Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis  
481 and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology*  
482 129:237-243
- 483 15. **Palmero S, Prati M, Bolla F, Fugassa E** 1995 Tri-iodothyronine directly affects rat  
484 Sertoli cell proliferation and differentiation. *The Journal of endocrinology* 145:355-  
485 362
- 486 16. **Marchlewska K, Kula K, Walczak-Jedrzejowska R, Oszukowska E, Filipiak E,**  
487 **Slowikowska-Hilczner J** 2011 Role of FSH and triiodothyronine in Sertoli cell  
488 development expressed by formation of connexin 43-based gap junctions. *Journal of*  
489 *experimental zoology Part A, Ecological genetics and physiology* 315:329-336
- 490 17. **Joyce KL, Porcelli J, Cooke PS** 1993 Neonatal goitrogen treatment increases adult  
491 testis size and sperm production in the mouse. *Journal of andrology* 14:448-455
- 492 18. **Kirby JD, Arambepola N, Porkka-Heiskanen T, Kirby YK, Rhoads ML, Nitta H,**  
493 **Jetton AE, Iwamoto G, Jackson GL, Turek FW, Cooke PS** 1997 Neonatal  
494 hypothyroidism permanently alters follicle-stimulating hormone and luteinizing  
495 hormone production in the male rat. *Endocrinology* 138:2713-2721
- 496 19. **Flamant F, Gauthier K, Samarut J** 2007 Thyroid hormones signaling is getting  
497 more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol* 21:321-333
- 498 20. **Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G** 2001 Thyroid hormone action in  
499 mitochondria. *J Mol Endocrinol* 26:67-77
- 500 21. **Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregon MJ, Escobar del Rey F** 1985 Effects  
501 of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat  
502 embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology*  
503 117:1890-1900
- 504 22. **Ahsan MK, Urano Y, Kato S, Oura H, Arase S** 1998 Immunohistochemical  
505 localization of thyroid hormone nuclear receptors in human hair follicles and in vitro  
506 effect of L-triiodothyronine on cultured cells of hair follicles and skin. *The journal of*  
507 *medical investigation : JMI* 44:179-184
- 508 23. **Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O**  
509 2001 Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and  
510 natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development.  
511 *Molecular and cellular biology* 21:4761-4772

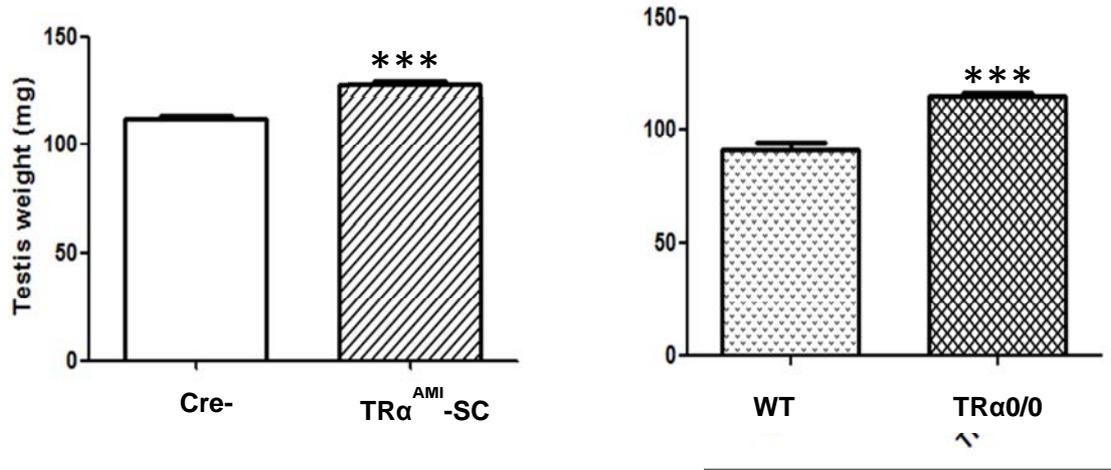
- 512 24. **Zandieh-Doulabi B, Dop E, Schneiders M, Schiphorst MP, Mansen A,**  
513 **Vennstrom B, Dijkstra CD, Bakker O, Wiersinga WM** 2003 Zonal expression of  
514 the thyroid hormone receptor alpha isoforms in rodent liver. *J Endocrinol* 179:379-385
- 515 25. **O'Shea PJ, Harvey CB, Suzuki H, Kaneshige M, Kaneshige K, Cheng SY,**  
516 **Williams GR** 2003 A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in  
517 mice with resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 17:1410-1424
- 518 26. **Stoykov I, Zandieh-Doulabi B, Moorman AF, Christoffels V, Wiersinga WM,**  
519 **Bakker O** 2006 Expression pattern and ontogenesis of thyroid hormone receptor  
520 isoforms in the mouse heart. *J Endocrinol* 189:231-245
- 521 27. **Jannini EA, Crescenzi A, Rucci N, Screponi E, Carosa E, de Matteis A, Macchia**  
522 **E, d'Amati G, D'Armiento M** 2000 Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor  
523 expression in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3453-3457
- 524 28. **Holsberger DR, Kiesewetter SE, Cooke PS** 2005 Regulation of neonatal Sertoli cell  
525 development by thyroid hormone receptor alpha1. *Biology of reproduction* 73:396-  
526 403
- 527 29. **Macchia PE, Takeuchi Y, Kawai T, Cua K, Gauthier K, Chassande O, Seo H,**  
528 **Hayashi Y, Samarut J, Murata Y, Weiss RE, Refetoff S** 2001 Increased sensitivity  
529 to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor  
530 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:349-354
- 531 30. **Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG** 2000  
532 Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod*  
533 62:664-669
- 534 31. **Wagner MS, Wajner SM, Maia AL** 2009 Is there a role for thyroid hormone on  
535 spermatogenesis? *Microsc Res Tech* 72:796-808
- 536 32. **Quignodon L, Vincent S, Winter H, Samarut J, Flamant F** 2007 A point mutation  
537 in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor alpha1 expressed after  
538 CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. *Mol Endocrinol*  
539 21:2350-2360
- 540 33. **Lecureuil C, Fontaine I, Crepieux P, Guillou F** 2002 Sertoli and granulosa cell-  
541 specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* 33:114-118
- 542 34. **De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A,**  
543 **Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou**  
544 **F, Sharpe RM, Verhoeven G** 2004 A Sertoli cell-selective knockout of the androgen  
545 receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1327-  
546 1332
- 547 35. **Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lecureuil C, Guillou F, Wegner M,**  
548 **Scherer G** 2009 Testis cord differentiation after the sex determination stage is  
549 independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev Biol*  
550 327:301-312
- 551 36. **Weider K, Bergmann M, Giese S, Guillou F, Failing K, Brehm R** 2011 Altered  
552 differentiation and clustering of Sertoli cells in transgenic mice showing a Sertoli cell  
553 specific knockout of the connexin 43 gene. *Differentiation* 82:38-49
- 554 37. **Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, Willott**  
555 **JF, Sundin V, Roux JP, Malaval L, Hara M, Samarut J, Chassande O** 2001  
556 Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone  
557 receptor alpha locus. *Molecular and cellular biology* 21:4748-4760
- 558 38. **Fauquier T, Romero E, Picou F, Chatonnet F, Nguyen XN, Quignodon L,**  
559 **Flamant F** 2011 Severe impairment of cerebellum development in mice expressing a  
560 dominant-negative mutation inactivating thyroid hormone receptor alpha1 isoform.  
561 *Dev Biol* 356:350-358

- 562 39. **Lecureuil C, Staub C, Fouchecourt S, Maurel MC, Fontaine I, Martinat N,**  
563 **Gauthier C, Daudignon A, Delaleu B, Sow A, Jegou B, Guillou F** 2007 Transferrin  
564 overexpression alters testicular function in aged mice. *Molecular reproduction and*  
565 *development* 74:197-206
- 566 40. **Hochereau-de Reviere MT, Perreau C, Pisselet C, Fontaine I, Monet-Kuntz C**  
567 1990 Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de  
568 France and Romanov rams. *Domest Anim Endocrinol* 7:63-73
- 569 41. **Livera G, Delbes G, Pairault C, Rouiller-Fabre V, Habert R** 2006 Organotypic  
570 culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell*  
571 *Tissue Res* 324:507-521
- 572 42. **Merlet J, Moreau E, Habert R, Racine C** 2007 Development of fetal testicular cells  
573 in androgen receptor deficient mice. *Cell Cycle* 6:2258-2262
- 574 43. **Oakberg EF** 1956 Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of  
575 the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 99:507-516
- 576 44. **Zhang Q, Xiao X, Feng K, Wang T, Li W, Yuan T, Sun X, Sun Q, Xiang H,**  
577 **Wang H** 2011 Berberine Moderates Glucose and Lipid Metabolism through  
578 Multipathway Mechanism. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2011
- 580 45. **Xiao L, Rao JN, Zou T, Liu L, Marasa BS, Chen J, Turner DJ, Passaniti A,**  
581 **Wang JY** 2007 Induced JunD in intestinal epithelial cells represses CDK4  
582 transcription through its proximal promoter region following polyamine depletion.  
583 *Biochem J* 403:573-581
- 584 46. **Hernandez JM, Floyd DH, Weilbaecher KN, Green PL, Boris-Lawrie K** 2008  
585 Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members.  
586 *Oncogene* 27:4757-4767
- 587 47. **Haas K, Staller P, Geisen C, Bartek J, Eilers M, Moroy T** 1997 Mutual  
588 requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation: evidence for cyclin  
589 D1/CDK4 and p16INK4A as upstream regulators of Myc. *Oncogene* 15:179-192
- 590 48. **Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell**  
591 **BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM, Eick D,**  
592 **Vogelstein B, Kinzler KW** 2000 Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc*  
593 *Natl Acad Sci U S A* 97:2229-2234
- 594 49. **Mittag J, Wallis K, Vennstrom B** 2010 Physiological consequences of the TRalpha1  
595 aporeceptor state. *Heart Fail Rev* 15:111-115
- 596 50. **Flamant F, Quignodon L** 2010 Use of a new model of transgenic mice to clarify the  
597 respective functions of thyroid hormone receptors in vivo. *Heart Fail Rev* 15:117-120
- 598 51. **Hardy MP, Kirby JD, Hess RA, Cooke PS** 1993 Leydig cells increase their numbers  
599 but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism.  
600 *Endocrinology* 132:2417-2420
- 601 52. **Teerds KJ, de Rooij DG, de Jong FH, van Haaster LH** 1998 Development of the  
602 adult-type Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone  
603 levels. *Biol Reprod* 59:344-350
- 604 53. **Antony FF, Aruldas MM, Udhayakumar RC, Maran RR, Govindarajulu P** 1995  
605 Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in hypothyroid rats. *J Endocrinol*  
606 144:293-300
- 607 54. **Hess RA, Cooke PS, Bunick D, Kirby JD** 1993 Adult testicular enlargement induced  
608 by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell  
609 numbers. *Endocrinology* 132:2607-2613

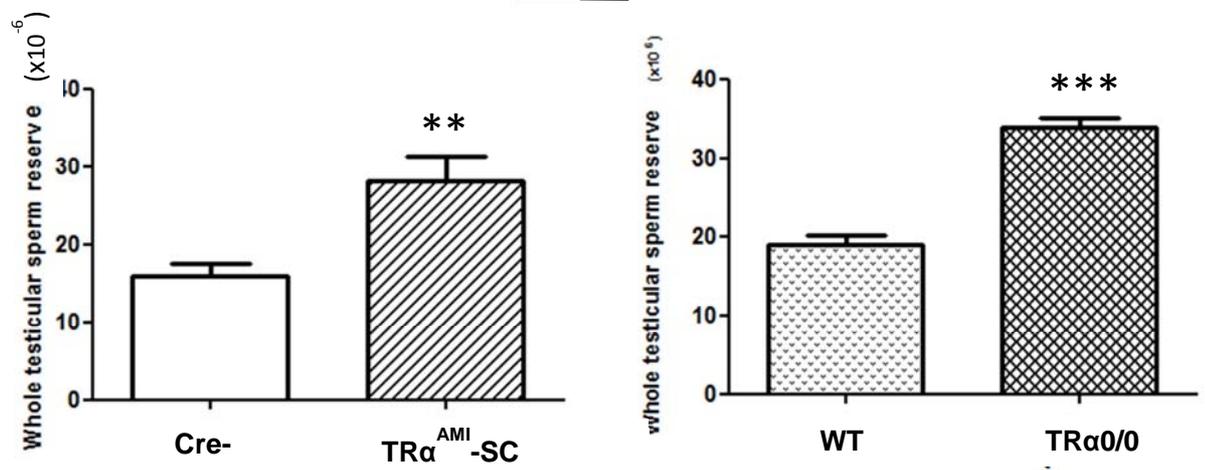
- 610 55. **Canale D, Agostini M, Giorgilli G, Caglieresi C, Scartabelli G, Nardini V, Jannini**  
611 **EA, Martino E, Pinchera A, Macchia E** 2001 Thyroid hormone receptors in  
612 neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *Journal of andrology* 22:284-288
- 613 56. **Di Fulvio M, Coleoni AH, Pellizas CG, Masini-Repiso AM** 2000 Tri-iodothyronine  
614 induces proliferation in cultured bovine thyroid cells: evidence for the involvement of  
615 epidermal growth factor-associated tyrosine kinase activity. *J Endocrinol* 166:173-182
- 616 57. **Baas D, Bourbeau D, Sarlieve LL, Ittel ME, Dussault JH, Puymirat J** 1997  
617 Oligodendrocyte maturation and progenitor cell proliferation are independently  
618 regulated by thyroid hormone. *Glia* 19:324-332
- 619 58. **Garcia-Silva S, Perez-Juste G, Aranda A** 2002 Cell cycle control by the thyroid  
620 hormone in neuroblastoma cells. *Toxicology* 181-182:179-182
- 621 59. **Foster MP, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K** 1999 Proliferation of bone  
622 marrow pro-B cells is dependent on stimulation by the pituitary/thyroid axis. *J*  
623 *Immunol* 163:5883-5890
- 624 60. **Malik R, Mellor N, Selden C, Hodgson H** 2003 Triiodothyronine enhances the  
625 regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology* 37:79-86
- 626 61. **Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Cossu C, Simbula G, Menegazzi M, Shinozuka**  
627 **H, Columbano A** 2001 Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation  
628 induced by thyroid hormone (T3). *The FASEB journal : official publication of the*  
629 *Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:1006-1013
- 630 62. **Gonzalez-Sancho JM, Figueroa A, Lopez-Barahona M, Lopez E, Beug H, Munoz**  
631 **A** 2002 Inhibition of proliferation and expression of T1 and cyclin D1 genes by  
632 thyroid hormone in mammary epithelial cells. *Mol Carcinog* 34:25-34
- 633 63. **Barrera-Hernandez G, Park KS, Dace A, Zhan Q, Cheng SY** 1999 Thyroid  
634 hormone-induced cell proliferation in GC cells is mediated by changes in G1  
635 cyclin/cyclin-dependent kinase levels and activity. *Endocrinology* 140:5267-5274
- 636 64. **Tokumoto YM, Durand B, Raff MC** 1999 An analysis of the early events when  
637 oligodendrocyte precursor cells are triggered to differentiate by thyroid hormone,  
638 retinoic acid, or PDGF withdrawal. *Dev Biol* 213:327-339
- 639 65. **Burton PB, Raff MC, Kerr P, Yacoub MH, Barton PJ** 1999 An intrinsic timer that  
640 controls cell-cycle withdrawal in cultured cardiac myocytes. *Dev Biol* 216:659-670
- 641 66. **Delbes G, Levacher C, Pairault C, Racine C, Duquenne C, Krust A, Habert R**  
642 2004 Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development  
643 in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology* 145:3395-3403
- 644 67. **Tsutsui T, Hesabi B, Moons DS, Pandolfi PP, Hansel KS, Koff A, Kiyokawa H**  
645 1999 Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1)  
646 activity. *Mol Cell Biol* 19:7011-7019
- 647 68. **Holsberger DR, Jirawatnotai S, Kiyokawa H, Cooke PS** 2003 Thyroid hormone  
648 regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells.  
649 *Endocrinology* 144:3732-3738
- 650 69. **Ulisse S, Rucci N, Piersanti D, Carosa E, Graziano FM, Pavan A, Ceddia P,**  
651 **Arizzi M, Muzi P, Cironi L, Gnessi L, D'Armiento M, Jannini EA** 1998  
652 Regulation by thyroid hormone of the expression of basement membrane components  
653 in rat prepubertal Sertoli cells. *Endocrinology* 139:741-747
- 654 70. **Ulisse S, Jannini EA, Carosa E, Piersanti D, Graziano FM, D'Armiento M** 1994  
655 Inhibition of aromatase activity in rat Sertoli cells by thyroid hormone. *The Journal of*  
656 *endocrinology* 140:431-436
- 657 71. **Hadj-Sahraoui N, Seugnet I, Ghorbel MT, Demeneix B** 2000 Hypothyroidism  
658 prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neuroscience letters* 280:79-82  
659

a)

FIG1



b)



c)

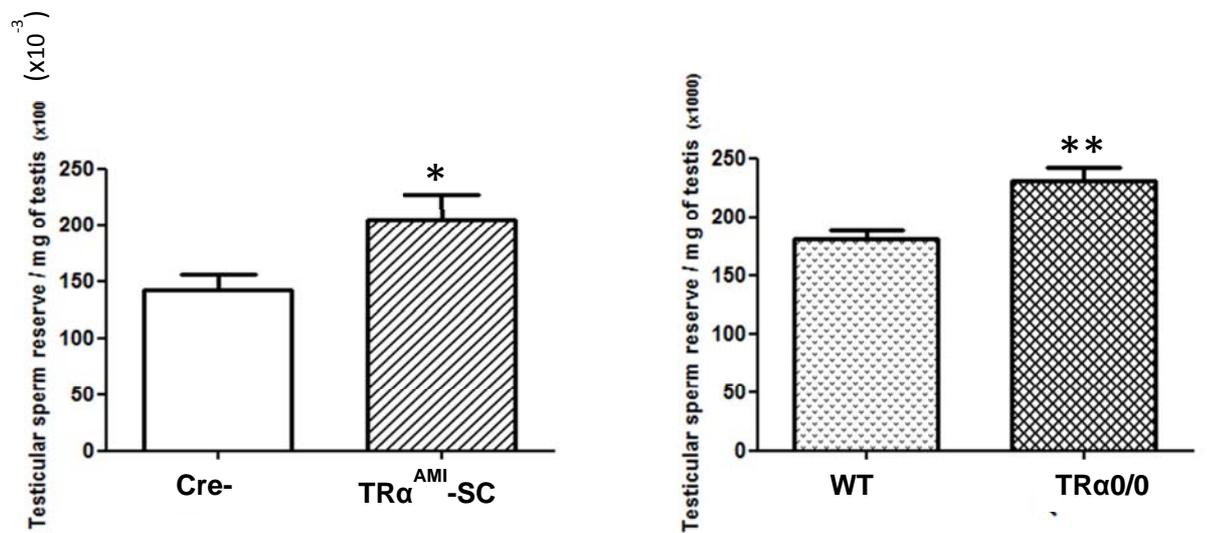
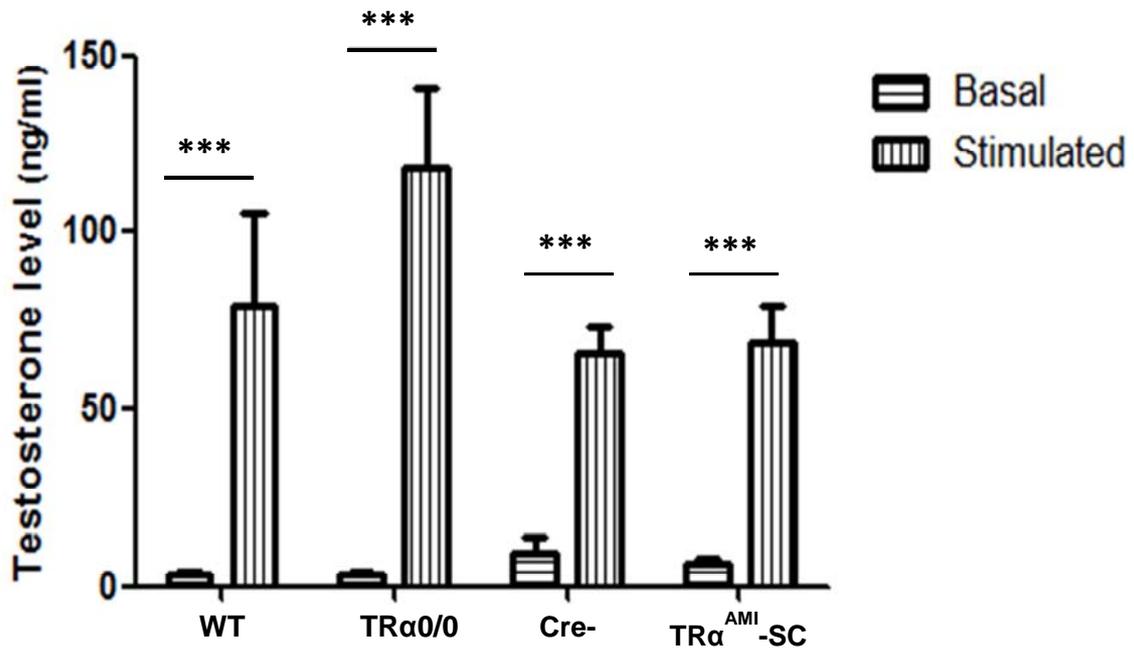


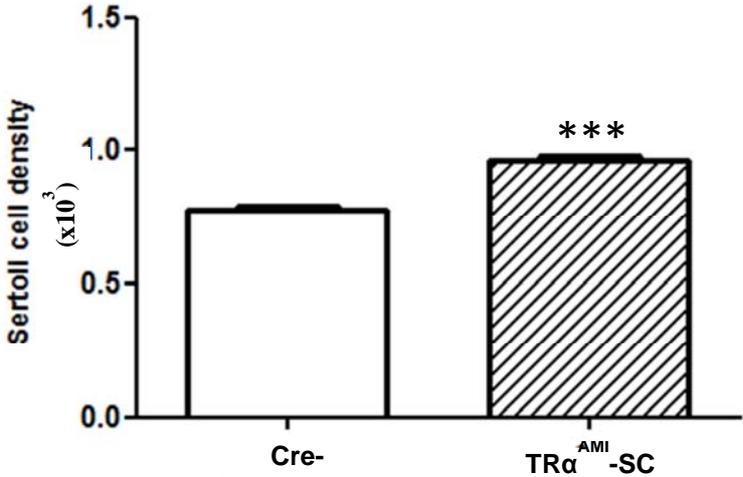
FIG2



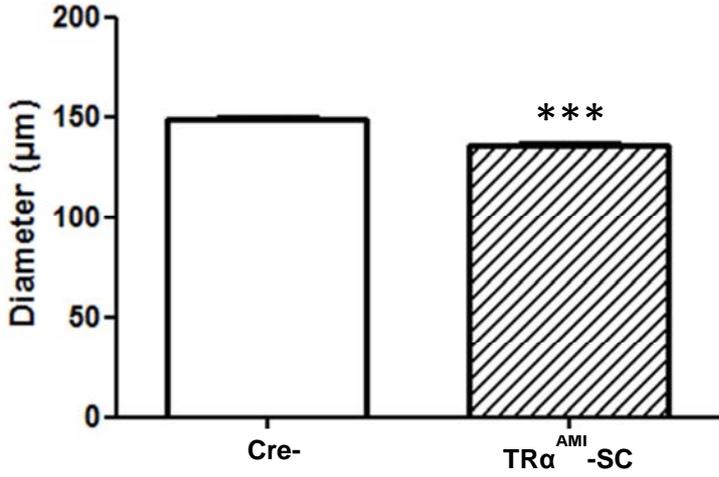
663  
664

FIG3

a)



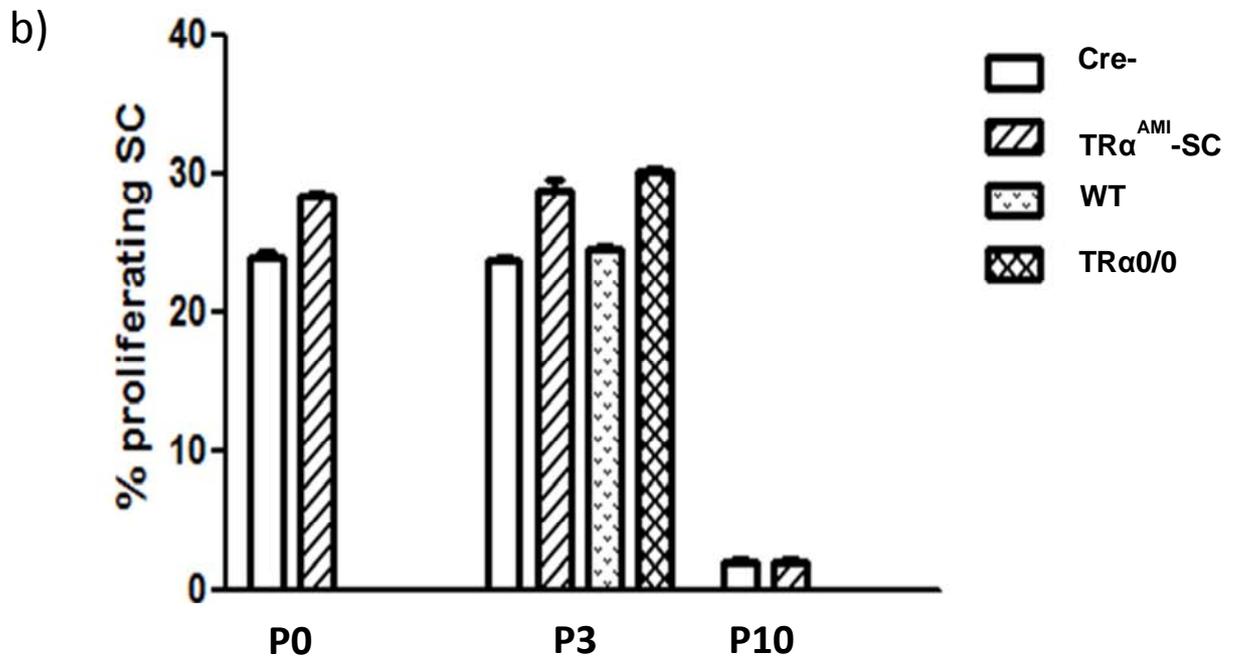
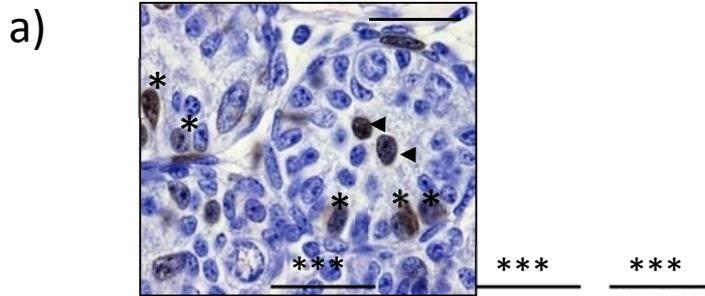
b)



665

666

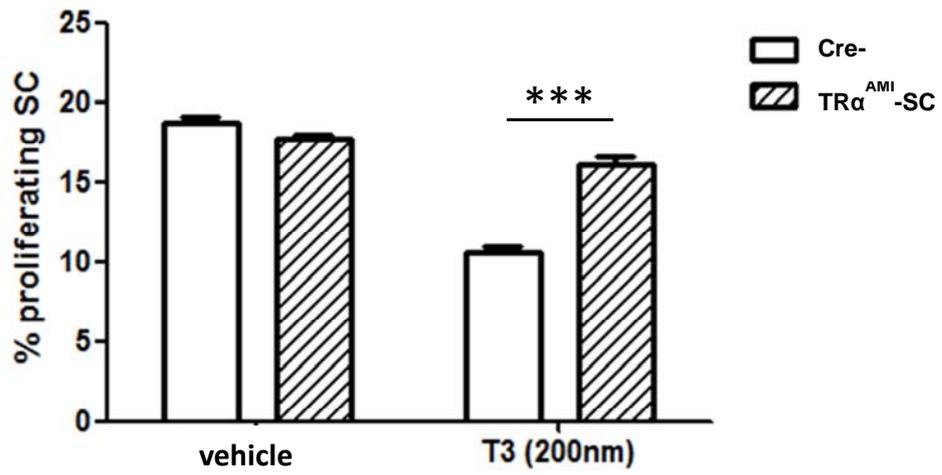
FIG4



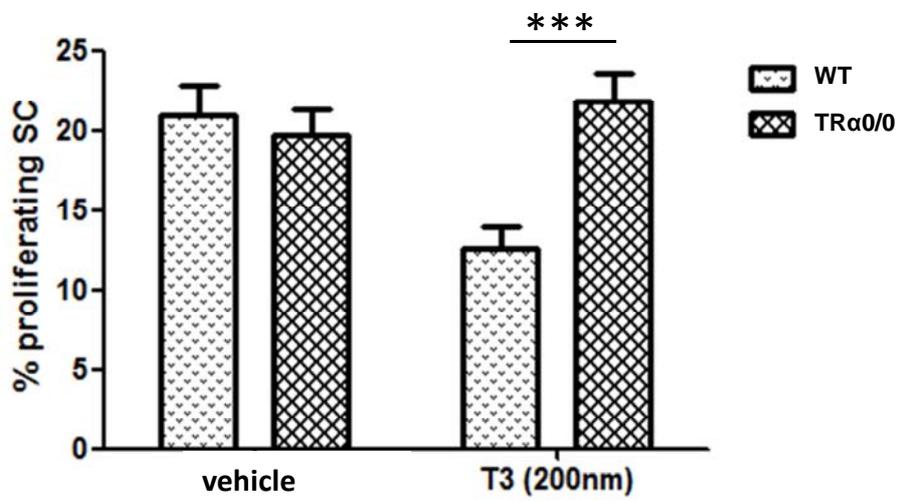
667  
668

FIG5

a)



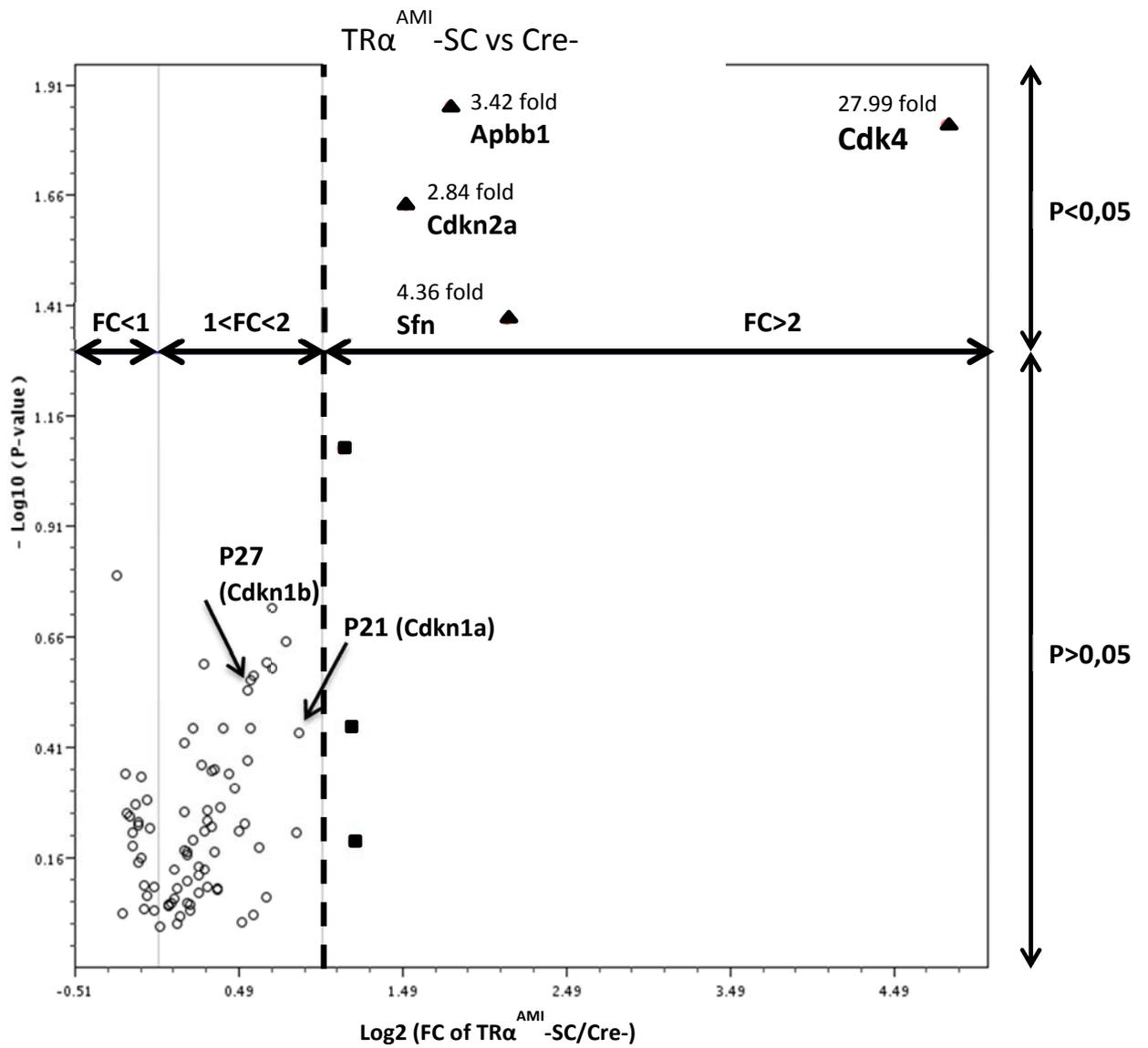
b)



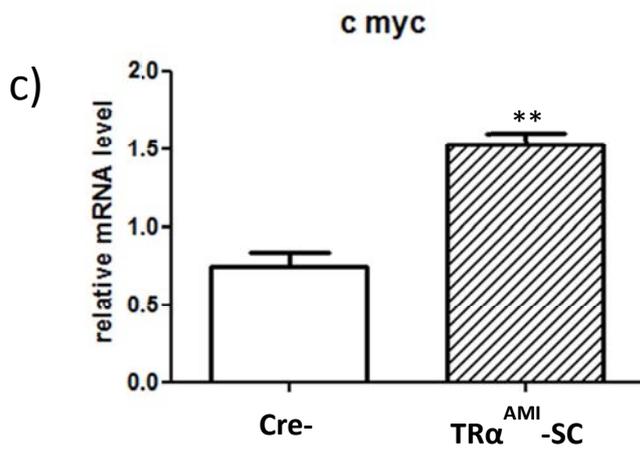
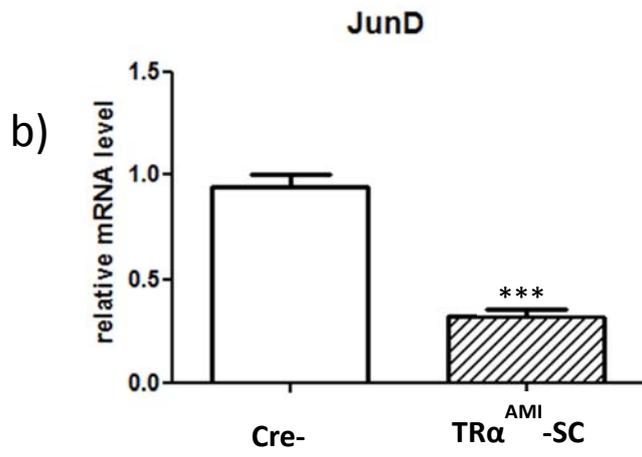
669  
670

a)

FIG6



671  
672



676  
677

Table 1: qPCR primer sequences and hybridization T°

Genes	qPCR primer sequences	Hybridization T°
<b>B-actin Reverse</b>	5' TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA 3'	55°C
<b>β-actin Forward</b>	5' TAC GAC CAG AGG CAT ACA GG 3'	55°C
<b>JunD Reverse</b>	5' TCT TTT TGT TTG GTT TTG TTT TGC 3'	60°C
<b>JunD Forward</b>	5' GCG AAC CAA GGATTA CGG AA 3'	60°C
<b>c-myc Reverse</b>	5' CAG AGG AGG AAC GAG CTG AAG CGC 3'	60°C
<b>c-myc Forward</b>	5' TTA TGC ACC AGA GTT TCG AAG CTG TTC G 3'	60°C

678  
679

680 Supplemental Table 1: Genes list of RT<sup>2</sup> profiler PCR Cell Cycle Array (84 genes). For each gene:  
681 fold values (FC) and p value obtained in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC and TR $\alpha$ 0/0 (versus their respective controls).  
682 Genes changed in TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC are in bold.  
683

Gene Name	Description	TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> FC	TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> p Value	TR $\alpha$ 1 FC	TR $\alpha$ 1 p Value
Abl1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	1.22	0.545638	-1.16	0.038779
Ak1	Adenylate kinase 1	1.18	0.762436	-2.96	0.844094
<b>Apbb1</b>	<b>Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member</b>	<b>3.42</b>	<b>0.013794</b>	-1.08	0.699564
Atm	Ataxia telangiectasia mutated homolog (human)	2.18	0.082080	-1.03	0.723819
Brca1	Breast cancer 1	1.13	0.881773	-1.16	0.421516
Brca2	Breast cancer 2	1.13	0.673317	-1.01	0.934705
Camk2a	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	1.58	0.858742	1.24	0.353486
Camk2b	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	1.42	0.973876	1.58	0.046581
Casp3	Caspase 3	1.44	0.583687	-4.72	0.535995
Ccna1	Cyclin A1	1.30	0.535923	-1.27	0.463041
Ccna2	Cyclin A2	-1.05	0.517738	1.06	0.491342
Ccnb1	Cyclin B1	1.37	0.486280	-1.20	0.041766
Ccnb2	Cyclin B2	1.49	0.937189	1.14	0.370238
Ccnc	Cyclin C	1.27	0.676497	1.28	0.155639
Ccnd1	Cyclin D1	1.21	0.606994	1.38	0.008608
Ccne1	Cyclin E1	1.52	0.658896	1.18	0.248787
Ccnf	Cyclin F	1.22	0.809452	-1.38	0.002720
Cdc25a	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	1.61	0.260164	-1.10	0.371712
Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2	-1.10	0.529140	-1.20	0.342920
<b>Cdk4</b>	<b>Cyclin-dependent kinase 4</b>	<b>27.99</b>	<b>0.015226</b>	<b>5.41</b>	<b>0.000306</b>
Cdk5rap	CDK5 regulatory subunit associated protein 1	1.14	0.916735	1.04	0.490732
Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A P21	1.81	0.364649	1.33	0.089265
Cdkn1b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B P27 <sup>kip1</sup>	1.47	0.274985	-1.03	0.768021
<b>Cdkn2a</b>	<b>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</b>	<b>2.84</b>	<b>0.023271</b>	<b>3.63</b>	<b>0.007514</b>
Chek1	Checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)	-1.09	0.579019	-1.06	0.423346
Cks1b	CDC28 protein kinase 1b	1.18	0.836502	1.06	0.573726
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	1.13	0.790371	-1.08	0.194666
Dnajc2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	1.05	0.881238	1.04	0.741950
Dst	Dystonin	1.45	0.420311	-1.10	0.748265
E2f1	E2F transcription factor 1	1.40	0.607197	-1.03	0.868213
E2f2	E2F transcription factor 2	1.71	0.225945	6.43	0.010727
E2f3	E2F transcription factor 3	-1.08	0.694900	-1.06	0.628709
E2f4	E2F transcription factor 4	1.25	0.444801	-1.03	0.709056
Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	-1.14	0.552113	1.42	0.019612
Gpr132	G protein-coupled receptor 132	1.61	0.189617	1.64	0.067960
Hus1	Hus1 homolog (S. pombe)	1.18	0.729380	-1.12	0.159045
Inha	Inhibin alpha	1.27	0.441013	-1.36	0.009552
Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	1.22	0.575117	1.06	0.500837
Macf1	Microtubule-actin crosslinking factor 1	1.49	0.269520	-1.24	0.263435
Mad21l	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	1.45	0.291789	1.06	0.610244
Mcm2	Minichromosome maintenance deficient 2 mitotin (S. cerevisiae)	1.21	0.740137	-1.18	0.275590
Mcm3	Minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	1.14	0.888576	-1.10	0.323579
Mcm4	Minichromosome maintenance deficient 4 homolog (S. cerevisiae)	1.09	0.943750	-1.05	0.657637

684  
685

Gene Name	Description	TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> FC	TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> p Value	TR $\alpha$ 1 FC	TR $\alpha$ 1 p Value
Mdm2	Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	-1.17	0.932545	-1.01	0.901507
Mki67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	1.28	0.825458	1.04	0.495639
Mre11a	Meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	1.06	0.739126	-1.05	0.682490
Msh2	MutS homolog 2 (E. coli)	1.08	0.987014	1.01	0.877080
Mtbp	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute p53 binding protein	1.06	0.864749	-1.16	0.392707
Myb	Myeloblastosis oncogene	-1.02	0.811193	1.16	0.270065
Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	1.15	0.356173	-1.08	0.527549
Nfatc1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	1.47	0.355338	1.26	0.127105
Notch2	Notch gene homolog 2 (Drosophila)	1.19	0.429574	1.08	0.410005
Npm2	Nucleophosmin/nucleoplasmin 2	1.31	0.354720	-1.18	0.237773
Pcna	Proliferating cell nuclear antigen	1.15	0.636038	1.22	0.084112
Pes1	Pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish)	-1.13	0.562405	-1.01	0.818116
Pkd1	Polycystic kidney disease 1 homolog	1.34	0.451720	1.04	0.708082
Pmp22	Peripheral myelin protein 22	1.11	0.669012	1.22	0.258327
Ppm1d	Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	-1.12	0.653699	-1.08	0.743074
Ppp2r3a	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B", alpha	1.11	0.549632	1.04	0.698617
Ppp3ca	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	-1.08	0.457911	-1.05	0.788507
Prm1	Protamine 1	1.01	0.351023	1.08	0.337038
Rad17	RAD17 homolog (S. pombe)	1.58	0.251351	1.12	0.890440
Rad21	RAD21 homolog (S. pombe)	-1.05	0.847430	-1.01	0.932507
Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	1.04	0.895838	2.70	0.000024
Rad9	RAD9 homolog (S. pombe)	1.00	0.998996	-1.10	0.565948
Ran	RAN, member RAS oncogene family	-1.02	0.915915	1.14	0.516492
Rbl1	Retinoblastoma-like 1 (p107)	1.21	0.253867	-1.14	0.474525
Rbl2	Retinoblastoma-like 2	1.11	0.383914	1.08	0.512231
Sesn2	Sestrin 2	1.28	0.818000	-1.05	0.484027
<b>Sfn</b>	<b>Stratifin</b>	<b>4.36</b>	<b>0.041818</b>	<b>10.63</b>	<b>0.000225</b>
Shc1	Src homology 2 domain-containing transforming protein C1	1.04	0.893175	-1.03	0.848476
Skp2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	1.08	0.818588	-1.51	0.058368
Slfn1	Schlafen 1	1.13	0.687579	1.85	0.065624
Smc1a	Structural maintenance of chromosomes 1A	1.25	0.592731	-1.08	0.689809
Stag1	Stromal antigen 1	2.28	0.642179	1.16	0.176417
Sumo1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (yeast)	-1.12	0.610092	1.16	0.131020
Taf10	TAF10 RNA polymerase II, (TBP)-associated factor	-1.16	0.448976	1.18	0.024200
Terf1	Telomeric repeat binding factor 1	-1.07	0.914363	1.02	0.901996
Tfdp1	Transcription factor Dp 1	-1.09	0.588416	-1.08	0.379237
Psmg2	Proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 2	-1.07	0.807513	1.01	0.928662
Trp53	Transformation related protein 53	-1.04	0.598609	-1.18	0.203837
Trp63	Transformation related protein 63	1.79	0.612682	-1.10	0.922343
Tsg101	Tumor susceptibility gene 101	-1.20	0.159758	-1.01	0.939334
Wee1	WEE 1 homolog 1 (S. pombe)	-1.09	0.712215	-1.24	0.001367
Gusb	Glucuronidase, beta	1.06	0.565146	-1.03	0.883184
Hprt	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	-1.16	0.506560	1.10	0.288823
Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	-1.18	0.059398	-1.01	0.858525
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.11	0.296018	1.02	0.978659
Actb	Actin, beta	1.15	0.419850	-1.08	0.777845

686  
687

688 Supplemental table 2 Comparative data : Testicular parameters of TR $\alpha$ 0/0 line studied by Holsbeger et  
689 al. (2005) or Fumel et al. (present study), and of TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (present study) ND= not determined;  
690 NS=no significant difference

691

<b>parameters</b>	<b>TR<math>\alpha</math>0/0 Holsberger et al. 2005</b>	<b>TR<math>\alpha</math>0/0 Fumel et al.</b>	<b>TR<math>\alpha</math>AMI-SC Fumel et al.</b>
Testis weight 4M (mg)	Significantly increased ( + 20%)	Significantly increased (+26.7%)	Significantly increased (+14.2%)
Whole testicular sperm reserve 4M	ND	Significantly increased (+75%)	Significantly increased (+79%)
Sperm reserve/mg testis	ND	Significantly increased	Significantly increased
Daily Sperm Production	NS	ND	ND
Semineferous tubule histology	No obvious changes	No obvious changes	No obvious changes
SC density	ND	ND	Significantly increased (+23.9%)
SC number	NS	ND	ND
Tubule diameter in the adult testis	ND	ND	Significantly decreased
Tubule diameter at P10	Significantly decreased	ND	ND
Blood testosterone (basal and stimulated)	ND	unchanged	unchanged
In vivo SC Proliferation index at P3	ND	Significantly increased (+23.2%)	Significantly increased (+19.9%)
In vivo SC Proliferation index at P10	Unchanged	Unchanged	Unchanged
CDK4 mRNA at P3	ND	Significantly increased	Significantly increased
P27kip1 protein at P10 (euthyroid mice)	unchanged	ND	ND
P27kip1 mRNA at P3	ND	unchanged	unchanged

692

## B. Rôles du récepteur TR $\alpha$ 1 dans les cellules de Leydig adultes: lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -Aro

Cette lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -Aro a été générée par croisement entre la lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$  et la lignée Aromatase-Cre présente au laboratoire et a pour conséquence d'introduire le récepteur dominant-négatif TR $\alpha^{\text{AMI}}$  dans les cellules de Sertoli et ce, dès le stade foetal comme dans la lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC et, dans les cellules de Leydig à partir du stade pubère.

### 1) Contexte

Il est connu que la T3 agit sur les cellules de Leydig. En effet, la T3 est connue pour réguler la prolifération et la différenciation des cellules de Leydig chez plusieurs espèces dont le rat (Mendis-Handagama *et al.*, 2005). En 1998, Teerds et ses collaborateurs ont montré que des injections de T3 à des rats en période néonatale-prépubertaire avaient des effets directs sur le début de formation de la population adulte de cellules de Leydig. La T3 déclenche l'entrée en différenciation des cellules souches leydigiennes puis, en entraînant la prolifération de ces cellules souches et progéniteurs, elle induit une augmentation du nombre de cellules de Leydig pouvant entrer en différenciation (Mendis-Handagama et Ariyaratne, 2004). La T3 exogène est indispensable pour la différenciation post-natale des cellules de Leydig. Toutefois, le mécanisme par lequel la T3 agit sur la différenciation des cellules de Leydig est inconnu.

La présence du TR $\alpha$ 1 dans les cellules de Leydig a été montrée chez le rat (Hardy *et al.*, 1996); en l'absence de données publiées chez la souris sur ce récepteur, nous avons réalisé une RT-PCR sur des fractions de cellules interstitielles (contenant une majorité de cellules de Leydig) et montré en effet la présence du récepteur dans ces cellules (Figure 27)

La T3 régule la différenciation des cellules de Leydig (pour revue : Mendis-Handagama et Ariyaratne, 2005) en post-natal et la fonction stéroïdogène. En effet, *in vitro*, la T3 stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig de souris en augmentant l'expression des ARNm de StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) et la production des protéines StAR (Manna *et al.*, 1999 ; Mendis-Handagama et Ariyaratne, 2004). *In vitro*, la T3 augmente l'activité stéroïdogène des cellules de Leydig stimulées par la LH, en stimulant

l'aromatisation de la testostérone (Maran *et al.*, 2000). Les mêmes auteurs, en 2001, (Maran *et al.*, 2001) ont montré une diminution de la concentration de testostérone dans le sérum chez des rats hypothyroïdiens. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes (Antony *et al.*, 1995; Valenti *et al.*, 1997); toutefois, dans une étude précédente, Hardy et ses collaborateurs, en 1993, ont montré que le niveau de testostérone n'est pas modifié dans le sérum (bien que diminué à l'échelle de cellules de Leydig isolées).

Nous avons posé l'hypothèse que la régulation par T3 de l'activité stéroïdogène des cellules de Leydig pouvait passer par TR $\alpha$ 1 et, comme nous avons à notre disposition au laboratoire, une lignée Cre sous la dépendance du promoteur de l'aromatase (générée par nos collègues de l'équipe Ovaire dans les années 2003 : thèse de P. Froment, data non publiées), nous avons généré des souris TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -Aro qui expriment le dominant-négatif de TR $\alpha$ 1 dans les cellules de Sertoli, et ce, dès le stade fœtal, comme dans la lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC et, dans les cellules de Leydig à partir du stade pubère.

## 2) Matériel et méthodes

Les expérimentations suivent les mêmes protocoles que pour la lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC (voir article 1), donc je ne décrirai ici que la génération et le génotypage de la lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -Aro qui a été obtenue en croisant la lignée homozygote TR $\alpha^{\text{AMI}}$  avec la lignée Aromatase-Cre hétérozygotes. De ce fait, les animaux contrôles, nommés mCre-, sont présents dans les portées. Concernant le génotypage, des primers spécifiques sont utilisés pour détecter la Cre Aromatase en PCR (primer sens: 5' CCT-GGA-AGA-TGC-TCC-TGT-CTG 3' et primer anti-sens: 5' AGG-GTG-TTG-TAG-GCA-ATG-CC 3'). La lignée aromatase-Cre a été créée par Froment et ses collaborateurs au laboratoire, avec comme objectif initial d'induire une excision Cre-dépendante dans la granulosa des follicules pré-ovulatoires. Pour créer cette lignée, ils ont utilisé le promoteur II de l'aromatase devant le gène d'une Cre humanisé (voir construction en Annexe 1). Lors des croisements avec une lignée floxée (première génération : un allèle normal et un floxé excisé ou non) d'intérêt (gène du récepteur à l'IGF-1), l'excision a lieu uniquement dans les gonades, femelles et mâles, pas dans les autres organes. (Annexe 1). Froment et ses collaborateurs ont également analysé l'expression de la Cre dans des ovaires (Annexe 2) et dans des testicules (Annexe 3) de souris adultes en

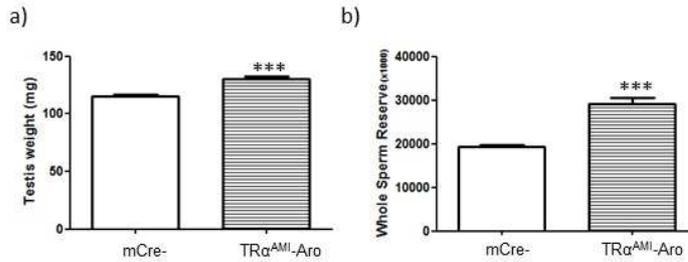


Figure 32: Le poids testiculaire et la réserve spermatique sont augmentés chez les TR $\alpha^{AMI}$ -Aro à 4-6 mois

A 4-6 mois, le poids testiculaire est significativement augmenté chez les mâles TR $\alpha^{AMI}$ -Aro (a;  $p < 0,001$ ;  $n = 18$ ).

La réserve spermatique testiculaire est significativement augmentée chez les mâles TR $\alpha^{AMI}$ -Aro (b;  $p < 0,001$ ;  $n = 10$ ).

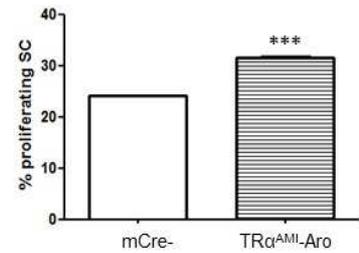


Figure 33: Le nombre de cellules de Sertoli en prolifération est augmenté chez les TR $\alpha^{AMI}$ -Aro à 3 jpp

Les comptages de cellules de Sertoli BrdU positives révèlent que chez les mâles TR $\alpha^{AMI}$ -Aro la prolifération des cellules de Sertoli est significativement augmentée comparée aux témoins ( $p < 0,001$ ;  $n = 5$ ).

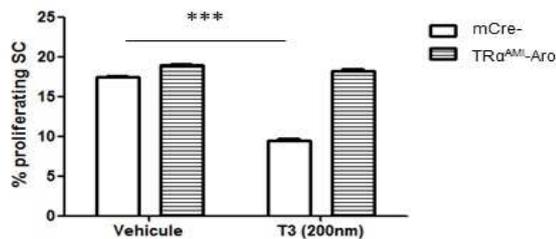


Figure 34: L'effet de la T3 sur l'inhibition de la prolifération des cellules de Sertoli est aboli chez les TR $\alpha^{AMI}$ -Aro en cultures organotypiques

Des cultures organotypiques de testicules de TR $\alpha^{AMI}$ -Aro à 3 jpp ont été réalisées, en présence de T3 (200nM) ou non. Après 3 jours de culture, le BrdU a été ajouté et la prolifération des cellules de Sertoli a été évaluée.

La prolifération des cellules de Sertoli est significativement diminuée chez les contrôles en présence de T3 ( $p < 0,001$ ). A l'inverse, chez les animaux d'intérêt, la T3 n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules de Sertoli ( $n = 9$ ).

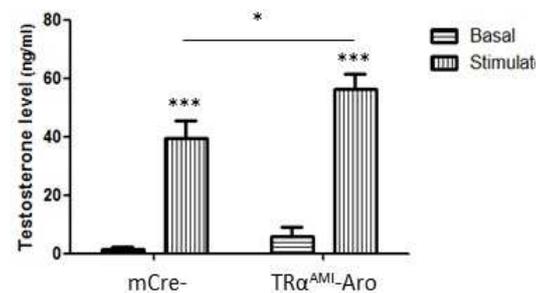


Figure 35: Le niveau de testostérone sous stimulation hCG est augmenté chez les TR $\alpha^{AMI}$ -Aro à l'âge adulte

Les niveaux basaux et sous stimulation hCG de testostérone sont mesurés par RIA chez les témoins ( $n = 9$ ) et les TR $\alpha^{AMI}$ -Aro ( $n = 11$ ).

La stimulation hCG induit une augmentation significative de la sécrétion de testostérone chez les témoins et les animaux d'intérêt ( $p < 0,001$ ). Toutefois, il y a une différence significative du niveau de testostérone en conditions stimulées, le niveau de testostérone est significativement augmenté chez les TR $\alpha^{AMI}$ -Aro ( $p < 0,05$ ).

généralant une lignée Rosa26xAromatase-Cre. Par détection de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase sur coupes, l'expression de la Cre chez la femelle s'est révélée hétérogène dans les cellules de granulosa, sous la forme d'une mosaïque cellulaire (hétérogénéité d'expression), ce qui explique probablement que les auteurs n'ont obtenu aucun phénotype ovarien lors du croisement avec une lignée floxée. Cette lignée s'est donc révélée inutilisable pour faire de la génomique fonctionnelle dans l'ovaire.

Sur des coupes de testicules de souris adultes Rosa26xAromatase-Cre (Annexe 3), il est observé une expression homogène de la Cre dans les cellules interstitielles et dans les cellules de Sertoli (l'usage de cette lignée n'ayant pas été envisagée initialement pour l'étude de gènes exprimés en post-natal, la caractérisation n'a pas été faite au cours du développement). Cela était attendu puisque, chez le mâle, ce promoteur PII est le principal promoteur qui est actif dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig (chez le rat: Lanzino *et al.*, 2001). L'aromatase est exprimée dès la vie fœtale par les cellules de Sertoli, puis l'expression sertolienne décroît et c'est à partir de la puberté que l'aromatase est exprimée par les cellules de Leydig (Van Der Molen *et al.*, 1981; Rommerts *et al.*, 1982 ; Tsai-Morris *et al.*, 1985 ; Levallet *et al.*, 1998), qui prennent donc le relais pour l'aromatase des androgènes dans le testicule.

Ainsi, dans la lignée TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Aro, nous avons analysé les conséquences phénotypiques de l'allèle TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> activé par la Cre dans les cellules de Sertoli dès la vie fœtale (comme avec les AMH-Cre) et dans les cellules de Leydig chez l'adulte.

### 3) Résultats

Les mâles TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Aro présentent une fertilité et une histologie normale. En ce qui concerne la présence du TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> dans les cellules de Sertoli, nous avons exactement reproduit dans cette lignée le phénotype observé chez les mâles TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC, à savoir: augmentation du poids testiculaire et de la réserve spermatique (Figure 32), qui sont la conséquence d'une augmentation significative de l'index de prolifération des cellules de Sertoli à 3 jpp *in vivo*, comparativement aux témoins (Figure 33); enfin, l'action inhibitrice de la T3 sur la prolifération sertolienne *in vitro* (cultures organotypiques) est abolie dans les testicules de cette lignée comme dans ceux de la lignée TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (Figure 34).

La présence du récepteur TR $\alpha^{\text{AMI}}$  dans les cellules de Leydig a pour conséquence une augmentation significative de la sécrétion de testostérone sous stimulation hCG (alors qu'elle est non significativement différente en conditions basales; Figure 35) qui n'avait pas été observée, ni dans les TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC, ni dans les TR $\alpha 0$ .

#### 4) Discussion/perspectives

La lignée TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -Aro, malgré l'imperfection du modèle -deux types cellulaires touchés par la modification génomique- généré, nous a permis de montrer que la forme répressive de TR $\alpha 1$  stimule l'activité stéroïdienne des cellules de Leydig et nous a permis de confirmer le phénotype observé lorsque le TR $\alpha^{\text{AMI}}$  est exprimé que dans les cellules de Sertoli. Il existe d'autres lignées exprimant la Cre dans les cellules de Leydig, comme la lignée AMHR-Cre (Jamin *et al.*, 2002). Mais, dans cette lignée, la Cre est exprimée dans toutes les cellules somatiques du testicule (avec excision dès 12.5jpc). En effet, cette lignée a été utilisée initialement pour cibler l'inactivation génomique spécifiquement dans les cellules de Leydig (Jeyasuria *et al.*, 2004). Mais, il a été observé qu'elle cible également les cellules de Sertoli (Tanwar *et al.*, 2010).

Il a été montré que l'aromatase est exprimée dans les spermatides rondes, spermatocytes pachytènes et spermatides allongées chez le rat (Janulis *et al.*, 1998 ; Lambard *et al.*, 2005) et dans les spermatides rondes et allongées chez la souris (Nitta *et al.*, 1993). Dans la lignée aromatase-Cre, il n'y a pas d'expression de la Cre dans les cellules germinales (Annexe 3) confirmé par l'absence de la transmission du transgène excisé

Nous avons donc: 1) confirmé le rôle de T3/TR $\alpha 1$  dans les cellules de Sertoli quant au contrôle de la prolifération; 2) montré que le TR $\alpha 1$  des cellules de Leydig intervient pour moduler la sécrétion de testostérone, comme suggéré par les études précédentes.

Nous montrons une augmentation significative de la sécrétion de testostérone induite par stimulation hCG chez les TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -Aro. En 2001, *in vivo*, Maran et ses collaborateurs ont montré une diminution de la concentration de testostérone dans le sérum chez des rats hypothyroïdiens. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes (Antony *et al.*, 1995; Valenti *et al.*, 1997).

Dans notre cas, on a induit une hypothyroïdie locale testiculaire alors que dans les autres études, le contexte est une hypothyroïdie globale. Dans le contexte d'une hypothyroïdie globale, on peut supposer que les autres récepteurs à l'hormone thyroïdienne freinent la production de testostérone, ce qui n'est pas le cas dans notre modèle d'hypothyroïdie testiculaire, ce qui expliquerait l'augmentation significative du taux de testostérones sous stimulation hCG.

Chez les souris TR $\alpha$ 0, nous n'observons pas de modification des niveaux de testostérone en conditions stimulées (par la hCG), contrairement à ce que l'on observe chez les TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Aro. Ce résultat suggère que chez les TR $\alpha$ 0, il y aurait une compensation de TR $\alpha$ 1 à d'autres niveaux de l'axe hypothalamus/hypophyse/testicule. On peut poser l'hypothèse d'une compensation au niveau hypophysaire. Pour approfondir l'étude de cette lignée, il serait nécessaire de mesurer les niveaux de LH chez les souris TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Aro. Il serait également pertinent d'étudier l'activité stéroïdogène des mâles TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-Aro après traitement à la T3, en période néonatale. La T3 stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig de souris *in vitro* en augmentant l'expression des ARNm de StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) et la production des protéines StAR (Manna *et al.*, 1999; Mendis-Handagama et Ariyaratne, 2004). On pourrait donc vérifier *in vivo* dans notre modèle l'expression de la StAR et des autres acteurs de la stéroïdogénèse.

## II. Impact de l'invalidation du récepteur mitochondrial p43 sur la prolifération des cellules de Sertoli

### A. Introduction

Comme présenté dans l'introduction, l'ARNm de TR $\alpha$ 1 code pour trois récepteurs : le récepteur TR $\alpha$ 1 nucléaire et deux récepteurs mitochondriaux, le p28 et le p43. La forme p28 code pour une protéine qui n'a pas de domaine de liaison à l'ADN. La forme p43 code pour un récepteur capable de lier la T3 et l'ADN. En 1994, Palmero et ses collaborateurs ont montré la présence de sites de fixation de la T3 sur les mitochondries de cellules de Sertoli de rats. Cette étude a démontré que la T3 affecte le métabolisme énergétique des cellules de Sertoli de rat, suggérant un rôle de la T3 au niveau des mitochondries sertoliennes.

Afin de déterminer une implication de ce récepteur mitochondrial p43 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli, nous avons analysé les testicules des souris KO pour ce récepteur p43 (lignée p43KO), générées par Casas et ses collaborateurs (Blanchet *et al.*, 2011).

### B. Matériels et méthodes

#### - Animaux

Les souris sont élevées dans des conditions standard. Elles sont maintenues dans une animalerie à température contrôlée (21-23°C) et avec une alternance 12h de lumière/12h d'obscurité. Les animaux ont été manipulés selon les directives européennes de bonnes pratiques de laboratoire et avec l'approbation du Comité d'éthique en expérimentation animale Val de Loire.

Les animaux de la lignée p43KO ont été créés par le laboratoire de François Casas (Blanchet *et al.*, 2011 dans FASEB).

Les témoins de cette lignée sont les souris de fond génétique C57Black6. Nous avons comparé le phénotype testiculaire à celui observé chez la lignée TR $\alpha$ 0 (Gauthier *et al.*, 2001; Holsberger *et al.*, 2005) et à la lignée TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (Fumel *et al.*, 2011).

- Détermination du poids testiculaire et de la réserve spermatique

Les souris p43KO et leurs témoins ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Un testicule a été pesé et congelé à -80°C pour estimation de la réserve spermatique. Le testicule est broyé dans un potter dans 3mL de milieu L15 (Gibco-Invitrogen) puis soniqué trente secondes. Les têtes de spermatides sont comptées sur cellules de Malassez et la réserve spermatique par testicule est déterminée. La réserve spermatique testiculaire comprend les spermatozoïdes et les spermatides allongées de stade II à VII. La réserve spermatique par mg de testis est obtenue en rapportant la réserve spermatique testiculaire au poids du testicule.

- Détermination de l'index de prolifération des cellules de Sertoli in vivo

A 3 jpp et à 10 jpp, des souris p43KO et témoins ont été injectés avec 50 $\mu$ g/g de 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; Sigma). Le BrdU s'incorpore dans les cellules en prolifération. 3h après injection, les souris sont sacrifiées. Les testicules sont alors prélevés et fixés dans du Bouin, traités et inclus en paraffine puis, coupés à 4 $\mu$ m d'épaisseur. Après démasquage des antigènes dans un bain bouillonnant de tampon citrate (à pH=6), l'activité des peroxydases endogènes est bloquée via utilisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'immunohistochimie BrdU est ensuite réalisée en utilisant un anticorps primaire, monoclonal immunoglobuline G de souris au 1/200<sup>ème</sup> (Roche) puis, un anticorps secondaire immunoglobulines de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (Dako). La révélation se fait à la Diaminobenzidine (DAB; Dako). Une évaluation de la spécificité du marquage a été réalisée en omettant l'anticorps primaire. Après coloration à l'hématoxyline, les lames sont utilisées pour le comptage des cellules de Sertoli quiescentes et en prolifération. 1000 cellules par animal ont été comptées en utilisant le logiciel d'analyses Histolab.

- Dosage de la testostérone plasmatique

Les souris sont injectées en intrapéritonéale avec de la hCG (human chorionic gonadotropin ; Chorulon), à la dose de 15UI/animal. Avant et deux heures après injection, du sang est prélevé et les plasmas sont stockés à -20°C. Le dosage de testostérone est ensuite réalisé comme décrit par Hochereau de Reviers en 1990.

- Microscopie électronique

Pour chaque lignée, des testicules ont été prélevés chez des mâles adultes (à 4 mois). Ces testicules ont ensuite été fixés dans du tampon cacodylate Na 0,1M /4% glutaraldéhyde. Les testicules sont ensuite découpés en petits morceaux et incubés dans le même tampon une nuit à 4°C. Puis, les morceaux sont fixés dans de l'osmium 1% et inclus dans de la résine. Des coupes sont ensuite effectuées à une épaisseur de 0,05µm. Ces coupes sont ensuite montées sur des grilles spéciales et subissent ensuite des bains dans de l'uranyl d'acétate et du citrate d'argent avant d'être observées en microscopie électronique.

- Extraction ARN, RT-PCR et qRT-PCR

Les ARN totaux de testicules à 3 jpp ont été extraits au trizol. Pour déterminer l'expression de JunD, c-myc et de l'actine, des qRT-PCR ont été réalisées en utilisant le Sybr Green supermix (Biorad). Les runs ont été effectués sur des triplicates dans un iCycler (Biorad). Des primers et des températures d'hybridation spécifiques ont été utilisés (décrit dans la publication 1).

Pour déterminer et quantifier l'expression des gènes mitochondriaux dans les testicules à 3 jpp, nous avons utilisé les plaques Mouse Mitochondria RT<sup>2</sup> Profiler Arrays de chez Qiagen, selon les recommandations du fabricant. Cinq gènes de contrôle endogènes ont été utilisés pour la normalisation: glucuronidase β, hypoxanthine guanine, heat-shock protéine, glyceraldéhyde et β-actine. Le calcul statistique des fold-changes (FC), qui représente la variation du niveau d'expression du gène entre les animaux d'intérêt et les témoins, est basé sur l'utilisation du programme disponible sur le web RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis. Le seuil de significativité a été placé à 0,05 avec une différence d'expression de 2 fois ou plus (test-t) afin d'établir la liste des gènes différenciellement exprimés.

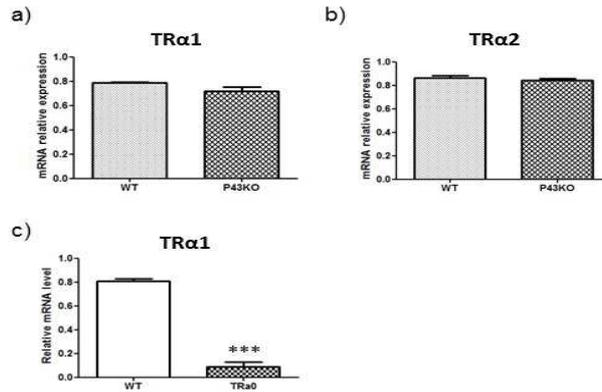


Figure 36: Les expressions des ARNm de TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 ne sont pas affectées dans le testicule des p43KO

Les niveaux d'ARNm codant pour les formes TR $\alpha$ 1 et TR $\alpha$ 2 ont été déterminés par qRT-PCR. Le niveau des ARNm a été normalisé en utilisant la  $\beta$ -actine comme gène de référence

Le KO de p43 n'altère pas l'expression de TR $\alpha$ 1 (a) et de TR $\alpha$ 2 (b).

En contrôle, nous avons évalué le niveau des ARNm de TR $\alpha$ 1 dans les testicules de souris TR $\alpha$ 0 (c;  $p < 0,001$ ). (n=6 pour les P43KO et n=4 pour les WT).

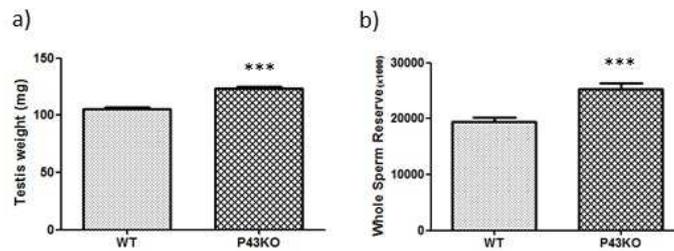


Figure 37: Le poids testiculaire (a) et la réserve spermatique (b) sont augmentés chez les souris p43KO à l'âge de 4 mois

Le poids testiculaire est significativement augmenté chez les mâles p43KO à 4 mois (a;  $p < 0,001$ ; n=24/génotype).

La réserve spermatique est également augmentée à 4 mois chez les p43KO (b;  $p < 0,001$ ; n=23/génotype).

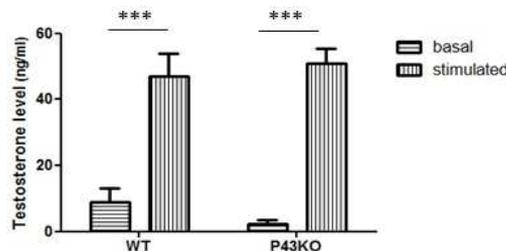


Figure 38: L'expression de la testostérone, en conditions basales et stimulées par hCG, n'est pas modifiée chez les souris p43KO adultes

Les niveaux basaux de testostérone plasmatique sont similaires chez les témoins (n=8) et les p43KO (n=8). La stimulation hCG induit une augmentation significative de la sécrétion de testostérone chez les témoins et les animaux d'intérêt ( $p < 0,001$ ).

- Analyses statistiques

Toutes les données sont représentées avec les moyennes +/- SEM. Pour comparer les moyennes, le test t de Student a été utilisé, de même que le test de Mann-Whitney dans le cas où les variances étaient hétérogènes. Pour les comparaisons multiples, des tests ANOVA two-way ont été réalisés, suivis de post-tests, Kruskal-Wallis et Bonferroni. Le seuil de significativité a été fixé à  $p=0,05$ .

## C. Résultats

### 1) Analyse du phénotype testiculaire des souris p43KO

- **Dans le testicule, l'invalidation de l'isoforme p43 n'affecte pas l'expression des autres isoformes de TR $\alpha$ :**

Nous avons vérifié dans les testicules de souris p43KO à 3jpp que le KO du récepteur p43 n'altère pas l'expression des isoformes nucléaires du récepteur TR $\alpha$  (Figure 36). L'expression de TR $\alpha$ 1 (Figure 36a) et de TR $\alpha$ 2 (Figure 36b) n'est pas modifiée chez les souris p43KO. Ce résultat suggère que l'invalidation du récepteur mitochondrial p43 ne modifie pas l'expression des isoformes nucléaires de TR $\alpha$ .

- **L'invalidation de l'isoforme p43 mitochondriale conduit à une augmentation du poids testiculaire et de la réserve spermatique chez les souris p43KO à l'âge adulte:**

A 4 mois, les testicules des souris p43KO sont significativement plus gros que ceux des témoins (Figure 37a). La réserve spermatique testiculaire est significativement augmentée (Figure 37b). L'histologie testiculaire des mâles p43KO à l'âge adulte est normale, tous les stades de la différenciation germinale sont présents (résultats non montrés).

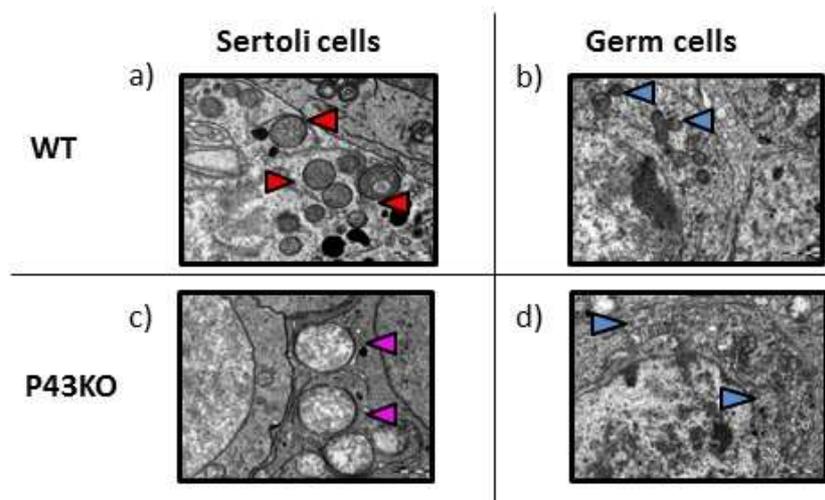


Figure 39: La structure des mitochondries est modifiée dans les cellules de Sertoli des souris p43KO

a) et b) présentent des images représentatives des mitochondries des cellules de Sertoli (flèches rouges) et des cellules germinales (flèches bleues) des souris témoins

c) et d) montrent des images représentatives des mitochondries des cellules de Sertoli (flèches roses) et des cellules germinales (flèches bleues) des souris p43KO

Les mitochondries des cellules de Sertoli des testicules des souris p43KO sont plus dilatées et présentent une opacité aux électrons faible, suggérant une altération de l'ultrastructure des crêtes mitochondriales.

Barre d'échelle: 1µm

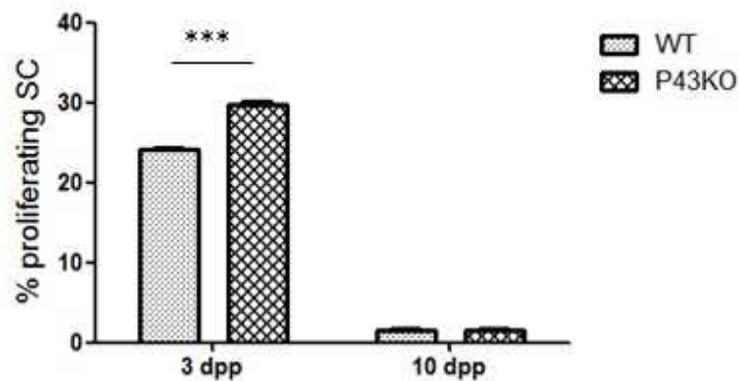


Figure 40: La prolifération des cellules de Sertoli est augmentée à 3 dpp chez les p43KO

Les comptages de cellules de Sertoli BrdU positives révèlent que chez les mâles P43KO à 3 jpp, la prolifération des cellules de Sertoli est significativement augmentée comparée aux témoins ( $p < 0,001$ ).

En revanche, à 10 jpp, il n'y a plus de différence de prolifération des cellules de Sertoli.

(n=3/génotype)

Les niveaux de testostérone, basal et induit par l'injection d'hCG, sont comparables entre les souris p43KO et les souris témoins, suggérant que l'activité des cellules de Leydig n'est pas affectée (Figure 38).

**- La structure des mitochondries des cellules de Sertoli est perturbée chez les souris p43KO à l'âge adulte :**

Nous avons observé en microscopie électronique la structure des mitochondries sertoliennes et germinales des testicules des souris p43KO à l'âge adulte (Figure 39).

Chez les témoins, les mitochondries des cellules de Sertoli (Figure 39a) et des cellules germinales (Figure 39b) sont normales.

Par contre, chez les p43KO, l'histologie des mitochondries des cellules de Sertoli est modifiée (Figure 39c), elles sont plus « dilatées » que celles des témoins et présentent une opacité aux électrons modifiées, suggérant que la structure des crêtes est modifiée. La forme et la structure des mitochondries des cellules germinales ne sont pas modifiées chez les p43KO (Figure 39d).

**- La prolifération des cellules de Sertoli est augmentée dans les testicules des souris p43KO à 3 jpp:**

L'index de prolifération des cellules de Sertoli a été évalué dans des testicules de souris p43KO à 3 jpp et 10 jpp. La figure 40 montre que l'index de prolifération est significativement plus élevé chez les souris p43KO que chez les souris témoins à 3 jpp. A 10j, l'index de prolifération est faible et ne diffère pas entre les souris p43KO et les souris témoins. L'augmentation du poids testiculaire et de la réserve spermatique à l'âge adulte chez les souris p43KO résulte de l'augmentation de la prolifération des cellules de Sertoli pendant le développement post-natal.

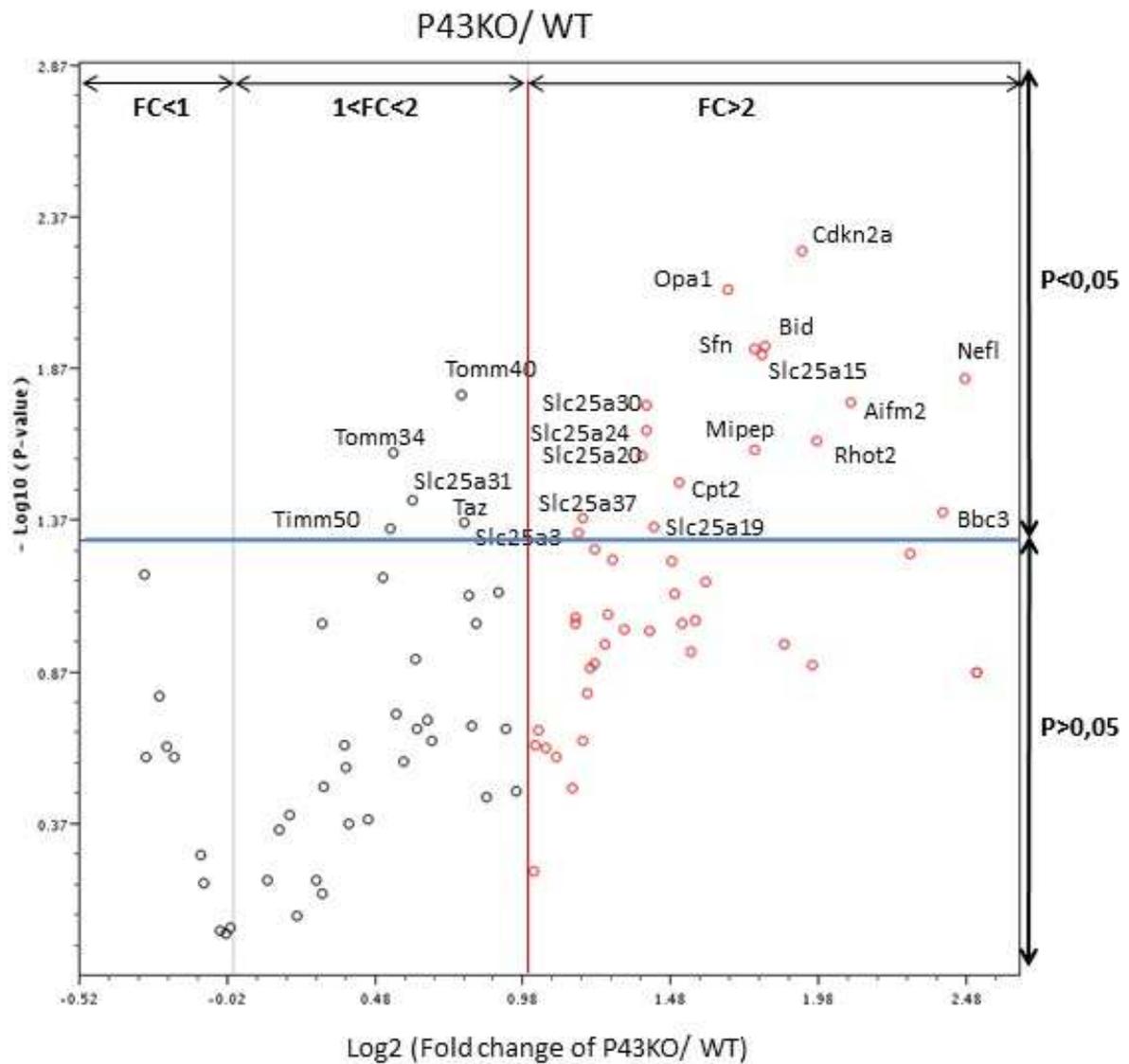


Figure 41: L'expression des gènes mitochondriaux est modifiée dans les testicules des souris p43KO à 3 jpp

Ce graphe est une représentation arbitraire en « Volcano Plot » du fold change (FC) pour chaque gène analysé. Il représente le Log<sub>2</sub> du fold change pour chaque expression de gènes en comparant le groupe d'intérêt P43KO (n=6) au groupe contrôle WT (n=4) versus le -Log<sub>10</sub> de la p-value issue d'un test t. La 2ème ligne verticale (rouge) indique un changement supérieur à 2. La ligne horizontale (bleue) indique le seuil de significativité de la p-value qui est de 0,05.

De nombreux gènes sont sur-exprimés chez les P43KO (cercles rouges). D'autres gènes sont significativement modifiés mais leurs FC sont inférieurs à 2.

- **L'expression des gènes mitochondriaux est modifiée chez les souris p43KO à 3 jpp:**

L'expression de 84 gènes mitochondriaux a été analysée en qRT-PCR en utilisant la technologie Mouse Mitochondria RT Profiler PCR Arrays (Qiagen).

L'expression de nombreux gènes mitochondriaux est modifiée dans les testicules des souris p43KO (Figure 41).

L'ensemble des gènes dont l'expression est modifiée est présenté dans le tableau ci-dessous.

<b>Gènes</b>	<b>p43KO</b>	<b>Rôles du gène</b>
Nefl	5,56	Formation des neurofilaments
Bbc3	5,28	Apoptose
Aifm2	4,26	Apoptose
Rhot2	3,93	Transport
Cdkn2a	3,8	Contrôle de la prolifération
Bid	3,48	Apoptose
Slc25a15	3,46	Transport
Mipep	3,4	Clivage de protéines importées dans mitochondrie
Sfn	3,4	Contrôle de la prolifération
Opal	3,19	Fusion mitochondriale
Cpt2	2,84	Métabolisme
Slc25a19	2,69	Transport
Slc25a30	2,64	Transport
Slc25a20	2,61	Transport
Slc25a37	2,27	Transport
Slc25a3	2,24	Transport
Taz	1,72	Métabolisme
Tomm40	1,71	Importation de protéines dans la mitochondrie
Slc25a31	1,52	Transport
Tomm34	1,46	Importation de protéines dans la mitochondrie
Timm50	1,45	Importation de protéines dans la mitochondrie

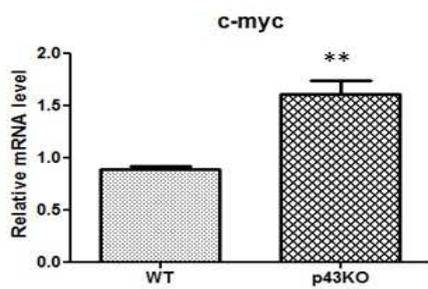


Figure 42: Le niveau d'expression de c-myc est augmenté significativement ( $p < 0,01$ ) dans le testicule des souris p43KO à l'âge de 3 jpp (n=6 pour les P43KO et n=4 pour les WT)

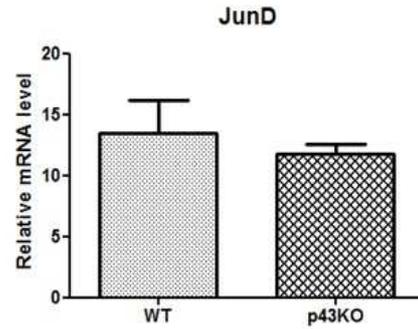


Figure 43: Le niveau d'expression de JunD n'est pas modifié dans le testicule des souris p43KO à l'âge de 3 jpp (n=6 pour les P43KO et n=4 pour les WT)

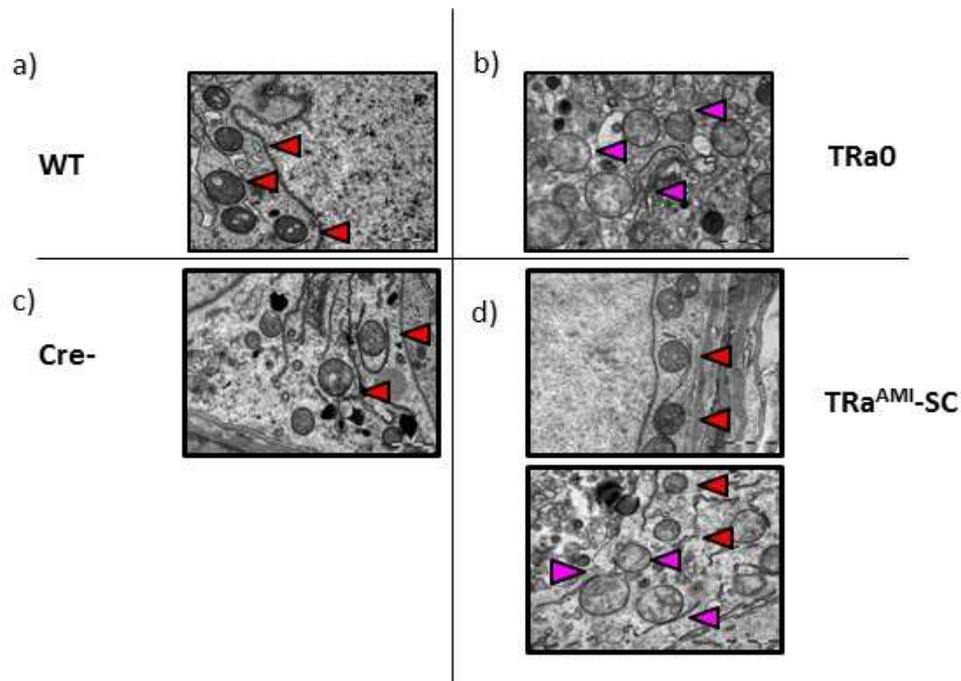


Figure 44: La structure des mitochondries est modifiée dans les cellules de Sertoli des souris  $TR\alpha 0$  et  $TR\alpha^{AMI-SC}$  à l'âge adulte

a) et c) présentent des images représentatives des mitochondries des cellules de Sertoli (flèches rouges) des souris témoins, WT et Cre-

b) et d) montrent des images représentatives des mitochondries des cellules de Sertoli (flèches roses et rouges) des souris  $TR\alpha 0$  et  $TR\alpha^{AMI-SC}$

Chez les  $TR\alpha 0$ , les mitochondries des cellules de Sertoli sont anormales (b), elles sont dilatées et leur faible opacité aux électrons suggère une altération de l'ultrastructure des crêtes. Chez les  $TR\alpha^{AMI-SC}$  (d), on observe la présence de mitochondries normales (flèches rouges) et anormales (flèches roses) dans les cellules de Sertoli.

Barre d'échelle:  $1\mu m$

De façon surprenant aucun des 84 gènes étudiés ne présentent une expression diminuée.

21 gènes sur 84 présentent une expression augmentée chez les souris p43KO à 3 jpp. Ces gènes codent pour des petites molécules de transport (famille des Slc25a), pour des protéines pour l'importation et le clivage de molécules dans les mitochondries (Mipep et membres de la famille des Tomm et Timm), pour des protéines impliquées dans le métabolisme (Taz et Cpt2), des protéines de localisation mitochondriale (Nefl, Opa1, Rhot2), des gènes apoptotiques (Aifm2, Bbc3, Bid) et également, pour des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Cdkn2a et Sfn).

Ces résultats démontrent que le récepteur mitochondrial p43 joue un rôle important dans de nombreuses fonctions des mitochondries puisque son invalidation conduit à une augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les activités mitochondriales. Par qRT-PCR, nous montrons que l'expression de c-myc est significativement augmentée chez les souris p43KO à 3 jpp (Figure 42). Par contre, aucune variation de l'expression de JunD n'est observée chez ces souris p43KO (Figure 43).

## 2) Comparaison des phénotypes testiculaires entre les lignées p43KO, TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC

Il existe de nombreuses similitudes entre le phénotype testiculaire de la lignée p43KO et celui des lignées TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC et TR $\alpha$ 0. Chez les p43KO, nous montrons que la structure des crêtes des mitochondries apparaît altérée dans les cellules de Sertoli et que l'expression des gènes mitochondriaux est modifiée. Nous avons donc décidé d'analyser l'aspect des mitochondries en microscopie électronique ainsi que l'expression des gènes mitochondriaux dans les souris TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC.

### - **L'ultrastructure des mitochondries des cellules de Sertoli est affectée chez les souris TR $\alpha$ AMI-SC et TR $\alpha$ 0 à l'âge adulte:**

Dans les testicules des souris TR $\alpha$ 0 à 4 mois, on observe, une altération de l'ultrastructure des mitochondries dans les cellules de Sertoli et une augmentation de leur taille (Figure 44b). Dans les testicules de souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC adultes, on observe dans les cellules de Sertoli, une

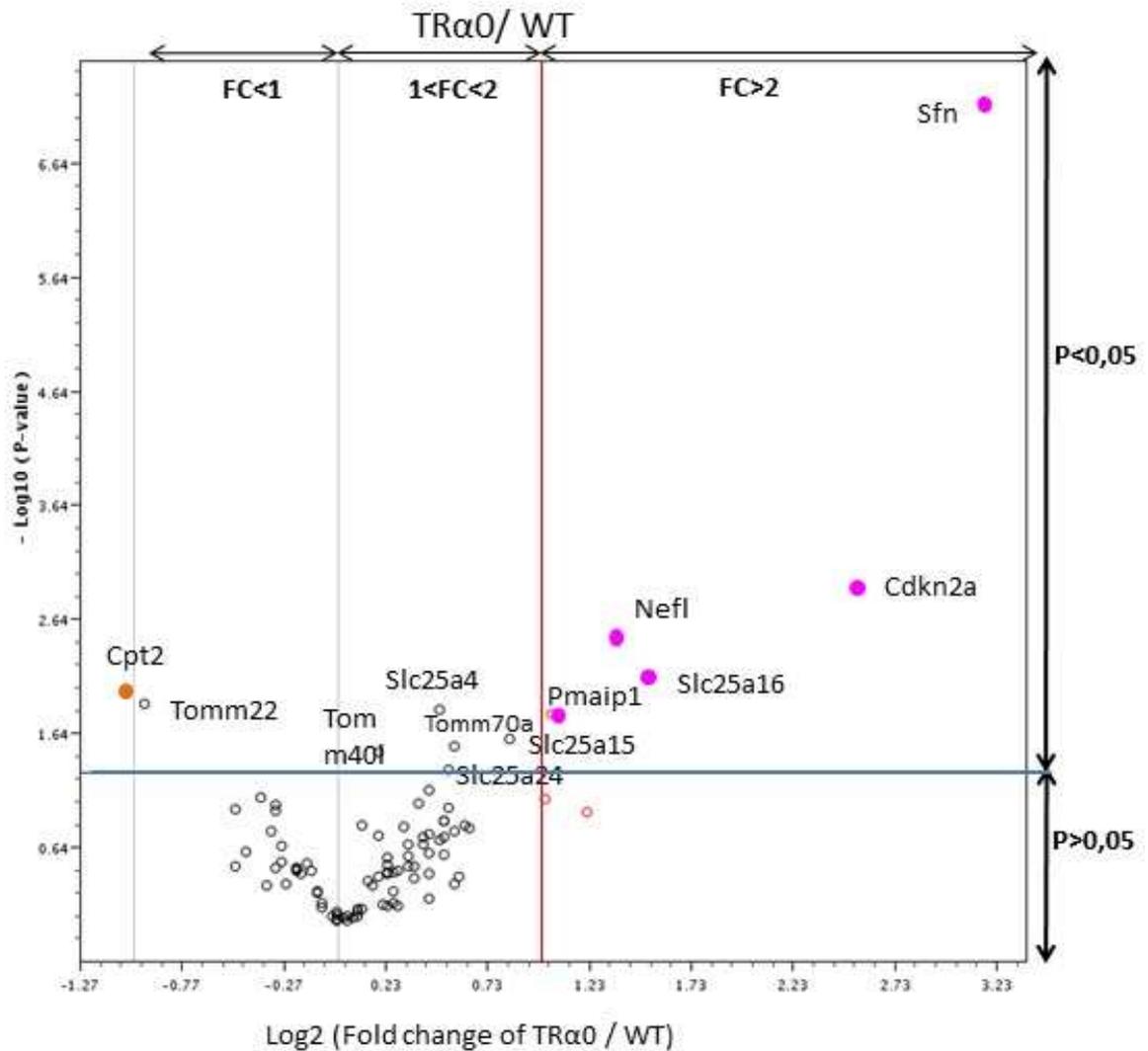


Figure 45: L'expression des gènes mitochondriaux est modifiée dans les testicules des souris TRα0 à 3 jpp

Ce graphe est une représentation arbitraire en « Volcano Plot » du fold change (FC) pour chaque gène analysé. Il représente le Log2 du fold change pour chaque expression de gènes en comparant le groupe TRα0 (n=4) au groupe contrôle WT (n=4) versus le -Log10 de la p-value issue d'un test t. La 3ème ligne verticale (rouge) indique un changement supérieur à 2. La ligne horizontale (bleue) indique le seuil de significativité de la p-value qui est de 0,05.

5 gènes sont sur-exprimés chez les souris TRα0 (points roses). 1 gène est sous-exprimé (point orange). D'autres gènes sont significativement modifiés mais leurs FC sont inférieurs à 2.

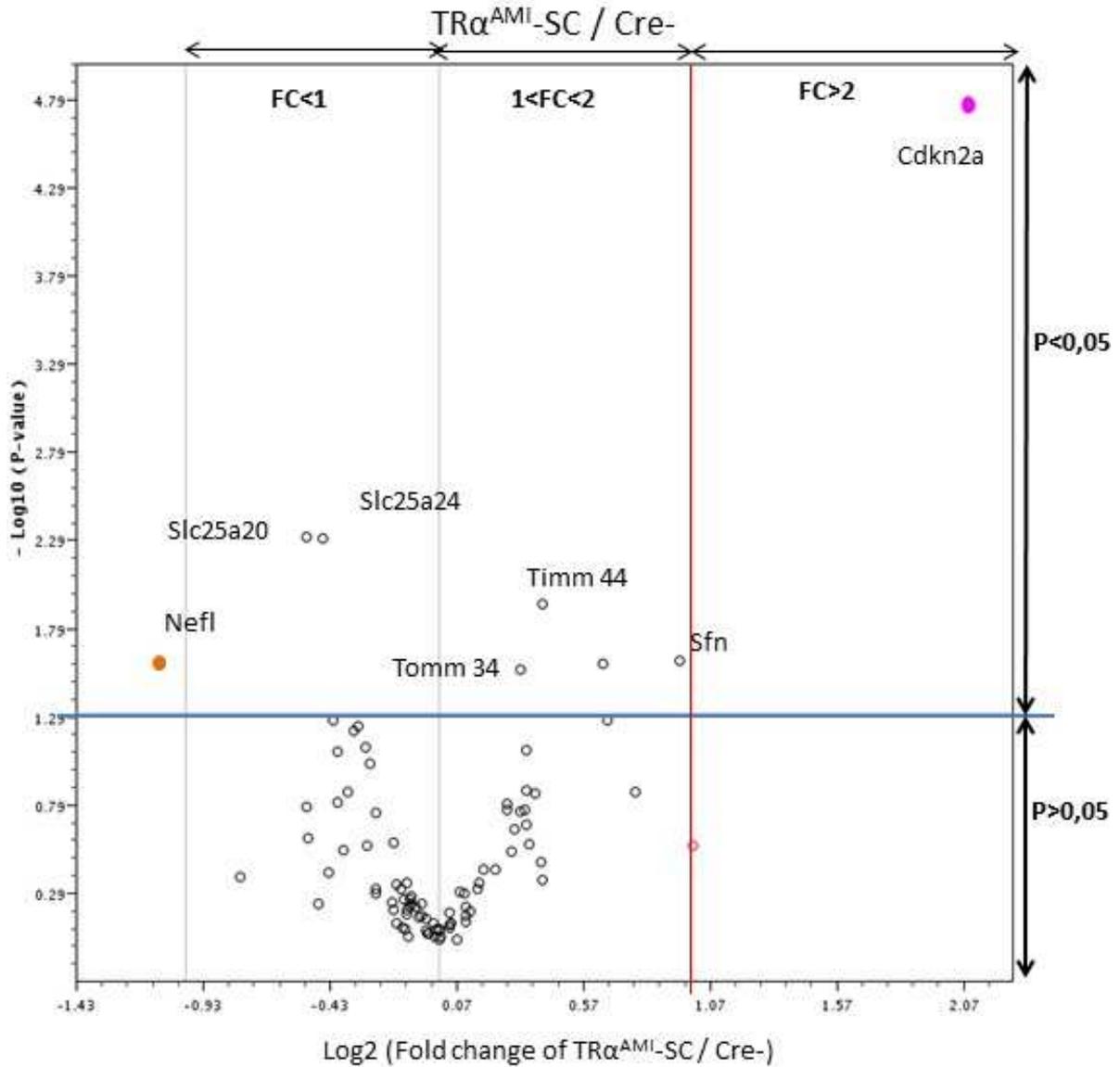


Figure 46: L'expression des gènes mitochondriaux est modifié dans les testicules des souris TR $\alpha^{AMI}$ -SC à 3 jpp

Ce graphe est une représentation arbitraire en « Volcano Plot » du fold change (FC) pour chaque gène analysé. Il représente le Log<sub>2</sub> du fold change pour chaque expression de gènes en comparant le groupe TR $\alpha^{AMI}$ -SC (n=6) au groupe contrôle Cre- (n=6) versus le -Log<sub>10</sub> de la p-value issue d'un test t. La 3ème ligne verticale (rouge) indique un changement supérieur à 2. La ligne horizontale (bleue) indique le seuil de significativité de la p-value qui est de 0,05.

1 gène est sur-exprimé chez les TR $\alpha^{AMI}$ -SC (Cdkn2a; point rose). 1 gène est sous-exprimé Nefl; (point orange). D'autres gènes sont significativement modifiés mais leurs FC sont inférieurs à 2.

cohabitation entre mitochondries normales (Figure 44d ; flèches rouges) et mitochondries anormales (Figure 44d ; flèches roses). Ces mitochondries anormales sont plus grosses que celles des témoins et présentent une opacité aux électrons modifiées, suggérant que la structure des crêtes est altérée, comme observé chez les p43KO. L'altération de la structure des mitochondries est moins importante chez les souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC du fait que chez ces souris (hétérozygotes), un allèle sauvage du TR $\alpha$ 1 est exprimé. Les mitochondries des cellules germinales sont quant à elles normales dans les lignées TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (résultats non montrés).

**- L'expression des gènes mitochondriaux est affectée chez les souris TR $\alpha$ 0 et les TR $\alpha$ AMI-SC à 3 jpp:**

L'expression de 84 gènes mitochondriaux a été analysée chez les souris TR $\alpha$ 0 (Figure 45) et TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC (Figure 46) à 3jpp. Aucun des 84 gènes ne présente une diminution d'expression. Plusieurs gènes par contre présentent une expression augmentée.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Gènes	TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> -SC	TR $\alpha$ 0	Rôles du gène
Cdkn2a	4,28	5,84	Contrôle de la prolifération
Sfn	1,93	9	Contrôle de la prolifération
Nefl	-2,14	2,58	Formation des neurofilaments
Cpt2	X	-2,08	Métabolisme
Pmaip1	X	2,06	Apoptose
Slc25a15	X	1,8	Transport
Slc25a16	X	2,87	Transport
Slc25a4	X	1,41	Transport
Slc25a20	-1,44	X	Transport
Slc25a24	-1,37	1,46	Transport
Timm44	1,33	X	Importation de protéines dans la mitochondrie
Tomm34	1,57	X	Importation de protéines dans la mitochondrie
Tomm22	X	-1,94	Importation de protéines dans la mitochondrie
Tomm40l	X	1,14	Importation de protéines dans la mitochondrie
Tomm70a	X	1,48	Importation de protéines dans la mitochondrie

7 gènes mitochondriaux sont dérégulés dans les testicules des souris TR $\alpha^{AM1}$ -SC à 3 jpp. Ces gènes sont impliqués dans le transport de molécules et l'importation de protéines dans la mitochondrie, dans le métabolisme et le contrôle de la prolifération cellulaire.

12 gènes mitochondriaux sont dérégulés dans les testicules des souris TR $\alpha 0$  à 3 jpp. Ces gènes sont également impliqués dans le transport de molécules et l'importation de protéines dans la mitochondrie, dans le métabolisme et le contrôle de la prolifération cellulaire.

De manière étonnante, les deux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire sont fortement up-régulés dans les trois modèles de souris.

Gènes	TR $\alpha 0$	TR $\alpha^{AM1}$ -SC	p43KO
Cdkn2a	5,84	4,28	3,8
Sfn	9	1,93	3,4

## D. Discussion

Nous montrons pour la première fois l'implication du récepteur p43 mitochondrial dans le contrôle de la différenciation des cellules de Sertoli par la T3. Ce résultat démontre et confirme que cette isoforme de récepteur a des fonctions physiologiques. En effet, récemment, ce récepteur a été montré comme impliqué dans le contrôle de la sécrétion d'insuline par le pancréas et l'homéostasie du glucose (Blanchet *et al.*, 2011). Ce rôle physiologique est confirmé par notre étude qui montre également une importance de ce récepteur mitochondrial pour la physiologie testiculaire.

Le récepteur p43 est connu pour agir comme un facteur de transcription T3-dépendant du génome mitochondrial, qui régule la synthèse des protéines mitochondriales, la consommation d'oxygène et l'activité de la chaîne respiratoire (Wrutniak *et al.*, 1995; Casas *et al.*, 1999; Grandemange *et al.*, 2005).

Nous montrons par des approches de qRT-PCR que de nombreux gènes mitochondriaux sont up-régulés dans les testicules des souris p43KO à 3 jpp. Ces gènes codent principalement pour des molécules impliquées dans le transport (de la famille des Slc) et la translocation à travers la membrane des mitochondries (famille des Tomm et Timm) ainsi que pour des gènes

impliqués dans le contrôle de la prolifération (Cdkn2a et Sfn). De façon surprenante, aucun des gènes étudiés ne présente une expression diminuée.

Ces résultats sont en accord avec les observations de Casas et al. qui montrent qu'une modification d'expression de p43 conduit à une modification de la transcription des gènes cibles. En effet, Casas et ses collaborateurs montrent qu'une surexpression de p43 conduit à une augmentation de la transcription et de l'activité mitochondriale (Casas *et al.*, 2008). Cependant, Blanchet *et al.* (2011) montre que le KO de p43 dans le pancréas induit une diminution de l'activité mitochondriale dans les cellules des îlots pancréatiques. Ces résultats montrent que le rôle de p43 peut-être différent selon le type cellulaire considéré.

Dans le testicule, il est probable que les dérégulations de l'expression des gènes mitochondriaux que nous observons sont à l'origine de la modification de l'activité mitochondriale des cellules de Sertoli, suggérée par l'altération de l'ultrastructure des crêtes mitochondriales observée en microscope électronique. L'impact de cette dérégulation aurait pour effet une augmentation de la prolifération à 3 jpp. Or, nous montrons que plusieurs gènes up-régulés sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire. L'expression des gènes mitochondriaux Cdkn2a et Sfn, impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, est en effet augmentée. Nous avons observé une augmentation de l'expression de ces gènes dans le testicule des souris exprimant le dominant négatif les TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>. Nous observons également une augmentation de l'expression de Nefl chez les p43KO. Ce gène est connu pour être exprimé dans les cellules nerveuses et être impliqué dans la formation des neurofilaments. Ces autres fonctions sont peu connues. Toutefois, son expression est augmentée dans l'induction de la prolifération des cellules souches mésenchymateuses humaines par hypoxie (Wu *et al.* en 2007).

Nous n'avons pas mesuré l'expression de Cdk4 dans le testicule de souris p43KO, cela reste à faire. Cependant L'expression du gène c-myc chez les p43KO à 3 jpp (+1,59 fois) est augmentée. Or, ce facteur de transcription est connu pour réguler Cdk4. Par contre, nous montrons que l'expression de JunD n'est pas modifiée à cet âge chez les souris p43KO.

Il existe de nombreuses similitudes entre le phénotype testiculaire de la lignée p43KO et celui des lignées TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC et TR $\alpha$ 0. La comparaison des résultats obtenus pour les trois lignées p43KO, TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC est présentée dans le tableau ci-dessous.

	TR $\alpha$ 0	TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> -SC	p43KO
Poids testiculaire	+	+	+
Réserve spermatique	+	+	+
Prolifération des cellules de Sertoli à 3 jpp	+	+	+
Altération des mitochondries	+	+/-	+
Gènes mitochondriaux impliqués dans le transport	+	-	+
Gènes mitochondriaux impliqués dans la translocation	+/-	+	+
Gènes mitochondriaux contrôlant la prolifération: Cdkn2a et Sfn	+	+	+
Cdk4	+	+	ND
JunD	-	-	=
c-myc	+	+	+

Chez les souris p43KO, seule l'isoforme mitochondriale p43 est invalidée. Chez les souris TR $\alpha$ 0, toutes les isoformes, nucléaire TR $\alpha$ 1 et mitochondriale p43, sont invalidées. Par contre, chez les souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC, il y a cohabitation d'une forme sauvage du TR $\alpha$ 1 et du dominant négatif TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>. L'expression du récepteur p43 n'est pas touchée (communication personnelle de Frédéric Flamant, le créateur de la lignée TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>). Nous montrons dans le modèle TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC une perturbation de la structure des mitochondries et que l'expression de plusieurs gènes mitochondriaux est affectée. Ce résultat suggère l'hypothèse d'un contrôle de l'expression de l'isoforme mitochondriale p43 par le récepteur TR $\alpha$ 1 nucléaire. Pour vérifier cette hypothèse il serait nécessaire d'évaluer le niveau d'expression du récepteur p43 dans le testicule des souris exprimant le dominant négatif.

Chez les souris TR $\alpha$ 0 et les souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC, nous montrons une augmentation de l'expression de c-myc et de JunD alors que chez les souris p43KO, seul c-myc présente une augmentation d'expression. L'expression de JunD n'est pas modifiée chez les souris p43KO. Ce résultat suggère que la prolifération des cellules de Sertoli serait sous la double dépendance d'une régulation mitochondriale, qui aurait comme conséquence une modification

de l'expression de c-myc et, d'une régulation nucléaire dépendant de JunD. Chacun de ces facteurs de transcription aurait pour cible le promoteur de Cdk4. Ainsi, dans cette hypothèse le niveau d'expression de Cdk4 jouerait un rôle central dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli en intégrant le dialogue entre les deux génomes, nucléaire et mitochondrial via le niveau d'expression de la protéine c-myc.

Il est probable que le mécanisme identifié dans le contrôle de la différenciation des cellules de Sertoli ne soit pas spécifique aux cellules du testicule puisque que les travaux conduits par Rochard *et al.* (en 2000) montre que la surexpression de p43 stimule la différenciation des myoblastes. Il a été montré l'existence d'un dialogue mitochondrie/noyau, impliquant p43 dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération/différenciation des myoblastes (Rochard *et al.*, 2000; Seyer *et al.*, 2006; Casas *et al.*, 2009; Seyer *et al.*, 2011)

Toutefois, il nous reste à étudier l'expression de Cdk4 dans la lignée p43KO et analyser comment la dérégulation des gènes de la mitochondrie induit une modification de l'expression de c-myc.

Cependant, au regard de l'augmentation de l'expression de nombreux gènes mitochondriaux, il apparaît que l'activité de la mitochondrie serait augmentée. Grandemange et ses collaborateurs (2005) ont montré dans les fibroblastes que la surexpression de p43 entraîne une augmentation de l'activité mitochondriale qui induit une augmentation de la production des ROS (Reactive Oxygen Species). On peut donc supposer que la production des ROS qui seraient augmentée dans les testicules de nos trois lignées de souris. Il est connu que les ROS peuvent agir comme second messagers et, spécifiquement activer certaines voies de signalisation (Storz, 2005), notamment celles impliquées dans la prolifération (Burdon *et al.*, 1990; 1995 et 1996). De plus, deux études récentes (2011), réalisées d'une part, par Liu *et al.* sur des fibroblastes cardiaques et d'autre part, par Zhou *et al.* sur des cellules d'œsophages, montrent que la prolifération de ces cellules est corrélée à une augmentation des taux de ROS dans ces cellules. Cdkn2a et c-myc ont été montré récemment impliquées dans la régulation de la production des ROS (Jenkins *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2005). Il nous semble donc maintenant important d'évaluer le niveau des ROS, l'efficacité de la chaîne respiratoire des mitochondries des cellules de Sertoli et de les corrélés avec l'action de la T3 sur l'expression de c-myc et son impact sur la contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli.

## Conclusion générale & perspectives

Le contrôle de la balance prolifération/différenciation des cellules de Sertoli est un phénomène complexe, qui influence fortement le rendement de la spermatogenèse. L'implication des hormones thyroïdiennes dans ce processus est indéniable mais, les mécanismes par lesquels ces hormones agissent sont peu connus, notamment chez la souris.

Les études que nous avons menées sur différents modèles de souris transgéniques ont permis de démontrer un effet direct de la T3 sur le testicule et de mettre en évidence l'implication du récepteur nucléaire TR $\alpha$ 1 et du récepteur mitochondrial p43 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli T3-dépendant durant la période post-natale. Ce contrôle T3-dépendant impliquerait un dialogue entre des facteurs exprimés par le génome mitochondrial et par des facteurs exprimés par le génome nucléaire.

Toutefois, nos travaux soulèvent un certain nombre de questions qui restent à élucider.

# I. Quels sont les facteurs, induits par l'activation du TR $\alpha$ 1 par la T3, qui sont impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli?

Les travaux publiés par l'équipe de Cooke, montrent, chez les souris présentant une invalidation du récepteur TR $\alpha$ 1, une augmentation significative du poids testiculaire. Contrairement à nos observations, ils ne montrent pas d'augmentation du nombre de cellules de Sertoli et de la réserve spermatique. Cependant, il indique que les protéines p21Cip1 et p27Kip1 seraient responsables du contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli. Ces deux acteurs du cycle cellulaires sont impliqués dans le contrôle de la prolifération, ce sont des CDKIs (Cyclin-Dependant Kinase Inhibitors), ils sont connus pour inhiber les complexes cyclines/Cdks. Cette équipe a analysé les phénotypes testiculaires des souris p21KO et p27KO (Holsberger *et al.*, 2005). Chez ces souris présentant une invalidation de ces gènes, ils observent que les poids testiculaires sont significativement augmentés ainsi que la production spermatique à l'âge adulte. Chez les souris p27KO, le nombre de cellules de Sertoli est significativement augmenté. A partir de ces deux études, ils affirment que l'augmentation du poids testiculaire corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire serait due à une diminution de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire, p21Cip1 et p27Kip1 mais, cela n'a jamais été démontré. De plus, ils n'ont montré aucune différence du niveau d'expression de la protéine p27Kip1 dans les testicules des souris présentant une invalidation du récepteur TR $\alpha$ 1.

Certes, l'invalidation de p21Cip1 et p27Kip1 conduit à un phénotype similaire à celui observé chez les souris TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha$ <sup>AM1</sup>-SC mais, il est probable que cela n'implique pas les mêmes acteurs du cycle cellulaire et cela pourrait être indépendant d'une activation par la T3 via le récepteur TR $\alpha$ 1.

Nos travaux remettent en question les résultats de l'équipe de Cooke. En effet, nous démontrons, dans nos modèles, que l'expression de p21Cip1 et p27Kip1 n'est pas modifiée. Nos résultats mettent en évidence des acteurs qui jusqu'alors n'avaient jamais été impliqués dans le contrôle de la prolifération post-natale des cellules de Sertoli. L'action du récepteur

TR $\alpha$ 1 passe principalement par l'activation de Cdk4 et Cdkn2a. L'activation de Cdk4 dépend de deux facteurs de transcription codés par le génome nucléaire: JunD, qui est un puissant inhibiteur et c-myc, qui est un activateur de la transcription du gène codant pour Cdk4. Ces acteurs sont potentiellement régulés par la T3. En effet, en utilisant des outils de prédiction bioinformatiques, l'équipe de Flamant a analysé le génome murin et listé les gènes possédant des sites TREs putatifs dans leurs promoteurs (via la recherche de la présence de séquences consensus DR4; Quignodon *et al.*, 2007) et, la présence de TREs a été mise en évidence pour les gènes Cdk4, JunD et c-myc dans le génome murin.

Cependant, nous ne pouvons pas exclure que d'autres facteurs pourraient être impliqués dans la régulation du cycle cellulaire par la T3. Il serait donc important de réaliser une étude pangénomique afin d'identifier les gènes dont la transcription est induite par la T3. Il serait également intéressant d'identifier les promoteurs de gènes capables de fixer le récepteur TR $\alpha$ 1, par des expériences de ChIPSeq, sur des cellules de Sertoli isolées.

## II. Existe-t-il d'autres récepteurs, autres que TR $\alpha$ 1 et p43, impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli chez la souris?

Nous confirmons l'implication du récepteur TR $\alpha$ 1 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli. Pour la première fois, nous montrons l'implication du récepteur mitochondrial p43 dans cette régulation de la prolifération des cellules de Sertoli chez la souris par la T3. En effet, nous démontrons que le phénotype testiculaire des souris p43KO est similaire à celui des souris TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC (augmentations des poids testiculaire, réserve spermatique, prolifération des cellules de Sertoli *in vivo* à 3jpp; altération de l'ultrastructure des crêtes mitochondriales ; modifications de l'expression des gènes mitochondriaux). De façon surprenante, si non traitons les souris TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC à la T3, nous observons une diminution significative du poids testiculaire. Ceci pourrait être dû à la présence de l'allèle sauvage mais, nous ne pouvons exclure l'implication d'un autre récepteur qui compenserait l'absence du récepteur TR $\alpha$ 1 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli en réponse à la T3. Toutefois, l'invalidation du récepteur TR $\beta$ 1 permet d'écartier un rôle de ce récepteur dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli T3-dépendant (Holsberger *et al.*, 2005).

Nous avons observé dans de la lignée de souris TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -Aro, une augmentation significative de la sécrétion de testostérone, induite par stimulation hCG. Or, chez les souris TR $\alpha$ 0, TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -SC et p43KO, le niveau de testostérone sous stimulation hCG n'est pas significativement augmenté. Cette augmentation de la sécrétion de testostérone induite par stimulation à la hCG chez les souris TR $\alpha^{\text{AMI}}$ -Aro soulève l'hypothèse d'une compensation par d'autres récepteurs pour le contrôle de la stéroïdogénèse chez l'adulte. Ces récepteurs pourraient être les récepteurs TR $\beta$ 1. La présence des ARNm de TR $\beta$ 1 dans les cellules de Sertoli est controversée (Palmero *et al.*, 1995; Buzzard *et al.*, 2000 Rao *et al.*, 2003; Jannini *et al.*, 1994 et 2000; Canale *et al.*, 2001). Dans nos modèles de souris, l'expression des ARNm de TR $\beta$  dans le testicule entier à 3 jpp n'est pas détectée. Son expression pourrait être plus tardive.

On peut également imaginer l'implication de TR $\alpha$ 2. L'isoforme TR $\alpha$ 2 est également exprimé dans les cellules de Sertoli (rat: Jannini *et al.*, 1994; Arampebola *et al.*, 1998; homme: Jannini *et al.*, 2000). Nous avons détecté son expression dans le testicule de souris à 3 jpp. Cet isoforme ne lie pas la T3 mais, il peut se lier aux TREs malgré l'absence de fixation du ligand (O'Shea *et al.*, 2002), ce qui fait de lui un antagoniste constitutif dans la signalisation de la T3. Il est ainsi capable d'inhiber l'expression des gènes cibles de la T3.

Il nous semble donc maintenant important de tester cette hypothèse et d'analyser le rôle de ce récepteur TR $\alpha$ 2 aux moments clés du développement des cellules de Sertoli et chez l'adulte, pour le contrôle de la stéroïdogénèse.

### III. Comment les voies de signalisation induites par la T3 et celles induites par la FSH contrôlent de la prolifération des cellules de Sertoli?

Le développement testiculaire et ses fonctions sont sous contrôle hormonal. La prolifération des cellules de Sertoli est sous contrôle de la T3 mais aussi, de la FSH, qui est considérée comme le facteur endocrine majeur de régulation des fonctions sertoliennes. La FSH et la T3 ont des effets opposés sur la prolifération des cellules de Sertoli. En effet, la FSH augmente alors que la T3 diminue la prolifération des cellules de Sertoli. La FSH augmente la prolifération des cellules de Sertoli durant la période pré-pubertaire, *in vivo* (Orth *et al.*, 1984) et *in vitro* (Crépieux *et al.*, 2001). *In vitro*, cette augmentation est corrélée à une augmentation de l'expression de la cycline D1, impliquant la voie des MAP kinases ERKs (Crépieux *et al.*, 2001). D'après notre étude, le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli par la T3 implique la voie Cdk4/JunD/Cdkn2a/c-myc. Nos travaux concluent à l'hypothèse que les acteurs moléculaires, induits par la T3 et par la FSH, pour contrôler le cycle cellulaire semblent différents, bien que des travaux complémentaires soient nécessaires. Il est important de vérifier cette hypothèse afin de déterminer si ces deux hormones ont des effets opposés sur la prolifération des cellules de Sertoli, en impliquant des acteurs moléculaires différents, qui agissent par deux voies parallèles pour réguler la prolifération des cellules de Sertoli.

De plus, il est indispensable de vérifier si l'expression de la FSH n'est pas altérée chez les TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC. En effet, l'expression de l'inhibine pourrait être modifiée chez ces animaux, altérant le rétrocontrôle de la FSH. Il est connu que l'inhibine est impliquée dans la régulation de la prolifération des cellules de Sertoli via son action de feedback négatif sur la FSH (de Kretser *et al.*, 2000).

## IV. Pourquoi la T3 induit la différenciation des cellules de Sertoli uniquement après la naissance?

Pourquoi la T3 n'affecte pas la première phase de prolifération des cellules de Sertoli, qui a lieu pendant le développement embryonnaire, alors qu'elle affecte la phase de prolifération post-natale ?

Chez la souris, la différenciation des cordons séminifères a lieu à 12,5 jpc. A 18 jpc, la gonade est bien différenciée. Chez la souris, la glande thyroïde est fonctionnelle dès 15,5 jpc. La T3 est détectée dès 15,5 jpc (Forrest *et al.*, 1991; Morreale de Escobar *et al.*, 1985) et le récepteur TR $\alpha$ 1 dès 14,5 jpc, dans le cerveau (Morreale de Escobar *et al.*, 1985). Les déiodases, qui assurent la conversion de la T4 en sa forme active T3 n'ont pas été étudiées au cours du développement chez la souris. Chez le rat, les profils d'expression des différents types de déiodases ont été étudiés dès la vie fœtale, une expression de la déiodase de type I dans le foie et l'intestin et de la déiodase de type II dans le tissu adipeux brun a été observée (Bates *et al.*, 1999). La T3 est présente dans le testicule fœtal par contre, aucune information sur l'expression des récepteurs TRs et des déiodases n'est disponible actuellement. Ce point paraît essentiel à élucider au regard de la présence de la T3, et d'une éventuelle expression des TRs et des déiodases dans le testicule pendant la vie fœtale.

Il serait donc important de mieux comprendre la cinétique d'action de la T3 dans le développement testiculaire en évaluant les niveaux de T3 et de T4 dans le testicule et, l'expression des récepteurs TRs et des déiodases au cours du développement embryonnaire du testicule. Cette étude devrait nous permettre de comprendre pourquoi le T3 n'inhibe pas la prolifération des cellules de Sertoli durant la vie fœtale.

## V. Quels sont les acteurs qui établissent le dialogue entre génome nucléaire et génome mitochondrial suite à l'activation par la T3 des récepteurs TR $\alpha$ 1 et p43?

Nous avons montré que le récepteur mitochondrial p43 est fonctionnel dans le testicule. Ce résultat est en accord avec les résultats montrant que la T3 a une action directe sur cet isoforme, qui est importé dans la mitochondrie pour stimuler la transcription du génome mitochondrial (Wrutniak *et al.*, 1995; Casas *et al.*, 1999). Wrutniak et ses collaborateurs (1995) ont en effet montré que la partie N-terminale de p43 sert de facteur de transcription T3-dépendant initiant la transcription des gènes mitochondriaux. La régulation directe de la synthèse d'ARNs mitochondriaux par la T3 a été démontrée en 1999 par Enriquez et ses collaborateurs; ils ont montré que la T3 influence de manière directe la transcription des gènes mitochondriaux en permettant l'accès des facteurs protéiques requis pour la transcription.

Nous avons mis en évidence dans nos trois lignées une modification de la morphologie des mitochondries et une augmentation de la transcription de nombreux gènes mitochondriaux, impliqués dans les activités mitochondriales, notamment dans le transport et la translocation de molécules au travers des membranes mitochondriales. L'implication de la T3 dans le contrôle de la mitochondriogenèse et des activités mitochondriales est démontrée (Harper and Seifert, 2008; Kim, 2008) mais, les mécanismes responsables sont inconnus (Cheng *et al.*, 2010). En général, de haut niveau de T3 stimule l'activité respiratoire des mitochondries alors que l'activité est basse dans le cas d'hypothyroïdie (Garesse *et al.*, 2001). Les niveaux d'ARNm de plusieurs gènes mitochondriaux codés à la fois par le génome nucléaire et le génome mitochondrial ont été démontrés comme modifiés drastiquement en réponse au niveau de T3 dans plusieurs tissus dont le foie et le cerveau (Alvarez-Dolado *et al.*, 1999; Izquierdo and Cuezva, 1993; Joste *et al.*, 1989; Luciakova and Nelson, 1992; Vega-Nunez *et al.*, 1995; Wiesner *et al.*, 1992).

Les interactions entre les deux génomes semblent impliquer deux voies (Parikh *et al.*, 1987 ; Poyton and McEwen, 1996). La première voie implique le fait que le génome nucléaire

code pour les sous-unités de protéines mitochondriales et cela est important pour la régulation de la production d'énergie oxydative. Ces sous-unités sont régulées différemment (par les signaux induits lors du développement) et permettent aux tissus d'ajuster leur production d'énergie en fonction des demandes. La deuxième voie implique la collaboration des deux génomes pour la synthèse et l'assemblage des protéines mitochondriales. Cette régulation requiert des échanges entre noyau et mitochondrie. Les communications noyau vers mitochondrie se font via les protéines traduites dans le cytosol et importées dans la mitochondrie. Les communications mitochondrie vers noyau impliquent des signaux métaboliques et des voies de transduction au travers de la membrane interne de la mitochondrie (Liu and Butow, 1999; Epstein *et al.*, 2001).

L'équipe de Cabello a comparé les influences respectives des voies d'action nucléaire et mitochondriale de la T3 (Cabello *et al.*, 2008). Ils ont fait apparaître, selon les effets considérés, une complémentarité (différenciation des myoblastes, mitochondriogenèse), une additivité (différenciation des myoblastes) ou des actions opposées (expression des myosines), induisant ainsi une finesse particulière de la régulation des effets physiologiques de l'hormone. Nos résultats mettent en évidence une grande finesse de la régulation des effets physiologiques de la T3 sur le développement post-natal testiculaire, via la complémentarité des deux voies d'action, nucléaire et mitochondriale.

Nous avons montré que les lignées TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC, TR $\alpha$ 0 et p43KO présentent un phénotype similaire. Or, dans la lignée p43KO, c'est la forme mitochondriale qui est affectée alors que dans la lignée TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC elle n'est pas affectée. Le fait qu'on aboutisse au même phénotype en n'altérant pas les mêmes récepteurs est troublant et, met en évidence un dialogue entre génome nucléaire et génome mitochondrial pour le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli. Les études menées initialement sur les mécanismes régulateurs gouvernant les interactions entre les deux génomes se sont focalisées sur l'expression et l'import des gènes nucléaires impliqués dans les fonctions mitochondriales (Forsburg and Guarente 1989). L'expression de ces gènes a été montrée comme répondant au changement de niveau d'oxygène (Poyton and McEwen, 1996), qui régule les gènes impliqués dans le transport des électrons mais aussi les enzymes impliquées dans les différentes voies de biosynthèse. Nous avons montré l'implication de Cdk4 et de ses régulateurs, JunD et c-myc chez les TR $\alpha$ 0 et TR $\alpha$ <sup>AMI</sup>-SC. Chez les p43KO, le fait que l'expression de JunD ne soit pas modifiée et que celle de c-myc soit augmentée significativement montre l'existence de plusieurs voies de signalisation. Il a été démontré que l'expression du proto-oncogène c-myc

est respectivement stimulée ou diminuée par une inhibition ou une stimulation de l'activité mitochondriale. Cette régulation s'effectue en grande partie au niveau de la stabilité du messenger, et au niveau de la localisation cellulaire de la protéine dans les myoblastes. De plus, la surexpression de c-myc reproduit très exactement les effets d'une inhibition de l'activité mitochondriale dans le muscle (Seyer *et al.*, 2006). Dans notre étude, l'augmentation d'expression de c-myc semble être la conséquence de l'augmentation de l'expression des gènes mitochondriaux. c-myc est connu pour réguler Cdk4 et les fonctions mitochondriales, il pourrait donc faire le lien entre les deux génomes.

Il nous reste à étudier l'expression de Cdk4, qui régulée à la fois par JunD et c-myc, pourrait être le pivot de ce dialogue entre les deux génomes ainsi qu'à mettre en évidence les facteurs mitochondriaux qui activent l'expression de c-myc.

L'implication des ROS nous semble une piste intéressante. En effet, il est connu que les ROS peuvent agir comme second messagers et, spécifiquement activer certaines voies de signalisation (Storz, 2005), notamment celles impliquées dans la prolifération (Burdon *et al.*, 1990; 1995 et 1996). Une étude récente montre qu'il y aurait un lien entre c-myc et la production des ROS (Dang *et al.*, 2005). Il nous semble donc maintenant important d'évaluer le niveau des ROS afin de déterminer s'ils sont impliqués dans la régulation de l'expression du facteur nucléaire c-myc.

## VI. Quelles applications à nos travaux?

L'analyse de nos modèles de souris montre l'importance d'une régulation fine du développement testiculaire par l'hormone thyroïdienne.

Les problèmes d'infertilité masculine ne cessent de croître en Europe (chez l'homme et chez les espèces sauvages). L'origine des mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement du testicule et conduisant à une réduction de la production de spermatozoïdes est encore méconnue.

Parmi les facteurs induisant ces dysfonctionnements, on trouve les perturbateurs endocriniens qui impactent gravement les fonctions gonadiques. De nombreuses études montrent que l'exposition maternelle durant la grossesse à ces molécules présentes dans les médicaments, cosmétiques ou autres, affecte le développement testiculaire fœtal (Howdeshell *et al.*, 2008; Rider *et al.*, 2008; Sharpe, 2008, Scott *et al.*, 2008; Sharpe, 2010). Les principaux perturbateurs endocriniens sont des molécules à effets oestrogéniques, anti-oestrogéniques ou anti-androgéniques. Ils altèrent notamment la production de testostérone et conduisent à une diminution de la prolifération des cellules de Sertoli et la production spermatique à l'âge adulte (Skakkebaek *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2009). Il a été montré que l'exposition à des anti-androgéniques chimiques durant une période critique de la vie fœtale chez le rat conduit chez l'adulte à une réduction de la taille testiculaire et une diminution de la production spermatique (Scott *et al.*, 2008). En effet, l'action anti-androgénique provoque un blocage de la méiose des cellules germinales au stade diplotène (De Gendt *et al.*, 2004). La période fœtale et la période néonatale sont les périodes sensibles où les cellules de Sertoli prolifèrent (Scott *et al.*, 2008; Sharpe, 2010) et, on connaît l'importance de la mise en place des cellules de Sertoli puisque ce sont elles qui conditionnent le rendement de la spermatogenèse (Orth *et al.*, 1988).

Dans notre étude, nous avons montré l'importance de la régulation par les hormones thyroïdiennes pour le bon développement du testicule et notamment leur importance pour le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli lors de la période post-natale. On peut donc considérer l'intérêt d'étudier les perturbateurs. Ces molécules sont à l'origine de l'altération de la fonction thyroïdienne; elles interfèrent avec les enzymes régulatrices associées à

l'homéostasie thyroïdienne ou bien, modifient la concentration circulante ou tissulaire des hormones thyroïdiennes. Ces perturbateurs peuvent donc agir à différents niveaux (Crofton, 2008).

Beaucoup de molécules semblent impliquer dans l'induction d'hypothyroïdisme, qui d'un point de vue fertilité n'est normalement pas dommageable puisqu'à l'origine d'une augmentation de la taille des testicules. Les perturbateurs qui, à l'inverse peuvent provoquer une hyperthyroïdie, présentent un grand intérêt à être étudié puisqu'ils pourraient expliquer les baisses de rendements de la spermatogenèse observées chez l'homme et les espèces sauvages. Parmi eux, les PCBs sont connus pour augmenter le niveau de déiodases de type II dans le cerveau, chez les rongeurs. Le Bisphénol A est un antagoniste des récepteurs aux hormones thyroïdiennes chez l'animal (Moriyama *et al.*, 2002 chez le rat; Zoeller *et al.*, 2005 chez le rat; Iwamuro *et al.*, 2006 chez le xénope). Le Bisphénol A, tout comme les hydroxy-PCBs peuvent altérer l'activation de la transcription des gènes cibles des hormones thyroïdiennes (Crofton, 2008). Il est donc important de prendre en compte l'impact de ces molécules sur le développement testiculaire.

Au vue de toutes ces données bibliographiques et de nos résultats, il semble nécessaire de prendre en compte l'impact des perturbateurs thyroïdiens, via exposition précoce, sur le fonctionnement et le rendement de la spermatogenèse. En effet, il est probable que ces produits chimiques aient une part de responsabilité dans la baisse de fertilité observée chez l'homme ces dernières années. Les modèles murins que nous avons étudiés sont des modèles de choix pour comprendre par quels mécanismes ces perturbateurs agissent et altèrent la fonction testiculaire.

# Bibliographie

- Abel ED, Boers ME, Pazos-Moura C, Moura E, Kaulbach H, Zakaria M, Lowell B, Radovick S, Liberman MC, Wondisford F. 1999. Divergent roles for thyroid hormone receptor beta isoforms in the endocrine axis and auditory system. *The Journal of clinical investigation* 104(3): 291-300.
- Abel ED, Kaulbach HC, Campos-Barros A, Ahima RS, Boers ME, Hashimoto K, Forrest D, Wondisford FE. 1999. Novel insight from transgenic mice into thyroid hormone resistance and the regulation of thyrotropin. *The Journal of clinical investigation* 103(2): 271-279.
- Abney TO. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids* 64(9): 610-617.
- Allan CM, Garcia A, Spaliviero J, Zhang FP, Jimenez M, Huhtaniemi I, Handelsman DJ. 2004. Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology* 145(4): 1587-1593.
- Alvarez-Dolado M, Gonzalez-Moreno M, Valencia A, Zenke M, Bernal J, Munoz A. 1999. Identification of a mammalian homologue of the fungal Tom70 mitochondrial precursor protein import receptor as a thyroid hormone-regulated gene in specific brain regions. *Journal of neurochemistry* 73(6): 2240-2249.
- Amory JK, Bremner W. 2001. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. *Mol Cell Endocrinol* 182(2): 175-179.
- Andersson ML, Vennstrom B. 1997. Chicken thyroid hormone receptor alpha requires the N-terminal amino acids for exclusive nuclear localization. *FEBS letters* 416(3): 291-296.
- Ando S, Sirianni R, Forastieri P, Casaburi I, Lanzino M, Rago V, Giordano F, Giordano C, Carpino A, Pezzi V. 2001. Aromatase expression in prepubertal Sertoli cells: effect of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 178(1-2): 11-21.
- Andrews JF, Lynch M, Moore RE. 1979. The early metabolic response of lambs to small doses of 3,3',5-triiodothyronine [proceedings]. *The Journal of physiology* 293: 49P.
- Antony FF, Aruldas MM, Udhayakumar RC, Maran RR, Govindarajulu P. 1995. Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in hypothyroid rats. *The Journal of endocrinology* 144(2): 293-300.
- Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS. 1998. Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate Mullerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology* 139(11): 4489-4495.
- Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS. 1998. Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. *The Journal of endocrinology* 156(1): 43-50.
- Arpin C, Pihlgren M, Fraichard A, Aubert D, Samarut J, Chassande O, Marvel J. 2000. Effects of T3R alpha 1 and T3R alpha 2 gene deletion on T and B lymphocyte development. *J Immunol* 164(1): 152-160.
- Baird DT, Uno A, Melby JC. 1969. Adrenal secretion of androgens and oestrogens. *The Journal of endocrinology* 45(1): 135-136.
- Baker PJ, O'Shaughnessy PJ. 2001. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* 122(2): 227-234.

- Ball SG, Sokolov J, Chin WW. 1997. 3,5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *Journal of molecular endocrinology* 19(2): 137-147.
- Bates JM, St Germain DL, Galton VA. 1999. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* 140(2): 844-851.
- Batias C, Siffroi JP, Fenichel P, Pointis G, Segretain D. 2000. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 48(6): 793-805.
- Bell JB, Vinson GP, Lacy D. 1968. Biosynthesis of steroids in rat testis seminiferous tubules. *The Biochemical journal* 110(4): 58P-59P.
- Bellve AR. 1993. Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* 225: 84-113.
- Bellve AR, Millette CF, Bhatnagar YM, O'Brien DA. 1977. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 25(7): 480-494.
- Benahmed M. 1997. [Role of tumor necrosis factor in the male gonad]. *Contracept Fertil Sex* 25(7-8): 569-571.
- Benahmed M, Dellamonica C, Haour F, Saez TM. 1981. Specific low density lipoprotein receptors in pig Leydig cells. Role of this lipoprotein in cultured Leydig cells steroidogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 99(4): 1123-1130.
- Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ. 2005. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146(7): 2864-2871.
- Berghagen H, Ragnhildstveit E, Krogsrud K, Thuestad G, Apriletti J, Saatcioglu F. 2002. Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor T3Ralpha from a negative hormone response element. *The Journal of biological chemistry* 277(51): 49517-49522.
- Beumer TL, Kiyokawa H, Roepers-Gajadien HL, van den Bos LA, Lock TM, Gademan IS, Rutgers DH, Koff A, de Rooij DG. 1999. Regulatory role of p27kip1 in the mouse and human testis. *Endocrinology* 140(4): 1834-1840.
- Bhargava M, Lei J, Mariash CN, Ingbar DH. 2007. Thyroid hormone rapidly stimulates alveolar Na,K-ATPase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 14(5): 416-420.
- Blanchard MG, Josso N. 1974. Source of the anti-Mullerian hormone synthesized by the fetal testis: Mullerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediatric research* 8(12): 968-971.
- Blanchet E, Bertrand C, Annicotte JS, Schlernitzauer A, Pessemesse L, Levin J, Fouret G, Feillet-Coudray C, Bonafos B, Fajas L et al. 2011. Mitochondrial T3 receptor p43 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C. 1999. Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Biology of reproduction* 61(6): 1541-1547.
- Boitani C, Stefanini M, Fragale A, Morena AR. 1995. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. *Endocrinology* 136(12): 5438-5444.
- Borland K, Mita M, Oppenheimer CL, Blinderman LA, Massague J, Hall PF, Czech MP. 1984. The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 114(1): 240-246.

- Brehm R, Steger K. 2005. Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 181: 1-93.
- Brehm R, Zeiler M, Ruttinger C, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lecureuil C, Steger K et al. 2007. A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *The American journal of pathology* 171(1): 19-31.
- Brennan J, Capel B. 2004. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature reviews Genetics* 5(7): 509-521.
- Brent GA. 1994. The molecular basis of thyroid hormone action. *The New England journal of medicine* 331(13): 847-853.
- Bunick D, Kirby J, Hess RA, Cooke PS. 1994. Developmental expression of testis messenger ribonucleic acids in the rat following propylthiouracil-induced neonatal hypothyroidism. *Biology of reproduction* 51(4): 706-713.
- Burdon RH. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free radical biology & medicine* 18(4): 775-794.
- Burdon RH. 1996. Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochemical Society transactions* 24(4): 1028-1032.
- Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C. 1990. Oxidative stress and tumour cell proliferation. *Free radical research communications* 11(1-3): 65-76.
- Burgos-Trinidad M, Koenig RJ. 1999. Dominant negative activity of thyroid hormone receptor variant alpha2 and interaction with nuclear corepressors. *Mol Cell Endocrinol* 149(1-2): 107-114.
- Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. 2000. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of reproduction* 62(3): 664-669.
- Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR. 2003. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology* 144(9): 3722-3731.
- Wrutniak-Cabello C, Carazo A, Casas F, Cabello G. 2008. Les récepteurs mitochondriaux de la triiodothyronine : import et mécanismes d'action. *Journal de la Société de Biologie* 202: 83-92.
- Canale D, Agostini M, Giorgilli G, Caglieresi C, Scartabelli G, Nardini V, Jannini EA, Martino E, Pinchera A, Macchia E. 2001. Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *Journal of andrology* 22(2): 284-288.
- Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H. 2005. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* 19(1): 102-112.
- Carosa E, Radico C, Giansante N, Rossi S, D'Adamo F, Di Stasi SM, Lenzi A, Jannini EA. 2005. Ontogenetic profile and thyroid hormone regulation of type-1 and type-8 glucose transporters in rat Sertoli cells. *International journal of andrology* 28(2): 99-106.
- Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *International journal of andrology* 22(4): 211-223.
- Casas F, Busson M, Grandemange S, Seyer P, Carazo A, Pesseme L, Wrutniak-Cabello C, Cabello G. 2006. Characterization of a novel thyroid hormone receptor alpha variant involved in the regulation of myoblast differentiation. *Mol Endocrinol* 20(4): 749-763.
- Casas F, Domenjoud L, Rochard P, Hatier R, Rodier A, Daury L, Bianchi A, Kremarik-Bouillaud P, Becuwe P, Keller J et al. 2000. A 45 kDa protein related to

- PPAR $\gamma$ 2, induced by peroxisome proliferators, is located in the mitochondrial matrix. *FEBS letters* 478(1-2): 4-8.
- Casas F, Pessemesse L, Grandemange S, Seyer P, Baris O, Gueguen N, Ramonatxo C, Perrin F, Fouret G, Lepourry L et al. 2009. Overexpression of the mitochondrial T3 receptor induces skeletal muscle atrophy during aging. *PloS one* 4(5): e5631.
- Casas F, Pessemesse L, Grandemange S, Seyer P, Gueguen N, Baris O, Lepourry L, Cabello G, Wrutniak-Cabello C. 2008. Overexpression of the mitochondrial T3 receptor p43 induces a shift in skeletal muscle fiber types. *PloS one* 3(6): e2501.
- Casas F, Rochard P, Rodier A, Cassar-Malek I, Marchal-Victorion S, Wiesner RJ, Cabello G, Wrutniak C. 1999. A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbA $\alpha$ 1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Molecular and cellular biology* 19(12): 7913-7924.
- Cassard-Doulier AM, Larose M, Matamala JC, Champigny O, Bouillaud F, Ricquier D. 1994. In vitro interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 269(39): 24335-24342.
- Catalano S, Pezzi V, Chimento A, Giordano C, Carpino A, Young M, McPhaul MJ, Ando S. 2003. Triiodothyronine decreases the activity of the proximal promoter (PII) of the aromatase gene in the mouse Sertoli cell line, TM4. *Mol Endocrinol* 17(5): 923-934.
- Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S. 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(18): 6876-6881.
- Charles MA, Mortensen AH, Potok MA, Camper SA. 2008. Pitx2 deletion in pituitary gonadotropes is compatible with gonadal development, puberty, and fertility. *Genesis* 46(10): 507-514.
- Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, Laudet V, Samarut J. 1997. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrinol* 11(9): 1278-1290.
- Chaudhary J, Skinner MK. 1995. Transcriptional regulation of Sertoli cell differentiation (transferrin promoter activation) during testicular development. *Developmental genetics* 16(2): 114-118.
- Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, Zhao GQ, Arber S, Kurpios N, Murphy TL et al. 2005. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* 436(7053): 1030-1034.
- Chen JD, Evans RM. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377(6548): 454-457.
- Chen Y, Wang H, Qi N, Wu H, Xiong W, Ma J, Lu Q, Han D. 2009. Functions of TAM RTKs in regulating spermatogenesis and male fertility in mice. *Reproduction* 138:655-666.
- Cheng CY, Mruk DD. 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological reviews* 82(4): 825-874.
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 31(2): 139-170.
- Christensen AK, Fawcett DW. 1966. The fine structure of testicular interstitial cells in mice. *Am J Anat* 118(2): 551-571.

- Cipriano SC, Chen L, Burns KH, Koff A, Matzuk MM. 2001. Inhibin and p27 interact to regulate gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 15(6): 985-996.
- Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. 1994. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *The Journal of biological chemistry* 269(45): 28314-28322.
- Clermont Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews* 52(1): 198-236.
- Clermont Y, Perey B. 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* 100(2): 241-267.
- Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. 1996. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 272(5263): 877-880.
- Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM. 2001. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104(6): 875-889.
- Conley A, Hinshelwood M. 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction* 121(5): 685-695.
- Cooke PS. 1991. Thyroid hormones and testis development: a model system for increasing testis growth and sperm production. *Annals of the New York Academy of Sciences* 637: 122-132.
- Cooke PS, Meisami E. 1991. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology* 129(1): 237-243.
- Cooke PS, Zhao YD, Bunick D. 1994. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biology of reproduction* 51(5): 1000-1005.
- Craig R, Larkin A, Mingo AM, Thuerauf DJ, Andrews C, McDonough PM, Glembotski CC. 2000. p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *The Journal of biological chemistry* 275(31): 23814-23824.
- Crepieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F, Reiter E. 2001. The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* 20(34): 4696-4709.
- Crofton KM. 2008. Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures. *International journal of andrology* 31(2): 209-223.
- Dang CV, Li F, Lee LA. 2005. Could MYC induction of mitochondrial biogenesis be linked to ROS production and genomic instability? *Cell Cycle* 4(11): 1465-1466.
- D'Arezzo S, Incerpi S, Davis FB, Acconcia F, Marino M, Farias RN, Davis PJ. 2004. Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. *Endocrinology* 145(12): 5694-5703.
- Davis FB, Davis PJ, Blas SD. 1983. Role of calmodulin in thyroid hormone stimulation in vitro of human erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *The Journal of clinical investigation* 71(3): 579-586.
- Davis PJ, Davis FB, Cody V. 2005. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16(9): 429-435.
- Davis PJ, Davis FB, Lawrence WD. 1989. Thyroid hormone regulation of membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Endocrine research* 15(4): 651-682.
- Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in neuroendocrinology* 29(2): 211-218.

- De Franca LR, Hess RA, Cooke PS, Russell LD. 1995. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *The Anatomical record* 242(1): 57-69.
- De Gendt K, Atanassova N, Tan KA, de Franca LR, Parreira GG, McKinnell C, Sharpe RM, Saunders PT, Mason JI, Hartung S et al. 2005. Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 146(9): 4117-4126.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C et al. 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(5): 1327-1332.
- de Kretser DM, Hedger MP, Loveland KL, Phillips DJ. 2002. Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Human reproduction update* 8(6): 529-541.
- de Kretser DM, Meinhardt A, Meehan T, Phillips DJ, O'Bryan MK, Loveland KA. 2000. The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. *Mol Cell Endocrinol* 161(1-2): 43-46.
- de Rooij DG. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121(3): 347-354.
- Decrouy X, Gasc JM, Pointis G, Segretain D. 2004. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. *Journal of cellular physiology* 200(1): 146-154.
- Denolet E, De Gendt K, Allemeersch J, Engelen K, Marchal K, Van Hummelen P, Tan KA, Sharpe RM, Saunders PT, Swinnen JV et al. 2006. The effect of a sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. *Mol Endocrinol* 20(2): 321-334.
- Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Boutati E, Maratou E, Panagiotakos DB, Koukkou E, Tzanela M, Thalassinou N, Raptis SA. 2006. Insulin action in adipose tissue and muscle in hypothyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(12): 4930-4937.
- Donahoe PK, Takahashi M, Ueno S, Manganaro TF. 1988. Mullerian inhibiting substance in the ovary. *Progress in clinical and biological research* 267: 153-175.
- Dym M. 1994. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(24): 11287-11289.
- Eacker SM, Shima JE, Connolly CM, Sharma M, Holdcraft RW, Griswold MD, Braun RE. 2007. Transcriptional profiling of androgen receptor (AR) mutants suggests instructive and permissive roles of AR signaling in germ cell development. *Mol Endocrinol* 21(4): 895-907.
- Eckey M, Moehren U, Baniahmad A. 2003. Gene silencing by the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 213(1): 13-22.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137(11): 4796-4805.
- Enriquez JA, Fernandez-Silva P, Garrido-Perez N, Lopez-Perez MJ, Perez-Martos A, Montoya J. 1999. Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Molecular and cellular biology* 19(1): 657-670.
- Epstein CB, Waddle JA, Hale Wt, Dave V, Thornton J, Macatee TL, Garner HR, Butow RA. 2001. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Molecular biology of the cell* 12(2): 297-308.

- Erickson-Lawrence M, Zabludoff SD, Wright WW. 1991. Cyclic protein-2, a secretory product of rat Sertoli cells, is the proenzyme form of cathepsin L. *Mol Endocrinol* 5(12): 1789-1798.
- Feng W, Ribeiro RC, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ, West BL. 1998. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280(5370): 1747-1749.
- Fiorini C, Decrouy X, Defamie N, Segretain D, Pointis G. 2006. Opposite regulation of connexin33 and connexin43 by LPS and IL-1alpha in spermatogenesis. *American journal of physiology Cell physiology* 290(3): C733-740.
- Fiorini C, Mograbi B, Cronier L, Bourget I, Decrouy X, Nebout M, Ferrua B, Malassine A, Samson M, Fenichel P et al. 2004. Dominant negative effect of connexin33 on gap junctional communication is mediated by connexin43 sequestration. *Journal of cell science* 117(Pt 20): 4665-4672.
- Flamant F, Gauthier K, Samarut J. 2007. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol* 21(2): 321-333.
- Flamant F, Samarut J. 2003. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14(2): 85-90.
- Fondell JD, Roy AL, Roeder RG. 1993. Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes & development* 7(7B): 1400-1410.
- Forrest D, Hallbook F, Persson H, Vennstrom B. 1991. Distinct functions for thyroid hormone receptors alpha and beta in brain development indicated by differential expression of receptor genes. *The EMBO journal* 10(2): 269-275.
- Forrest D, Hanebuth E, Smeyne RJ, Everds N, Stewart CL, Wehner JM, Curran T. 1996. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *The EMBO journal* 15(12): 3006-3015.
- Forsburg SL, Guarente L. 1989. Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of cell biology* 5: 153-180.
- Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedinger M, Malaval L et al. 1997. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *The EMBO journal* 16(14): 4412-4420.
- Frairia R, Fortunati N, Fissore F, Fazzari A, Zeppegno P, Varvello L, Orsello M, Berta L. 1992. The membrane receptor for sex steroid binding protein is not ubiquitous. *Journal of endocrinological investigation* 15(8): 617-619.
- Francavilla S, Cordeschi G, Properzi G, Di Cicco L, Jannini EA, Palmero S, Fugassa E, Loras B, D'Armiento M. 1991. Effect of thyroid hormone on the pre- and post-natal development of the rat testis. *The Journal of endocrinology* 129(1): 35-42.
- Garesse R, Vallejo CG. 2001. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263(1-2): 1-16.
- Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J. 1999. Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *The EMBO journal* 18(3): 623-631.
- Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, Willott JF, Sundin V, Roux JP, Malaval L et al. 2001. Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Molecular and cellular biology* 21(14): 4748-4760.

- Gilleron J, Nebout M, Scarabelli L, Senegas-Balas F, Palmero S, Segretain D, Pointis G. 2006. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *Journal of cellular physiology* 209(1): 153-161.
- Gillot I, Jehl-Pietri C, Gounon P, Luquet S, Rassoulzadegan M, Grimaldi P, Vidal F. 2005. Germ cells and fatty acids induce translocation of CD36 scavenger receptor to the plasma membrane of Sertoli cells. *Journal of cell science* 118(Pt 14): 3027-3035.
- Glass CK. 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15(3): 391-407.
- Gondos B, Berndtson W. 1993. *The Sertoli cell: Postnatal and pubertal development*. Clearwater.
- Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. 1997. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *The Journal of biological chemistry* 272(39): 24129-24132.
- Gonzalez-Sancho JM, Garcia V, Bonilla F, Munoz A. 2003. Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer letters* 192(2): 121-132.
- Grandemange S, Seyer P, Carazo A, Becuwe P, Pessemesse L, Busson M, Marsac C, Roger P, Casas F, Cabello G et al. 2005. Stimulation of mitochondrial activity by p43 overexpression induces human dermal fibroblast transformation. *Cancer research* 65(10): 4282-4291.
- Griswold M, Mably E, Fritz IB. 1975. Stimulation by follicle stimulating hormone and dibutyryl cyclic AMP of incorporation of 3H-thymidine into nuclear DNA of cultured Sertoli cell-enriched preparations from immature rats. *Current topics in molecular endocrinology* 2: 413-420.
- Griswold MD. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* 9(4): 411-416.
- Griswold MD, Solari A, Tung PS, Fritz IB. 1977. Stimulation by follicle-stimulating hormone of DNA synthesis and of mitosis in cultured Sertoli cells prepared from testes of immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 7(2): 151-165.
- Grootegeod JA, Oonk RB, Jansen R, van der Molen HJ. 1986. Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. *J Reprod Fertil* 77(1): 109-118.
- Gross NJ. 1971. Control of mitochondrial turnover under the influence of thyroid hormone. *The Journal of cell biology* 48(1): 29-40.
- Guerra C, Roncero C, Porras A, Fernandez M, Benito M. 1996. Triiodothyronine induces the transcription of the uncoupling protein gene and stabilizes its mRNA in fetal rat brown adipocyte primary cultures. *The Journal of biological chemistry* 271(4): 2076-2081.
- Guissouma H, Becker N, Seugnet I, Demeneix BA. 2000. Transcriptional repression of TRH promoter function by T3: analysis by in vivo gene transfer. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 78(3): 155-163.
- Guissouma H, Dupre SM, Demeneix BA. 2005. [Transcriptional repression of the TRH gene]. *Medecine sciences : M/S* 21(10): 854-859.
- Gullberg H, Rudling M, Salto C, Forrest D, Angelin B, Vennstrom B. 2002. Requirement for thyroid hormone receptor beta in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice. *Mol Endocrinol* 16(8): 1767-1777.
- Hadj-Sahraoui N, Seugnet J, Ghorbel MT, Demeneix B. 2000. Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neurosci Lett* 18;280(2):79-82
- Hagenas L, Ritzen EM, Plooen L, Hansson V, French FS, Nayfeh SN. 1975. Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP). *Mol Cell Endocrinol* 2(5): 339-350.

- Hakovirta H, Yan W, Kaleva M, Zhang F, Vanttinen K, Morris PL, Soder M, Parvinen M, Toppari J. 1999. Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 140(3): 1492-1498.
- Hammar M, Petersson F. 1986. Testosterone production in vitro in human testicular tissue. *Andrologia* 18(2): 196-200.
- Hamouli-Said Z, Tahari F, Hamoudi F, Hadj-Bekkouche F. 2007. Comparative study of the effects of pre and post natal administration of a thyroid drug on testicular activity in adult rat. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 45 Suppl 1: S51-57.
- Hardy MP, Kirby JD, Hess RA, Cooke PS. 1993. Leydig cells increase their numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism. *Endocrinology* 132(6): 2417-2420.
- Hardy MP, Sharma RS, Arambepola NK, Sottas CM, Russell LD, Bunick D, Hess RA, Cooke PS. 1996. Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *Journal of andrology* 17(3): 231-238.
- Harper ME, Ballantyne JS, Leach M, Brand MD. 1993. Effects of thyroid hormones on oxidative phosphorylation. *Biochemical Society transactions* 21 ( Pt 3)(3): 785-792.
- Harper ME, Seifert EL. 2008. Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 18(2): 145-156.
- Hayashi M, Shima H, Hayashi K, Trelstad RL, Donahoe PK. 1984. Immunocytochemical localization of Mullerian inhibiting substance in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in Sertoli cells of the neonatal calf testis using a monoclonal antibody. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 32(6): 649-654.
- Hayes FJ, Seminara SB, Decruz S, Boepple PA, Crowley WF, Jr. 2000. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85(9): 3027-3035.
- Hedger MK. 2011. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *Journal of andrology* 32:625-640.
- Hedger MK, O'Bryan MK. 2008. Inflammatory networks in the control of spermatogenesis: chronic inflammation in an immunologically privileged tissue? *Advances in experimental medicine and biology* 636:92-114.
- Hellani A, Ji J, Mauduit C, Deschildre C, Tabone E, Benahmed M. 2000. Developmental and hormonal regulation of the expression of oligodendrocyte-specific protein/claudin 11 in mouse testis. *Endocrinology* 141(8): 3012-3019.
- Hess RA. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 1: 52.
- Hess RA, Cooke PS, Bunick D, Kirby JD. 1993. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology* 132(6): 2607-2613.
- Hess RA, Cooke PS, Hofmann MC, Murphy KM. 2006. Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle* 5(11): 1164-1170.
- Hinshelwood MM, Mendelson CR. 2001. Tissue-specific expression of the human CYP19 (aromatase) gene in ovary and adipose tissue of transgenic mice. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 79(1-5): 193-201.
- Hirobe S, He WW, Lee MM, Donahoe PK. 1992. Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology* 131(2): 854-862.

- Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, Noma K, Ueki K, Nguyen NH, Scanlan TS et al. 2006. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(38): 14104-14109.
- Hochereau-de Reviers MT, Perreau C, Pisselet C, Fontaine I, Monet-Kuntz C. 1990. Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de France and Romanov rams. *Domestic animal endocrinology* 7(1): 63-73.
- Holdcraft RW, Braun RE. 2004. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 131(2): 459-467.
- Holdcraft RW, Braun RE. 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. *International journal of andrology* 27(6): 335-342.
- Holsberger DR, Buchold GM, Leal MC, Kiesewetter SE, O'Brien DA, Hess RA, Franca LR, Kiyokawa H, Cooke PS. 2005. Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biology of reproduction* 72(6): 1429-1436.
- Holsberger DR, Cooke PS. 2005. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and tissue research* 322(1): 133-140.
- Holsberger DR, Jirawatnotai S, Kiyokawa H, Cooke PS. 2003. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology* 144(9): 3732-3738.
- Holsberger DR, Kiesewetter SE, Cooke PS. 2005. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. *Biology of reproduction* 73(3): 396-403.
- Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK et al. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377(6548): 397-404.
- Hou JW, Collins DC, Schleicher RL. 1990. Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in murine Leydig cells. *Endocrinology* 127(5): 2047-2055.
- Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Wilson VS, Ryan BC, Gray LE, Jr. 2008. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 102(2): 371-382.
- Hsueh AJ, Dahl KD, Vaughan J, Tucker E, Rivier J, Bardin CW, Vale W. 1987. Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(14): 5082-5086.
- Hu J, Shima H, Nakagawa H. 1999. Glial cell line-derived neurotropic factor stimulates sertoli cell proliferation in the early postnatal period of rat testis development. *Endocrinology* 140(8): 3416-3421.
- Huhtaniemi I. 2003. Gonadotrophin actions on the testis--genotypes and phenotypes of gonadotrophin and gonadotrophin receptor mutations. *Endocrine development* 5: 81-103.
- Huhtaniemi I. 2003. Mutations affecting gonadotropin secretion and action. *Hormone research* 60 Suppl 3: 21-30.
- Huhtaniemi I, Bartke A. 2001. Perspective: male reproduction. *Endocrinology* 142(6): 2178-2183.
- Huleihel M, Lunenfeld E. 2002. Involvement of intratesticular IL-1 system in the regulation of Sertoli cell functions. *Mol Cell Endocrinol* 187(1-2): 125-132.

- Incerpi S, Luly P, De Vito P, Farias RN. 1999. Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6 myoblasts: high molecular specificity for 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 140(2): 683-689.
- Iwamuro S, Yamada M, Kato M, Kikuyama S. 2006. Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in *Xenopus* tail culture. *Life sciences* 79(23): 2165-2171.
- Izquierdo JM, Cuezva JM. 1993. Thyroid hormones promote transcriptional activation of the nuclear gene coding for mitochondrial beta-F1-ATPase in rat liver. *FEBS letters* 323(1-2): 109-112.
- Jaillard C, Chatelain PG, Saez JM. 1987. In vitro regulation of pig Sertoli cell growth and function: effects of fibroblast growth factor and somatomedin-C. *Biology of reproduction* 37(3): 665-674.
- Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR. 2002. Requirement of *Bmpr1a* for Mullerian duct regression during male sexual development. *Nature genetics* 32(3): 408-410.
- Jannini EA, Crescenzi A, Rucci N, Screponi E, Carosa E, de Matteis A, Macchia E, d'Amati G, D'Armiento M. 2000. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85(9): 3453-3457.
- Jannini EA, Dolci S, Ulisse S, Nikodem VM. 1994. Developmental regulation of the thyroid hormone receptor alpha 1 mRNA expression in the rat testis. *Mol Endocrinol* 8(1): 89-96.
- Jannini EA, Ulisse S, D'Armiento M. 1995. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocr Rev* 16(4): 443-459.
- Jansen HT, Kirby JD, Cooke PS, Arambepola N, Iwamoto GA. 2007. Impact of neonatal hypothyroidism on reproduction in the male hamster, *Mesocricetus auratus*. *Physiology & behavior* 90(5): 771-781.
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y, Bunick D. 1998. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *Journal of andrology* 19(1): 65-71.
- Jean-Faucher C, El Watik N, Berger M, de Turckheim M, Veyssiere G, Jean C. 1983. Ontogeny of the secretory pattern of LH and FSH in male mice during sexual maturation. *International journal of andrology* 6(6):575-84
- Jegou B, Pineau C. 1995. Current aspects of autocrine and paracrine regulation of spermatogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* 377: 67-86.
- Jenab S, Morris PL. 2000. Interleukin-6 regulation of kappa opioid receptor gene expression in primary sertoli cells. *Endocrine* 13(1): 11-15.
- Jenkins NC, Liu T, Cassidy P, Leachman SA, Boucher KM, Goodson AG, Samadashwily G, Grossman D. 2011. The p16(INK4A) tumor suppressor regulates cellular oxidative stress. *Oncogene* 30(3): 265-274.
- Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP, Zhao L, De Rooij DG, Themmen AP, Behringer RR, Parker KL. 2004. Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol* 18(7): 1610-1619.
- Johansson C, Vennstrom B, Thoren P. 1998. Evidence that decreased heart rate in thyroid hormone receptor-alpha1-deficient mice is an intrinsic defect. *The American journal of physiology* 275(2 Pt 2): R640-646.
- Johnson MH, Everitt B. 2002. *Reproduction*. De Boek Université.
- Jones ME, Simpson ER. 2000. Oestrogens in male reproduction. *Bailliere's best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 14(3): 505-516.

- Joseph DR, Hall SH, French FS. 1987. Rat androgen-binding protein: evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(2): 339-343.
- Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F. 1998. The role of anti-Mullerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 145(1-2): 3-7.
- Joste V, Goitom Z, Nelson BD. 1989. Thyroid hormone regulation of nuclear-encoded mitochondrial inner membrane polypeptides of the liver. *European journal of biochemistry / FEBS* 184(1): 255-260.
- Joyce KL, Porcelli J, Cooke PS. 1993. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *Journal of andrology* 14(6): 448-455.
- Jutte NH, Grootegoed JA, Rommerts FF, van der Molen HJ. 1981. Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil* 62(2): 399-405.
- Khan SA, Ndjountche L, Pratchard L, Spicer LJ, Davis JS. 2002. Follicle-stimulating hormone amplifies insulin-like growth factor I-mediated activation of AKT/protein kinase B signaling in immature rat Sertoli cells. *Endocrinology* 143(6): 2259-2267.
- Kim B. 2008. Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 18(2): 141-144.
- Kirby JD, Jetton AE, Cooke PS, Hess RA, Bunick D, Ackland JF, Turek FW, Schwartz NB. 1992. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. *Endocrinology* 131(2): 559-565.
- Kirby JD, Mankar MV, Hardesty D, Kreider DL. 1996. Effects of transient prepubertal 6-N-propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in the domestic fowl. *Biology of reproduction* 55(4): 910-916.
- Kissinger C, Skinner MK, Griswold MD. 1982. Analysis of Sertoli cell-secreted proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Biology of reproduction* 27(1): 233-240.
- Koenig RJ, Lazar MA, Hodin RA, Brent GA, Larsen PR, Chin WW, Moore DD. 1989. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* 337(6208): 659-661.
- Koller KJ, Wolff RS, Warden MK, Zoeller RT. 1987. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(20): 7329-7333.
- Koopman P. 2001. The genetics and biology of vertebrate sex determination. *Cell* 105(7): 843-847.
- Koopman P. 2005. Sex determination: a tale of two Sox genes. *Trends in genetics : TIG* 21(7): 367-370.
- Krishnamurthy H, Danilovich N, Morales CR, Sairam MR. 2000. Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biology of reproduction* 62(5): 1146-1159.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3): 863-870.
- Kumar R, Thompson EB. 1999. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64(5): 310-319.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature genetics* 15(2): 201-204.

- Kuroda T, Lee MM, Haqq CM, Powell DM, Manganaro TF, Donahoe PK. 1990. Mullerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle-stimulating hormone in the rat testes. *Endocrinology* 127(4): 1825-1832.
- Lambard S, Carreau S. 2005. Aromatase and oestrogens in human male germ cells. *International journal of andrology* 28(5): 254-259.
- Lambard S, Silandre D, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bourguiba S, Carreau S. 2005. Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 95(1-5): 63-69.
- Lanni A, De Felice M, Lombardi A, Moreno M, Fleury C, Ricquier D, Goglia F. 1997. Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS letters* 418(1-2): 171-174.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A, de Lange P, Silvestri E, Ragni M, Farina P, Baccari GC, Fallahi P, Antonelli A et al. 2005. 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19(11): 1552-1554.
- Lanzino M, Catalano S, Genissel C, Ando S, Carreau S, Hamra K, McPhaul MJ. 2001. Aromatase messenger RNA is derived from the proximal promoter of the aromatase gene in Leydig, Sertoli, and germ cells of the rat testis. *Biology of reproduction* 64(5): 1439-1443.
- Larkin S, Mull E, Miao W, Pittner R, Albrandt K, Moore C, Young A, Denaro M, Beaumont K. 1997. Regulation of the third member of the uncoupling protein family, UCP3, by cold and thyroid hormone. *Biochemical and biophysical research communications* 240(1): 222-227.
- Laurberg P. 1984. Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metabolism: clinical and experimental* 33(4): 379-392.
- Lawrence WD, Schoenl M, Davis PJ. 1989. Stimulation in vitro of rabbit erythrocyte cytosol phospholipid-dependent protein kinase activity. A novel action of thyroid hormone. *The Journal of biological chemistry* 264(9): 4766-4768.
- Lazar MA, Hodin RA, Chin WW. 1989. Human carboxyl-terminal variant of alpha-type c-erbA inhibits trans-activation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(20): 7771-7774.
- Leblond CP, Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 55(4): 548-573.
- Leclère J, Orgiazzi J, Rousset B, Schlienger J. 2001. *La thyroïde, des concepts à la pratique clinique*. Elsevier-Masson.
- Lecureuil C, Fontaine I, Crepieux P, Guillou F. 2002. Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* 33(3): 114-118.
- Lecureuil C, Staub C, Fouchecourt S, Maurel MC, Fontaine I, Martinat N, Gauthier C, Daudignon A, Delaleu B, Sow A et al. 2007. Transferrin overexpression alters testicular function in aged mice. *Molecular reproduction and development* 74(2): 197-206.
- Lee MM, Donahoe PK. 1993. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev* 14(2): 152-164.
- Leeson CR. 1963. Observations on the fine structure of rat interstitial tissue. *Acta anatomica* 52: 34-48.
- Lei J, Bhargava M, Ingbar DH. 2009. Cell-specific signal transduction pathways regulating Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. Focus on "short-term effects of thyroid hormones on the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-

- ATPase activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on signal transduction". *American journal of physiology Cell physiology* 296(1): C1-3.
- Lei J, Mariash CN, Bhargava M, Wattenberg EV, Ingbar DH. 2008. T3 increases Na-K-ATPase activity via a MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 294(4): L749-754.
- Lei J, Mariash CN, Ingbar DH. 2004. 3,3',5-Triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial cells is Src kinase and phosphoinositide 3-kinase-dependent. *The Journal of biological chemistry* 279(46): 47589-47600.
- Lei J, Nowbar S, Mariash CN, Ingbar DH. 2003. Thyroid hormone stimulates Na-K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 285(3): L762-772.
- Lemke G, Rothlin CV. 2008. Immunobiology of the TAM receptors. *Nature Review Immunology* 8:327-336.
- Levallet J, Bilinska B, Mitre H, Genissel C, Fresnel J, Carreau S. 1998. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biology of reproduction* 58(4): 919-926.
- Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ. 2009. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *American journal of physiology Cell physiology* 296(5): C980-991.
- Lin HY, Tang HY, Shih A, Keating T, Cao G, Davis PJ, Davis FB. 2007. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids* 72(2): 180-187.
- Lin T, Calkins JK, Morris PL, Vale W, Bardin CW. 1989. Regulation of Leydig cell function in primary culture by inhibin and activin. *Endocrinology* 125(4): 2134-2140.
- Liu J, Hao DD, Zhu YC. 2011. [Inhibitory effect of hydrogen sulfide on cardiac fibroblast proliferation]. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 63(4): 353-358.
- Liu Z, Butow RA. 1999. A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Molecular and cellular biology* 19(10): 6720-6728.
- Loewenstein WR, Rose B. 1992. The cell-cell channel in the control of growth. *Seminars in cell biology* 3(1): 59-79.
- Longin J, Guillaumot P, Chauvin MA, Morera AM, Le Magueresse-Battistoni B. 2001. MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation. *Journal of cell science* 114(Pt 11): 2125-2134.
- Loveland KL, Schlatt S. 1997. Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *The Journal of endocrinology* 153(3): 337-344.
- Lu L, Schulz H, Wolf DA. 2002. The F-box protein SKP2 mediates androgen control of p27 stability in LNCaP human prostate cancer cells. *BMC cell biology* 3: 22.
- Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, Lai C, Skinner MK, Klein R, Matsushima GK, Earp HS, Goff SP, Lemke G. 1999. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* 22;398(6729):723-8.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(23): 11162-11166.

- Luciakova K, Nelson BD. 1992. Transcript levels for nuclear-encoded mammalian mitochondrial respiratory-chain components are regulated by thyroid hormone in an uncoordinated fashion. *European journal of biochemistry / FEBS* 207(1): 247-251.
- Lynch MA, Andrews JF, Moore RE. 1985. Low doses of T3 induce a rapid metabolic response in young lambs. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 17(2): 63-66.
- MacCalman CD, Getsios S, Farookhi R, Blaschuk OW. 1997. Estrogens potentiate the stimulatory effects of follicle-stimulating hormone on N-cadherin messenger ribonucleic acid levels in cultured mouse Sertoli cells. *Endocrinology* 138(1): 41-48.
- Mackay S, Smith RA. 2007. Effects of growth factors on testicular morphogenesis. *International review of cytology* 260: 113-173.
- Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. 1996. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology* 59(1): 1-13.
- Mahendroo MS, Russell DW. 1999. Male and female isoenzymes of steroid 5 $\alpha$ -reductase. *Reviews of reproduction* 4(3): 179-183.
- Majdic G, Snoj T, Horvat A, Mrkun J, Kosec M, Cestnik V. 1998. Higher thyroid hormone levels in neonatal life result in reduced testis volume in postpubertal bulls. *International journal of andrology* 21(6): 352-357.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P et al. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83(6): 835-839.
- Manna PR, Tena-Sempere M, Huhtaniemi IT. 1999. Molecular mechanisms of thyroid hormone-stimulated steroidogenesis in mouse leydig tumor cells. Involvement of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. *The Journal of biological chemistry* 274(9): 5909-5918.
- Maran RR, Arunakaran J, Aruldas MM. 2000. T3 directly stimulates basal and modulates LH induced testosterone and oestradiol production by rat Leydig cells in vitro. *Endocrine journal* 47(4): 417-428.
- Maran RR, Arunakaran J, Aruldas MM. 2001. Prolactin and Leydig cells: biphasic effects of prolactin on LH-, T3- and GH-induced testosterone/oestradiol secretion by Leydig cells in pubertal rats. *International journal of andrology* 24(1): 48-55.
- Maran RR, Ravichandran K, Arunakaran J, Aruldas MM. 2001. Impact of neonatal hypothyroidism on Leydig cell number, plasma, and testicular interstitial fluid sex steroids concentration. *Endocrine research* 27(1-2): 119-141.
- Marchlewska K, Kula K, Walczak-Jedrzejowska R, Oszukowska E, Filipiak E, Slowikowska-Hilczner J. 2011. Role of FSH and triiodothyronine in Sertoli cell development expressed by formation of connexin 43-based gap junctions. *Journal of experimental zoology Part A, Ecological genetics and physiology* 315:329-336.
- Matta SL, Vilela DA, Godinho HP, Franca LR. 2002. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology* 143(3): 970-978.
- Mauduit C. 1999. Molécules de signalisation et communications cellulaires dans la gonade mâle. Masson, Paris.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20(3): 321-344.
- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de K, Pratis K, Robertson DM. 2002. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *Journal of andrology* 23(2): 149-162.

- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent progress in hormone research* 57: 149-179.
- McLean DJ, Friel PJ, Pouchnik D, Griswold MD. 2002. Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in follicle-stimulating hormone-treated rat Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 16(12): 2780-2792.
- Meachem SJ, McLachlan RI, de Kretser DM, Robertson DM, Wreford NG. 1996. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biology of reproduction* 54(1): 36-44.
- Meinhardt A, Hedger MP. 2011. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Molecular and cellular endocrinology* 335(1):60-68
- Mendis-Handagama C, Ariyaratne S. 2004. Prolonged and transient neonatal hypothyroidism on Leydig cell differentiation in the postnatal rat testis. *Archives of andrology* 50(5): 347-357.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. 2004. Effects of thyroid hormones on Leydig cells in the postnatal testis. *Histology and histopathology* 19(3): 985-997.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. 2008. Effects of hypothyroidism on anti-mullerian hormone expression in the prepubertal rat testis. *Histology and histopathology* 23(2): 151-156.
- Mendis-Handagama SM, Siril Ariyaratne HB. 2005. Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian journal of experimental biology* 43(11): 939-962.
- Menegaz D, Zamoner A, Royer C, Leite LD, Bortolotto ZA, Silva FR. 2006. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 246(1-2): 128-134.
- Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M et al. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287(5457): 1489-1493.
- Mita M, Price JM, Hall PF. 1982. Stimulation by follicle-stimulating hormone of synthesis of lactate by Sertoli cells from rat testis. *Endocrinology* 110(5): 1535-1541.
- Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S. 2006. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nuclear receptor signaling* 4: e020.
- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K. 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87(11): 5185-5190.
- Moroi S, Saitou M, Fujimoto K, Sakakibara A, Furuse M, Yoshida O, Tsukita S. 1998. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *The American journal of physiology* 274(6 Pt 1): C1708-1717.
- Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregon MJ, Escobar del Rey F. 1985. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 117(5): 1890-1900.
- Morris MD, Chaikoff IL. 1959. The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland, and testis of the rat: dietary versus endogenous contributions. *The Journal of biological chemistry* 234(5): 1095-1097.
- Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennstrom B, Bernal J. 2002. Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(6): 3985-3989.

- Mruk DD, Cheng CY. 2004. Cell-cell interactions at the ectoplasmic specialization in the testis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 15(9): 439-447.
- Mruk DD, Cheng CY. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 25(5): 747-806.
- Mullaney BP, Rosselli M, Skinner MK. 1994. Developmental regulation of Sertoli cell lactate production by hormones and the testicular paracrine factor, PModS. *Mol Cell Endocrinol* 104(1): 67-73.
- Mullaney BP, Skinner MK. 1992. Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. *Endocrinology* 131(6): 2928-2934.
- Mullaney BP, Skinner MK. 1992. Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule. *Mol Endocrinol* 6(12): 2103-2113.
- Murphy HD. 1965. Sertoli Cell Stimulation Following Intratesticular Injections of Fsh in the Hypophysectomized Rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 118: 1202-1205.
- Mutvei A, Husman B, Andersson G, Nelson BD. 1989. Thyroid hormone and not growth hormone is the principle regulator of mammalian mitochondrial biogenesis. *Acta endocrinologica* 121(2): 223-228.
- Mutvei A, Kuzela S, Nelson BD. 1989. Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *European journal of biochemistry / FEBS* 180(1): 235-240.
- Mutvei A, Nelson BD. 1989. The response of individual polypeptides of the mammalian respiratory chain to thyroid hormone. *Archives of biochemistry and biophysics* 268(1): 215-220.
- Nagy F. 1974. An autoradiographic study of the post-natal changes in (3H)leucine incorporation by Sertoli cell nuclei in rat testes. *J Reprod Fertil* 37(2): 353-359.
- Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM. 1997. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89(3): 373-380.
- Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. 2005. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Molecular reproduction and development* 71(2): 166-177.
- Nakanishi Y, Shiratsuchi A. 2003. [Physiological role and mechanism of phagocytic clearance of apoptotic cells]. *Seikagaku The Journal of Japanese Biochemical Society* 75(11): 1429-1437.
- Nehar D, Mauduit C, Boussouar F, Benahmed M. 1998. Interleukin 1alpha stimulates lactate dehydrogenase A expression and lactate production in cultured porcine sertoli cells. *Biology of reproduction* 59(6): 1425-1432.
- Ng L, Hurley JB, Dierks B, Srinivas M, Salto C, Vennstrom B, Reh TA, Forrest D. 2001. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nature genetics* 27(1): 94-98.
- Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K, Bahr JM. 1993. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 132(3): 1396-1401.
- Normington K, Russell DW. 1992. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *The Journal of biological chemistry* 267(27): 19548-19554.

- Norton JN, Skinner MK. 1992. Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: potential role of immediate-early genes. *Mol Endocrinol* 6(12): 2018-2026.
- Norton JN, Vigne JL, Skinner MK. 1994. Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: analysis of common signal transduction pathways. *Endocrinology* 134(1): 149-157.
- Nygard M, Wahlstrom GM, Gustafsson MV, Tokumoto YM, Bondesson M. 2003. Hormone-dependent repression of the E2F-1 gene by thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 17(1): 79-92.
- Oakberg EF. 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 99(3): 507-516.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22(3): 289-318.
- O'Donnell L, Stanton PG, Bartles JR, Robertson DM. 2000. Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. *Biology of reproduction* 63(1): 99-108.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270(5240): 1354-1357.
- Orth JM. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *The Anatomical record* 203(4): 485-492.
- Orth JM. 1984. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 115(4): 1248-1255.
- Orth JM, Boehm R. 1990. Endorphin suppresses FSH-stimulated proliferation of isolated neonatal Sertoli cells by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *The Anatomical record* 226(3): 320-327.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122(3): 787-794.
- Orth JM, Jester WF, Li LH, Laslett AL. 2000. Gonocyte-Sertoli cell interactions during development of the neonatal rodent testis. *Current topics in developmental biology* 50: 103-124.
- O'Shaughnessy PJ, Murphy L. 1991. Steroidogenic enzyme activity in the rat testis following Leydig cell destruction by ethylene-1,2-dimethanesulphonate and during subsequent Leydig cell regeneration. *The Journal of endocrinology* 131(3): 451-457.
- O'Shea PJ, Williams GR. 2002. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *The Journal of endocrinology* 175(3): 553-570.
- Palacios-Romero R, Mowbray J. 1979. Evidence for the rapid direct control both in vivo and in vitro of the efficiency of oxidative phosphorylation by 3,5,3'-tri-iodo-L-thyronine in rats. *The Biochemical journal* 184(3): 527-538.
- Palmero S, Bardi G, Bolla F, Fugassa E. 1996. Influence of thyroid hormone on Sertoli cell protein metabolism in the prepubertal pig. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale* 72(5-6): 163-170.
- Palmero S, de Marchis M, Gallo G, Fugassa E. 1989. Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. *The Journal of endocrinology* 123(1): 105-111.
- Palmero S, De Marco P, Fugassa E. 1995. Thyroid hormone receptor beta mRNA expression in Sertoli cells isolated from prepubertal testis. *Journal of molecular endocrinology* 14(1): 131-134.

- Palmero S, Prati M, Barreca A, Minuto F, Giordano G, Fugassa E. 1990. Thyroid hormone stimulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) by immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 68(1): 61-65.
- Palmero S, Prati M, Bolla F, Fugassa E. 1995. Tri-iodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. *The Journal of endocrinology* 145(2): 355-362.
- Palmero S, Trucchi P, Prati M, Fugassa E, Lanni A, Goglia F. 1994. Effect of thyroid status on the oxidative capacity of Sertoli cells isolated from immature rat testis. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 130(3): 308-312.
- Parikh VS, Morgan MM, Scott R, Clements LS, Butow RA. 1987. The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* 235(4788): 576-580.
- Payne AH, Kelch RP, Musich SS, Halpern ME. 1976. Intratesticular site of aromatization in the human. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 42(6): 1081-1087.
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F. 2000. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *The Journal of endocrinology* 165(2): 359-370.
- Pelletier RM. 1995. The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *Journal of andrology* 16(5): 400-409.
- Petersen C, Boitani C, Froyso B, Soder O. 2002. Interleukin-1 is a potent growth factor for immature rat sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 186(1): 37-47.
- Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Cossu C, Simbula G, Menegazzi M, Shinozuka H, Columbano A. 2001. Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3). *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(6): 1006-1013.
- Pillar TM, Seitz HJ. 1997. Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 136(3): 231-239.
- Plant TM, Marshall GR. 2001. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev* 22(6): 764-786.
- Plateroti M, Angelin-Duclos C, Flamant F, Samarut J. 2004. Tissues specific action of thyroid hormones, insights from knock out animal models in: *Syndromes of hormone resistance on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis*. Kluwer Academic Publishers.
- Plateroti M, Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Freund JN, Samarut J, Keding M. 1999. Involvement of T3Ralpha- and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* 116(6): 1367-1378.
- Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O. 2001. Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Molecular and cellular biology* 21(14): 4761-4772.
- Porto CS, Abreu LC, Gunsalus GL, Bardin CW. 1992. Binding of sex-hormone-binding globulin (SHBG) to testicular membranes and solubilized receptors. *Mol Cell Endocrinol* 89(1-2): 33-38.
- Poyton RO, McEwen JE. 1996. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annual review of biochemistry* 65: 563-607.
- Quignodon L, Grijota-Martinez C, Compe E, Guyot R, Allioli N, Laperriere D, Walker R, Meltzer P, Mader S, Samarut J et al. 2007. A combined approach identifies a limited

- number of new thyroid hormone target genes in post-natal mouse cerebellum. *Journal of molecular endocrinology* 39(1): 17-28.
- Quignodon L, Vincent S, Winter H, Samarut J, Flamant F. 2007. A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor alpha1 expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. *Mol Endocrinol* 21(10): 2350-2360.
- Rabelo R, Reyes C, Schifman A, Silva JE. 1996. Interactions among receptors, thyroid hormone response elements, and ligands in the regulation of the rat uncoupling protein gene expression by thyroid hormone. *Endocrinology* 137(8): 3478-3487.
- Rao JN, Liang JY, Chakraborti P, Feng P. 2003. Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes in vivo. *Journal of endocrinological investigation* 26(5): 435-443.
- Rider CV, Furr J, Wilson VS, Gray LE, Jr. 2008. A mixture of seven antiandrogens induces reproductive malformations in rats. *International journal of andrology* 31(2): 249-262.
- Risbridger GP, Robertson DM, de Kretser DM. 1990. Current perspectives of inhibin biology. *Acta endocrinologica* 122(6): 673-682.
- Risley MS, Tan IP, Roy C, Saez JC. 1992. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *Journal of cell science* 103 ( Pt 1): 81-96.
- Rivier C, Vale W, Rivier J. 1987. Studies of the inhibin family of hormones: a review. *Hormone research* 28(2-4): 104-118.
- Robinson R, Fritz IB. 1981. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biology of reproduction* 24(5): 1032-1041.
- Rochard P, Cassar-Malek I, Marchal S, Wrutniak C, Cabello G. 1996. Changes in mitochondrial activity during avian myoblast differentiation: influence of triiodothyronine or v-erb A expression. *Journal of cellular physiology* 168(2): 239-247.
- Rochard P, Rodier A, Casas F, Cassar-Malek I, Marchal-Victorion S, Dauray L, Wrutniak C, Cabello G. 2000. Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors. *The Journal of biological chemistry* 275(4): 2733-2744.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO journal* 16(9): 2262-2270.
- Rommerts FF, de Jong FH, Brinkmann AO, van der Molen HJ. 1982. Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J Reprod Fertil* 65(2): 281-288.
- Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R. 2000. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *Journal of endocrinological investigation* 23(9): 609-615.
- Russell DW, Griswold MD. 1993. *The Sertoli cell*. Cache River Press.
- Russell L. 1977. Observations on rat Sertoli ectoplasmic ('junctional') specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue & cell* 9(3): 475-498.
- Russell LD, Bartke A, Goh JC. 1989. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat* 184(3): 179-189.
- Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP. 1990. 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* 188(1): 21-30.
- Sadate-Ngatchou PI, Pouchnik DJ, Griswold MD. 2004. Follicle-stimulating hormone induced changes in gene expression of murine testis. *Mol Endocrinol* 18(11): 2805-2816.

- Salanova M, Ricci G, Boitani C, Stefanini M, De Grossi S, Palombi F. 1998. Junctional contacts between Sertoli cells in normal and aspermatogenic rat seminiferous epithelium contain  $\alpha 6 \beta 1$  integrins, and their formation is controlled by follicle-stimulating hormone. *Biology of reproduction* 58(2): 371-378.
- Salanova M, Stefanini M, De Curtis I, Palombi F. 1995. Integrin receptor  $\alpha 6 \beta 1$  is localized at specific sites of cell-to-cell contact in rat seminiferous epithelium. *Biology of reproduction* 52(1): 79-87.
- Sanborn BM, Elkington JS, Steinberger A, Steinberger E. 1975. Androgen binding in the testis: in vitro production of androgen binding protein (ABP) by Sertoli cell cultures and measurement of nuclear bound androgen by a nuclear exchange assay. *Current topics in molecular endocrinology* 2: 293-309.
- Sang QX, Dym M, Byers SW. 1990. Secreted metalloproteinases in testicular cell culture. *Biology of reproduction* 43(6): 946-955.
- Sapsford CS. 1963. The development of the Sertoli cell of the rat and mouse: its existence as a mononucleate unit. *J Anat* 97: 225-238.
- Satoh T, Monden T, Ishizuka T, Mitsuhashi T, Yamada M, Mori M. 1999. DNA binding and interaction with the nuclear receptor corepressor of thyroid hormone receptor are required for ligand-independent stimulation of the mouse preprothyrotropin-releasing hormone gene. *Mol Cell Endocrinol* 154(1-2): 137-149.
- Scott HM, Hutchison GR, Jobling MS, McKinnell C, Drake AJ, Sharpe RM. 2008. Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology* 149(10): 5280-5287.
- Scott HM, Mason JI, Sharpe RM. 2009. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev* 30(7): 883-925.
- Segal J. 1990. Calcium is the first messenger for the action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane: first evidence for an acute effect of thyroid hormone on calcium uptake in the heart. *Endocrinology* 126(5): 2693-2702.
- Setchell B. 2008. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis: Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis*. Springer.
- Seyer P, Grandemange S, Busson M, Carazo A, Gamaleri F, Pessemesse L, Casas F, Cabello G, Wrutniak-Cabello C. 2006. Mitochondrial activity regulates myoblast differentiation by control of c-Myc expression. *Journal of cellular physiology* 207(1): 75-86.
- Seyer P, Grandemange S, Rochard P, Busson M, Pessemesse L, Casas F, Cabello G, Wrutniak-Cabello C. 2011. P43-dependent mitochondrial activity regulates myoblast differentiation and slow myosin isoform expression by control of Calcineurin expression. *Experimental cell research* 317(14): 2059-2071.
- Sharpe R. 1994. *Regulation of spermatogenesis*. Raven Press Ltd., New York.
- Sharpe RM. 2006. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 20(1): 91-110.
- Sharpe RM. 2008. "Additional" effects of phthalate mixtures on fetal testosterone production. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 105(1): 1-4.
- Sharpe RM. 2010. Bisphenol A exposure and sexual dysfunction in men: editorial commentary on the article 'Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction' Li et al., 2009. *Hum Reprod* 25(2): 292-294.
- Sharpe RM. 2010. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 365(1546): 1697-1712.

- Sharpe RM, Fraser HM, Brougham MF, McKinnell C, Morris KD, Kelnar CJ, Wallace WH, Walker M. 2003. Role of the neonatal period of pituitary-testicular activity in germ cell proliferation and differentiation in the primate testis. *Hum Reprod* 18(10): 2110-2117.
- Sharpe RM, Kerr JB, McKinnell C, Millar M. 1994. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *J Reprod Fertil* 101(1): 193-198.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125(6): 769-784.
- Shiratsuchi A, Umeda M, Ohba Y, Nakanishi Y. 1997. Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells of the rat. *The Journal of biological chemistry* 272(4): 2354-2358.
- Shupnik MA, Chin WW, Ross DS, Downing MF, Habener JF, Ridgway EC. 1983. Regulation by thyroxine of the mRNA encoding the alpha subunit of mouse thyrotropin. *The Journal of biological chemistry* 258(24): 15120-15124.
- Simpson ER. 2000. Role of aromatase in sex steroid action. *Journal of molecular endocrinology* 25(2): 149-156.
- Singh J, Handelsman DJ. 1996. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *The Journal of endocrinology* 151(1): 37-48.
- Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. 1995. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 136(12): 5311-5321.
- Skinner MK, Griswold MD. 1980. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. *The Journal of biological chemistry* 255(20): 9523-9525.
- Skinner MK, Griswold MD. 1983. Sertoli cells synthesize and secrete a ceruloplasmin-like protein. *Biology of reproduction* 28(5): 1225-1229.
- Skinner MK, McLachlan RI, Bremner WJ. 1989. Stimulation of Sertoli cell inhibin secretion by the testicular paracrine factor PModS. *Mol Cell Endocrinol* 66(2): 239-249.
- Skinner MK, Moses HL. 1989. Transforming growth factor beta gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Mol Endocrinol* 3(4): 625-634.
- Slaunwhite WR, Jr., Samuels LT. 1956. Progesterone as a precursor of testicular androgens. *The Journal of biological chemistry* 220(1): 341-352.
- Sluka P, O'Donnell L, Bartles JR, Stanton PG. 2006. FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo. *The Journal of endocrinology* 189(2): 381-395.
- Smith EP, Hall SH, Monaco L, French FS, Wilson EM, Conti M. 1989. Regulation of c-fos messenger ribonucleic acid by fibroblast growth factor in cultured Sertoli cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 564: 132-139.
- Sridharan S, Brehm R, Bergmann M, Cooke PS. 2007. Role of connexin 43 in Sertoli cells of testis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1120: 131-143.
- Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, Guillou F, Cooke PS. 2007. Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biology of reproduction* 76(5): 804-812.
- St Germain DL, Galton VA. 1997. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 7(4): 655-668.
- Steinberger A, Steinberger E. 1971. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biology of reproduction* 4(1): 84-87.

- Sterling K, Brenner MA, Sakurada T. 1980. Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver in vivo. *Science* 210(4467): 340-342.
- Sterling K, Milch PO, Brenner MA, Lazarus JH. 1977. Thyroid hormone action: the mitochondrial pathway. *Science* 197(4307): 996-999.
- Storz P. 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 10: 1881-1896.
- Swain A, Lovell-Badge R. 1999. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes & development* 13(7): 755-767.
- Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. 2002. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mechanisms of development* 113(1): 29-39.
- Tagami T, Nakamura H, Sasaki S, Miyoshi Y, Imura H. 1993. Estimation of the protein content of thyroid hormone receptor alpha 1 and beta 1 in rat tissues by western blotting. *Endocrinology* 132(1): 275-279.
- Tan IP, Roy C, Saez JC, Saez CG, Paul DL, Risley MS. 1996. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biology of reproduction* 54(6): 1300-1310.
- Tan KA, Turner KJ, Saunders PT, Verhoeven G, De Gendt K, Atanassova N, Sharpe RM. 2005. Androgen regulation of stage-dependent cyclin D2 expression in Sertoli cells suggests a role in modulating androgen action on spermatogenesis. *Biology of reproduction* 72(5): 1151-1160.
- Tanwar PS, Kaneko-Tarui T, Zhang L, Rani P, Taketo MM, Teixeira J. 2010. Constitutive WNT/beta-catenin signaling in murine Sertoli cells disrupts their differentiation and ability to support spermatogenesis. *Biology of reproduction* 82(2): 422-432.
- Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT. 1997. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nature genetics* 15(2): 205-206.
- Themmen APN, Huhtaniemi IT. 2000. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 21(5): 551-583.
- Thomas WE, Mowbray J. 1987. Evidence for ADP-ribosylation in the mechanism of rapid thyroid hormone control of mitochondria. *FEBS letters* 223(2): 279-283.
- Tinnikov A, Nordstrom K, Thoren P, Kindblom JM, Malin S, Rozell B, Adams M, Rajanayagam O, Pettersson S, Ohlsson C et al. 2002. Retardation of post-natal development caused by a negatively acting thyroid hormone receptor alpha1. *The EMBO journal* 21(19): 5079-5087.
- Toda K, Okada T, Hayashi Y, Saibara T. 2008. Preserved tissue structure of efferent ductules in aromatase-deficient mice. *The Journal of endocrinology* 199(1): 137-146.
- Tokumoto YM, Apperly JA, Gao FB, Raff MC. 2002. Posttranscriptional regulation of p18 and p27 Cdk inhibitor proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Developmental biology* 245(1): 224-234.
- Tsai-Morris CH, Aquilano DR, Dufau ML. 1985. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology* 116(1): 38-46.
- Ulisse S, Jannini EA, Carosa E, Piersanti D, Graziano FM, D'Armiento M. 1994. Inhibition of aromatase activity in rat Sertoli cells by thyroid hormone. *The Journal of endocrinology* 140(3): 431-436.
- Ulisse S, Jannini EA, Pepe M, De Matteis S, D'Armiento M. 1992. Thyroid hormone stimulates glucose transport and GLUT1 mRNA in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 87(1-3): 131-137.

- Ulisse S, Rucci N, Piersanti D, Carosa E, Graziano FM, Pavan A, Ceddia P, Arizzi M, Muzi P, Cironi L et al. 1998. Regulation by thyroid hormone of the expression of basement membrane components in rat prepubertal Sertoli cells. *Endocrinology* 139(2): 741-747.
- Vagenakis AG. 1988. Pituitary-thyroid interaction: effects of thyroid hormone, non thyroidal illness and various agents on TSH secretion. *Acta medica Austriaca* 15 Suppl 1: 52-56.
- Valenti S, Guido R, Fazzuoli L, Barreca A, Giusti M, Giordano G. 1997. Decreased steroidogenesis and cAMP production in vitro by leydig cells isolated from rats made hypothyroid during adulthood. *International journal of andrology* 20(5): 279-286.
- van der Molen HJ, Brinkmann AO, de Jong FH, Rommerts FF. 1981. Testicular oestrogens. *The Journal of endocrinology* 89 Suppl: 33P-46P.
- Van Haaster LH, De Jong FH, Docter R, De Rooij DG. 1992. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology* 131(3): 1574-1576.
- Van Haaster LH, De Jong FH, Docter R, De Rooij DG. 1993. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology* 133(2): 755-760.
- Vega-Nunez E, Menendez-Hurtado A, Garesse R, Santos A, Perez-Castillo A. 1995. Thyroid hormone-regulated brain mitochondrial genes revealed by differential cDNA cloning. *The Journal of clinical investigation* 96(2): 893-899.
- Vergouwen RP, Huiskamp R, Bas RJ, Roepers-Gajadien HL, Davids JA, de Rooij DG. 1993. Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J Reprod Fertil* 99(2): 479-485.
- Verhoeven G, Swinnen K, Cailleau J, Deboel L, Rombauts L, Heyns W. 1992. The role of cell-cell interactions in androgen action. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 41(3-8): 487-494.
- Viglietto G, Dolci S, Bruni P, Baldassarre G, Chiariotti L, Melillo RM, Salvatore G, Chiappetta G, Sferratore F, Fusco A et al. 2000. Glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin can act as paracrine growth factors stimulating DNA synthesis of Ret-expressing spermatogonia. *International journal of oncology* 16(4): 689-694.
- Vincent S, Segretain D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Sage J, Cuzin F, Rassoulzadegan M. 1998. Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis. *Development* 125(22): 4585-4593.
- Vitale R, Fawcett DW, Dym M. 1973. The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *The Anatomical record* 176(3): 331-344.
- Wagner MS, Morimoto R, Dora JM, Benneman A, Pavan R, Maia AL. 2003. Hypothyroidism induces type 2 iodothyronine deiodinase expression in mouse heart and testis. *Journal of molecular endocrinology* 31(3): 541-550.
- Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ. 1995. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378(6558): 690-697.
- Wajner SM, dos Santos Wagner M, Melo RC, Parreira GG, Chiarini-Garcia H, Bianco AC, Fekete C, Sanchez E, Lechan RM, Maia AL. 2007. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in germ cells of adult rat testis. *The Journal of endocrinology* 194(1): 47-54.
- Walczak-Jedrzejowska R, Slowikowska-Hilczer J, Marchlewska K, Kula K. 2008. Maturation, proliferation and apoptosis of seminal tubule cells at puberty after

- administration of estradiol, follicle stimulating hormone or both. *Asian journal of andrology* 10(4): 585-592.
- Walker WH, Cheng J. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130(1): 15-28.
- Wang RA, Nakane PK, Koji T. 1998. Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biology of reproduction* 58(5): 1250-1256.
- Wang RS, Yeh S, Chen LM, Lin HY, Zhang C, Ni J, Wu CC, di Sant'Agnese PA, deMesy-Bentley KL, Tzeng CR et al. 2006. Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 147(12): 5624-5633.
- Wang ZX, Wreford NG, De Kretser DM. 1989. Determination of Sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods. *International journal of andrology* 12(1): 58-64.
- Weber JE, Russell LD, Wong V, Peterson RN. 1983. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli--Sertoli and Sertoli--germ-cell relationships. *Am J Anat* 167(2): 163-179.
- Welt C, Sidis Y, Keutmann H, Schneyer A. 2002. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med (Maywood)* 227(9): 724-752.
- Whaley PD, Chaudhary J, Cupp A, Skinner MK. 1995. Role of specific response elements of the c-fos promoter and involvement of intermediate transcription factor(s) in the induction of Sertoli cell differentiation (transferrin promoter activation) by the testicular paracrine factor PModS. *Endocrinology* 136(7): 3046-3053.
- Wiesner RJ. 1992. Regulation of mitochondrial gene expression: transcription versus replication. *Trends in genetics : TIG* 8(8): 264-265.
- Wiesner RJ, Kurowski TT, Zak R. 1992. Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 6(9): 1458-1467.
- Wikstrom L, Johansson C, Salto C, Barlow C, Campos Barros A, Baas F, Forrest D, Thoren P, Vennstrom B. 1998. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *The EMBO journal* 17(2): 455-461.
- Williams GR. 2000. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Molecular and cellular biology* 20(22): 8329-8342.
- Wreford NG, Rajendra Kumar T, Matzuk MM, de Kretser DM. 2001. Analysis of the testicular phenotype of the follicle-stimulating hormone beta-subunit knockout and the activin type II receptor knockout mice by stereological analysis. *Endocrinology* 142(7): 2916-2920.
- Wrutniak C, Cassar-Malek I, Marchal S, Rasclé A, Heusser S, Keller JM, Flechon J, Dauca M, Samarut J, Ghysdael J et al. 1995. A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *The Journal of biological chemistry* 270(27): 16347-16354.
- Wrutniak C, Rochard P, Casas F, Fraysse A, Charrier J, Cabello G. 1998. Physiological importance of the T3 mitochondrial pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* 839: 93-100.
- Wu EH, Li HS, Zhao T, Fan JD, Ma X, Xiong L, Li WJ, Zhu LL, Fan M. 2007. [Effect of hypoxia on the gene profile of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells]. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 59(2): 227-232.
- Wu X, Arumugam R, Zhang N, Lee MM. Androgen profiles during prepubertal Leydig cell development in mice. *Reproduction* 140(1):113-21

- Xia W, Wong CH, Lee NP, Lee WM, Cheng CY. 2005. Disruption of Sertoli-germ cell adhesion function in the seminiferous epithelium of the rat testis can be limited to adherens junctions without affecting the blood-testis barrier integrity: an in vivo study using an androgen suppression model. *Journal of cellular physiology* 205(1): 141-157.
- Yamamoto A, Taki T, Yagi H, Habu T, Yoshida K, Yoshimura Y, Yamamoto K, Matsushiro A, Nishimune Y, Morita T. 1996. Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells. *Molecular & general genetics : MGG* 251(1): 1-12.
- Yan HH, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2008. Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22(6): 1945-1959.
- Yan W, Kero J, Huhtaniemi I, Toppari J. 2000. Stem cell factor functions as a survival factor for mature Leydig cells and a growth factor for precursor Leydig cells after ethylene dimethane sulfonate treatment: implication of a role of the stem cell factor/c-Kit system in Leydig cell development. *Developmental biology* 227(1): 169-182.
- Yefimova MG, Sow A, Fontaine I, Guillemot V, Martinat N, Crepieux P, Canepa S, Maurel MC, Fouchecourt S, Reiter E et al. 2008. Dimeric transferrin inhibits phagocytosis of residual bodies by testicular rat Sertoli cells. *Biology of reproduction* 78(4): 697-704.
- Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwajri S, Zhou X et al. 2002. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21): 13498-13503.
- Yen PM. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews* 81(3): 1097-1142.
- Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X. 2006. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol* 246(1-2): 121-127.
- Ying SY. 1988. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 9(2): 267-293.
- Zhang FP, Pakarainen T, Poutanen M, Toppari J, Huhtaniemi I. 2003. The low gonadotropin-independent constitutive production of testicular testosterone is sufficient to maintain spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(23): 13692-13697.
- Zhou X. 2010. Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from global and cell-specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. *Journal of andrology* 31(3): 235-243.
- Zhou X, Li D, Resnick MB, Behar J, Wands J, Cao W. 2011. Signaling in H2O2-Induced Increase in Cell Proliferation in Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 339(1): 218-227.
- Zhou ZX, Lane MV, Kempainen JA, French FS, Wilson EM. 1995. Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* 9(2): 208-218.
- Zoeller RT. 2005. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Mol Cell Endocrinol* 242(1-2): 10-15.
- Zoeller RT, Bansal R, Parris C. 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146(2): 607-612.

# Annexes

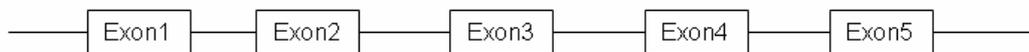
## Annexe 1 : Création de la lignée de souris aromatase-Cre et spécificité de l'excision induite

- Lignée Aromatase-Cre:

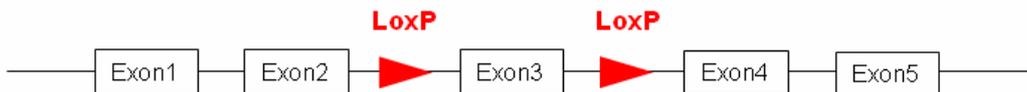


- Lignée floxée:

- o Allèle sauvage du gène IGF-R de type 1 (370 pb)



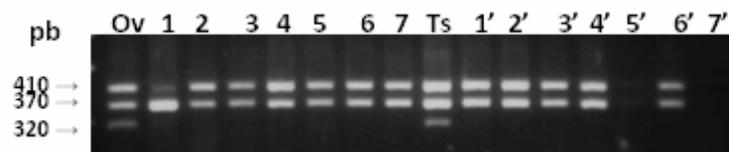
- o Allèle floxé du gène IGF-R de type 1 (410 pb)



- o Allèle excisé du gène IGF-R de type 1 (320 pb)



- Spécificité de l'excision induite par le transgène aromatase-Cre dans la lignée IGF1-R/Aromatase-Cre (première génération d'individus hétérozygotes Cre/lox)



La PCR est spécifique de la région floxée et amplifie l'allèle sauvage (370pb), l'allèle floxé (420pb) et l'allèle excisé (320pb) comme expliqué ci-dessus.

Ov: ovaire; Ts: testicule;

1 et 1':cœur

2 et 2': muscle

3 et 3':poumon

4 et 4': rate

5 et 5': cerveau

6 et 6': foie

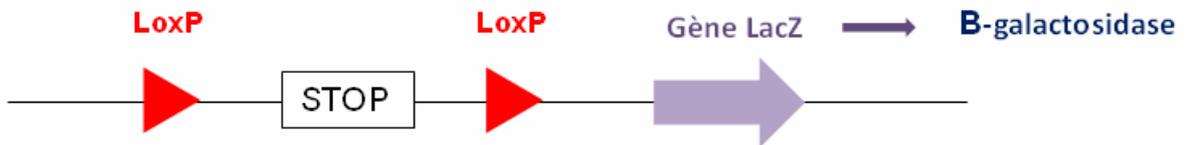
7 et 7': pancrès

Organes issus d'une femelle et d'un mâle (')

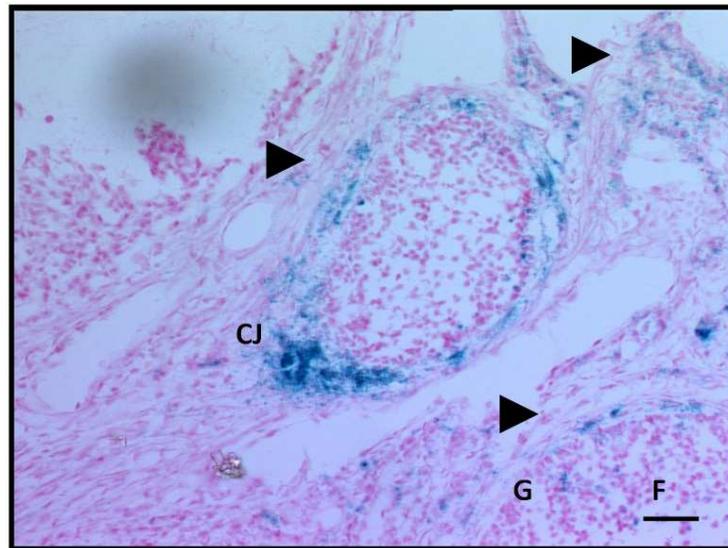
L'allèle floxé n'est excisé que dans les gonades

## Annexe 2 : Expression de l'aromatase-Cre dans l'ovaire

- A: Lignée Rosa26



- B: Expression de la recombinase Cre dans l'ovaire sous le promoteur de l'aromatase



A: Schéma représentatif de la modification génétique du locus Rosa 26

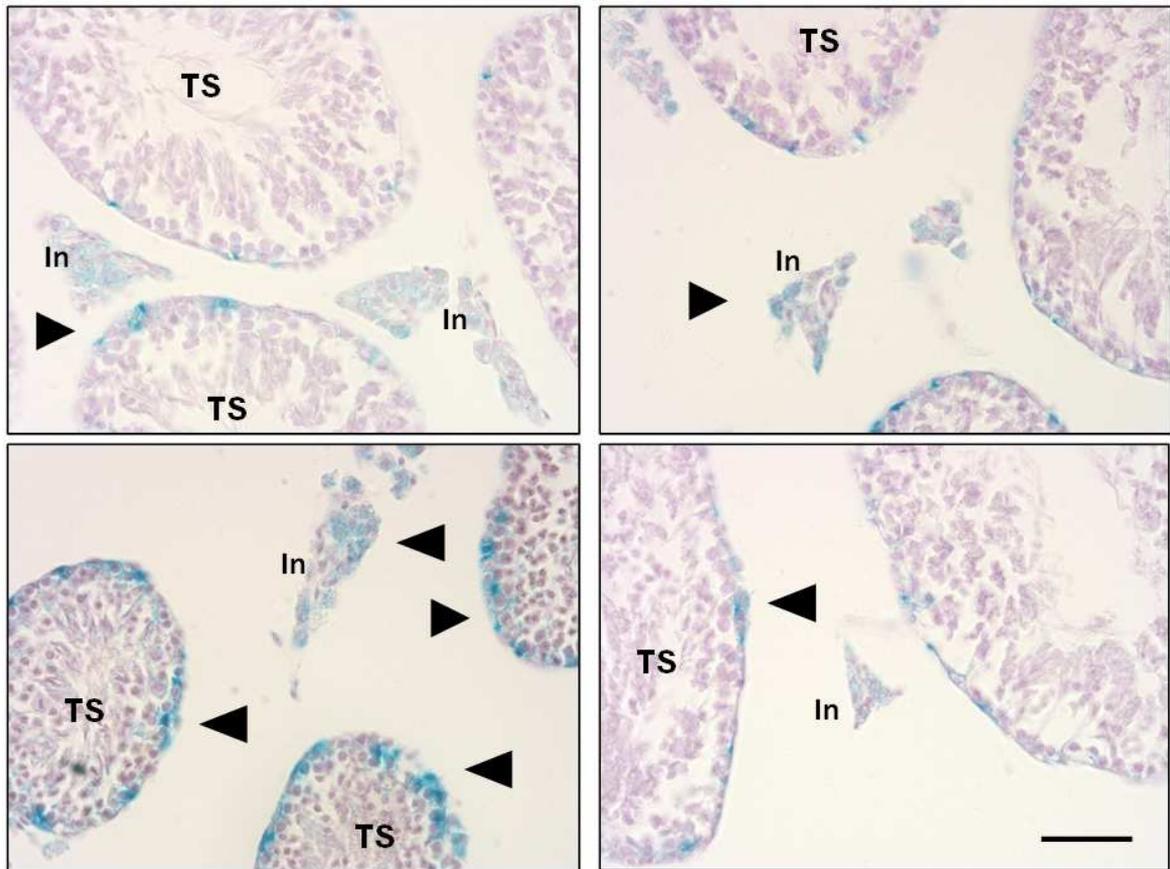
B: Présence recombinase Cre fonctionnelle dans l'ovaire:

La  $\beta$ -galactosidase est détectée dans la granulosa (G) des follicules (F) et dans les corps jaunes (CJ). On observe une excision en mosaïque, dans tout le tissu.

Barre d'échelle: 50 $\mu$ m

## Annexe 3: Expression de l'aromatase-Cre dans le testicule

- Croisements Aromatase-Cre x Rosa26 excision dans le testicule adulte de souris



La présence d'une recombinaison Cre fonctionnelle est détectée dans les cellules somatiques du testicule:

L'expression de la  $\beta$ -galactosidase dans le testicule de souris Rosa26/Aromatase-Cre est visible dans les cellules de Sertoli présentes en périphérie des tubes séminifères (TS) et dans les cellules de Leydig présentes dans l'interstitium (In). Aucune activité de la  $\beta$ -galactosidase n'est détectée dans les cellules germinales.

Barre d'échelle: 50 $\mu$ m

## Annexe 4: Article de synthèse sur les fonctions de la transferrine dans le testicule (revue parue dans Andrologie)

Au cours de ma thèse j'ai étudié le rôle de la transferrine dans la fonction testiculaire. Le résumé de ces travaux, est présenté ci-dessous.

Résumé:

Les cellules de Sertoli (CS), présentes dans les tubes séminifères, créent l'environnement approprié pour la différenciation des cellules germinales. Elle secrète un nombre important de protéines qui conditionnent directement la spermatogenèse. La transferrine est l'une des protéines les plus fortement exprimées et secrétées. Cependant, sa fonction reste encore en partie inconnue (Fumel et al., 2009). Pour essayer de répondre à cette question, le laboratoire a invalidé l'expression de la transferrine dans des cellules de Sertoli en culture via ARN interférence. Des ARN interférents spécifiques de la transferrine de rat ont été utilisés et leur efficacité a été testée *in vitro* sur des cellules de Sertoli isolées à partir de testicules de rats âgés de 19 jours. Il a été mis en évidence que 80 % de la transferrine secrétée par les Sertoli est inhibée. La suppression de la transferrine ne conduit pas à la mort des cellules de Sertoli et ne perturbe pas la production de lactate (substrat énergétique des cellules germinales). Par contre, son inhibition entraîne une augmentation de la phagocytose des corps résiduels (gouttelette cytoplasmique qui se détache des spermatozoïdes au moment de la spermiation) par les cellules de Sertoli. Le laboratoire a montré l'existence à l'état naturel d'un dimère de la transferrine, localisé dans les cellules de Sertoli, qui est un puissant inhibiteur de la phagocytose des corps résiduels. Son expression est induite par la présence de corps résiduels (Yefimova et al., 2008). Afin de confirmer le rôle de la transferrine *in vivo*, nous avons décidé d'inhiber conditionnellement la transferrine. Pour cela nous avons décidé de faire exprimer ces ARN interférents (shRNA) spécifiquement dans les cellules de Sertoli.

Trois lignées de souris transgéniques porteuses de la construction ont été établies. La construction contient un promoteur U6 indispensable pour l'expression du shRNA placé en amont d'une cassette bordée par deux sites LoxP. Cette cassette contient un gène rapporteur, l'eGFP (enhance Green Fluorescence Protein) placé sous le promoteur CMV. En absence de la recombinaison Cre, le promoteur U6 est inactif, le shRNA n'est pas transcrit et l'eGFP est

exprimée. En présence de l'AMH-Cre, la cassette contenant le gène eGFP est excisée, le promoteur U6 devient fonctionnel et le shRNA est exprimé spécifiquement dans les cellules de Sertoli.

Nous avons ensuite généré une série de croisements avec des souris ZP3-Cre afin de produire un modèle de souris où le shRNA de la transferrine est exprimé dans tous les tissus. Nous avons observé que le niveau de transferrine dans le foie est inhibé à 50% chez les animaux hétérozygotes démontrant que cette approche est fonctionnelle.

Nous avons ensuite fait exprimer spécifiquement le shRNA dans les cellules de Sertoli en utilisant les souris AMH-Cre (Lecureuil et al., 2002). Nos résultats montrent que les mâles des trois lignées sont fertiles. Cependant, nous avons observé, dans deux lignées que l'inhibition de la transferrine provoque, chez la majorité des mâles, une diminution drastique du poids testiculaire due à une réduction drastique du nombre de tubes séminifères. La réduction du nombre de tubes séminifères est observée dès la période fœtale suggérant un rôle très précoce, de la transferrine dans la mise en place des cordons testiculaires durant le développement embryonnaire.

Ces travaux démontrent que la transferrine est impliquée dans le développement des cordons testiculaires et plus tardivement, dans le contrôle de la spermiogénèse dans le testicule adulte.

Ces travaux m'ont permis d'être lauréate du concours organisé par la SALF (Société d'Andrologie de Langue Française), d'être invitée au congrès SALF à Hammamet (Tunisie) en Octobre 2008 et d'y présenter mes résultats ainsi que de publier un l'article de synthèse sur les fonctions de la transferrine dans le testicule dans la revue *Andrologie* (article en annexe).

**Une nouvelle fonction pour la transferrine exprimée par le testicule**

**A new function for transferrin expressed in testes**

**Betty Fumel, Amina Sow, Sophie Fouchécourt, Florian Guillou**

**Andrologie (2009) 19:81-89**

# Une nouvelle fonction pour la transferrine exprimée par le testicule

## A new function for transferrin expressed in testes

B. Fumel\* · A. Sow · S. Fouchécourt · F. Guillou

Reçu le 26 janvier 2009 ; accepté le 21 mars 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Résumé** Chez l'homme, les oligospermies sévères sont associées à un faible taux de transferrine dans le liquide séminal. La transferrine apparaît comme un bon indicateur pour définir les dysfonctionnements testiculaires. Son niveau d'expression dans le testicule doit être parfaitement contrôlé. Elle y joue un rôle dans le transport du fer. Mais de récents résultats montrent l'existence d'une forme dimérique de la transferrine sertolienne comme puissant régulateur de la phagocytose des corps résiduels par les cellules de Sertoli.

**Mots clés** Transferrine · Testicule · Cellules de Sertoli · Phagocytose · Corps résiduel

**Abstract** In men, oligozoospermia corresponds with a low level of transferrin in semen. Transferrin appears to be a relevant indicator of gonadal function. Transferrin expression in normal testes is perfectly controlled. Transferrin contributes to iron transport. However, recent results show the existence of a dimeric form, which acts as a powerful regulator of phagocytosis of residual bodies by Sertoli cells. A disturbance of this new highlighted function may account for some forms of oligozoospermia.

**Keywords** Transferrin · Testis · Sertoli cells · Phagocytosis · Residual bodies

B. Fumel (✉)

INRA, UMR85 Physiologie de la reproduction  
et des comportements, F-37380 Nouzilly, France  
e-mail : betty.fumel@tours.inra.fr

A. Sow

CNRS, UMR6175, F-37380 Nouzilly, France

S. Fouchécourt

Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

F. Guillou

Haras nationaux, F-37380 Nouzilly, France

\* Betty Fumel a obtenu le Prix Master SALF 2008.

**Abréviations:** ACTH, *adreno corticotropic hormone* ; hormone corticotrope ; AMPc, *cyclic adenosine monophosphate* ; adénosine monophosphate cyclique ; API, *activating protein 1* ; protéine d'activation 1 ; Axl, *receptor tyrosine-kinase, which regulates the phagocytic function; same tyrosine-kinase subfamily as Mer and Tyro-3-Sky* ; récepteur tyrosine-kinase régulant la phagocytose, même famille que Tyro3 et Mer ; CD36, *cluster of differentiation 36* ; cluster de différenciation 36 ; COUP-TF, *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor* ; facteurs de transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet ; CREB, *cAMP response element-binding* ; élément de réponse à l'AMPc ; DMT1, *divalent metal transporter 1* ; transporteur membranaire du fer ; EGF, *epidermal growth factor* ; facteur de croissance des cellules de l'épiderme ; FGF, *fibroblast growth factor* ; facteur de croissance des fibroblastes ; FSH, *follicle-stimulating hormone* ; hormone folliculostimulante ; Gas6, *growth arrest-specific gene 6* ; gène 6 spécifique de l'arrêt de croissance ; GH, *growth hormone* ; hormone de croissance ; IGF, *insulin-like growth factor* ; facteur de croissance à l'insuline ; IGF-BP, *insulin-like growth factor-binding protein* ; protéine de liaison des IGF ; IL, *interleukines* ; LH, *luteinizing hormone* ; hormone lutéinisante ; Mer, *receptor tyrosine-kinase (Mertk, Nyk, c-Eyk), which regulate the phagocytic function; same tyrosine-kinase subfamily as Axl3 and Tyro-3-Sky* ; récepteur tyrosine-kinase (Mertk, Nyk, c-Eyk) régulant la phagocytose, même famille que Tyro3 et Axl. Nramp2 : *natural resistance associated macrophage protein 2* ; protéine associée aux macrophages de type 2 ; PModS, *peritubular factor that modulates sertoli cell function* ; facteurs pérutubulaires modulant les fonctions sertoliennes ; PR, *proximale region* ; région proximale ; P450scc, *P450 cholesterol side-chain cleavage* ; protéine de clivage de la chaîne latérale du cholestérol ; SE1, *specific element 1* ; élément spécifique 1 ; SHBG, *sex hormone-binding globulin* ; protéine de liaison aux stéroïdes ; SIE, *cis-inductible element* ; élément cis-inductible ; SRB1, *class B I scavenger receptor* ; récepteur scavenger de classe B ; SRE, *serum response element* ; élément de réponse au sérum ; StAR, *steroidogenic acute regulatory protein* ; protéine de

régulation de la stéroïdogénèse ; TGF, *transforming growth factor* ; facteur de différenciation ; TNF $\alpha$ , *tumor necrosis factor alpha* ; facteur de nécrose tumoral alpha ; TSH, *thyroid stimulating hormone* ; thyroïdostimuline ; Tyro3-Sky, *receptor tyrosine-kinase, which regulates the phagocytic function, same tyrosine-kinase subfamily as Axl3 and Mer* ; récepteur tyrosine-kinase régulant la phagocytose, même famille que Mer et Axl.

### Transferrine : marqueur du bon fonctionnement du testicule

Le testicule, siège de la spermatogénèse, est constitué de deux compartiments : l'interstitium et les tubes séminifères. L'interstitium est constitué d'un tissu lâche riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques où sont répartis des amas de cellules de Leydig et des cellules libres tels que les macrophages, les lymphocytes et les fibroblastes. Les cellules de Leydig sont le site majeur de la stéroïdogénèse avec production d'androgènes essentiellement sous la forme de testostérone. Les tubes séminifères se composent de cellules germinales à différents stades de différenciation, enchâssées entre les cellules de Sertoli qui s'appuient sur la membrane basale. Du fait de leur situation topologique, les cellules de Sertoli sont les seules cellules communiquant directement avec les cellules germinales. Elles assurent ainsi plusieurs fonctions à l'intérieur des tubes séminifères : elles fournissent un support architectural aux cellules germinales, créent la barrière hémato-testiculaire, assurent la nutrition des cellules germinales, sécrètent des facteurs de croissance et des protéines de transport, contrôlent la spermatogénèse et assurent la phagocytose des cellules germinales apoptotiques et des corps résiduels. En l'absence du support architectural et métabolique des cellules de Sertoli, la différenciation des cellules germinales, leur méiose et leur maturation en spermatozoïdes ne peuvent pas avoir lieu. La transferrine peut être considérée comme un marqueur du bon fonctionnement des cellules de Sertoli. Ce sont ces dernières qui synthétisent la transferrine dans les tubes séminifères du testicule, cette synthèse correspondant à 5 % des protéines totales sécrétées par la cellule [1].

Chez l'homme, des oligospermies sévères sont associées à un faible taux de transferrine dans le liquide séminal [2,3]. Les auteurs émettent l'hypothèse que le faible taux de transferrine dans le liquide séminal révèle un dysfonctionnement des cellules de Sertoli, qui pourrait affecter la qualité et/ou le nombre de spermatozoïdes produits [2,3]. Cependant, le faible niveau de transferrine pourrait être expliqué par le nombre réduit de cellules de Sertoli présentes dans le testicule des hommes oligospermiques. En effet, il a été mis en évidence une corrélation entre le niveau de transferrine dans le plasma séminal et le nombre de spermatozoïdes

chez l'homme et chez le taureau, ce nombre étant directement corrélé au nombre de cellules de Sertoli [4-7].

Chez l'homme, plusieurs études ont montré que le taux de transferrine était affecté lors de pathologies touchant la fonction testiculaire. Barthelemy et al. ont montré, en 1988, que la nature du dysfonctionnement des tubes séminifères peut être précisément définie en mesurant le taux de transferrine et en l'associant à d'autres valeurs biologiques [4]. Yoshida et al., en 1988, ont montré que chez les patients atteints de varicocèles, la perturbation de la spermatogénèse peut être associée à la diminution de production de transferrine [8]. De plus, il existe une forte corrélation entre la cinétique d'arrêt de la spermatogénèse et la diminution des ARNm de la transferrine [9]. Cela signifie que le niveau d'expression de la transferrine est un indicateur du bon fonctionnement de la cellule de Sertoli.

En 1996, Zalata et al. ont montré que le récepteur soluble de la transferrine du plasma séminal est un bon marqueur de la spermatogénèse, et qu'il peut donner de bonnes indications sur la présence ou l'absence de cellules germinales dans les cas d'azoospermie [10].

Chez les souris hypotransferrinémiques, qui, du fait d'une mutation dans le gène de la transferrine, ne présentent que 1 à 2 % du taux normal de transferrine, il y a une réduction du nombre de cellules germinales suggérant que la transferrine peut jouer un rôle important dans la spermatogénèse [11].

Toutes ces études montrent que la transferrine sécrétée par les cellules de Sertoli pourrait être impliquée dans les grandes fonctions sertoliennes qui contrôlent le bon déroulement de la spermatogénèse. L'objectif de cette revue est de faire le point des connaissances actuelles sur le rôle de la transferrine dans les fonctions testiculaires.

### Transferrine

La transferrine, anciennement appelée sidérophiline, est une glycoprotéine présente dans le fluide biologique des vertébrés et des invertébrés. Elle appartient à une famille de protéines qui comprend la lactoferrine, la mélanotransferrine (antigène p97) et l'ovotransferrine de poulet encore appelée conalbumine.

La transferrine est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 79 kDa, composée d'une seule chaîne polypeptidique de 679 résidus d'acides aminés. Des études cristallographiques de la protéine ont permis de visualiser deux domaines fonctionnels homologues : l'un N-terminal (résidus 1-336) et l'autre C-terminal (337-679) [12]. Il existe environ 50 % d'homologie entre les résidus d'acides aminés qui composent ces deux domaines [13]. Chacun des domaines peut fixer un ion Fe<sup>3+</sup> avec une très forte constante d'affinité comprise entre 1 à 6,10<sup>-22</sup> M<sup>-1</sup> [14]. Outre le fer, la transferrine peut fixer d'autres métaux comme le Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>,

Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> avec une constante d'affinité plus faible, par exemple  $3,10^{-12} \text{ M}^{-1}$  pour le cuivre et  $7,10^{-6} \text{ M}^{-1}$  pour le zinc.

Le foie est le principal site de synthèse de la transferrine. Dès sa synthèse par les hépatocytes, la transferrine est aussitôt sécrétée dans le sang [15]. Chez l'embryon de souris, la présence de l'ARNm de la transferrine est détectée par hybridation in situ dans le tissu endodermique du sac vitellin et dans des clusters de l'aire primordiale du foie à 9,5 jours embryonnaires [16,17]. Chez le rat, la transferrine est synthétisée par le foie à partir du 15<sup>e</sup> jour de gestation [15,18] et le niveau des ARNm de la transferrine double entre le 17<sup>e</sup> jour de gestation et le 1<sup>er</sup> jour après la naissance [19].

La synthèse de transferrine est aussi détectée dans d'autres organes qui présentent des barrières hématisées, comme le système nerveux central (les plexus choroïdes, les oligodendrocytes), les cellules de la rétine [20,17,21], ainsi que dans la glande mammaire [22] et le testicule [23].

La transferrine sécrétée par les cellules de Sertoli du testicule présente une composition identique en acides aminés et le même poids apparent que la transferrine sérique. Cependant, elle a une composition en sucre quantitativement plus importante : en effet, elle contient le double de galactose et 20 % de plus de glucosamine que la transferrine sérique [1].

La transferrine est détectée dès la vie fœtale dans le testicule. En effet, l'analyse de testicules fœtaux de rats a montré la présence des ARNm de la transferrine dès 14,5 jours post-coïtum [24]. Elle est considérée comme un marqueur de différenciation des cellules de Sertoli, car son niveau d'expression augmente avec l'âge, parallèlement à la maturation des cellules de Sertoli. Les cellules de Sertoli isolées de rats prépubères de dix jours sécrètent environ 2 ng de transferrine par µg d'ADN, celles isolées de rats de 20 jours sécrètent environ 20 ng de transferrine par µg d'ADN, et celles isolées de rats âgés de 35 jours sécrètent 60 ng de transferrine par µg d'ADN [25,26]. L'augmentation de la biosynthèse de la transferrine durant le développement testiculaire n'est pas due à une variation du taux et de la demi-vie des ARNm de la transferrine mais dépend de l'augmentation du taux de traduction de ces ARNm [26].

Chez l'adulte, le niveau d'expression des ARNm de la transferrine varie selon les stades du cycle de l'épithélium séminifère. Chez le rat, le niveau d'ARNm de la transferrine est maximal autour des stades XIII-IX, où se déroulent les deux divisions méiotique et minimale autour du stade VIII, pendant le remodelage des jonctions serrées, la spermiation et la phagocytose des corps résiduels par les cellules de Sertoli [27]. La surexpression de la transferrine humaine par transgénèse chez la souris a pour conséquence une surexpression de la transferrine endogène et provoque une altération, à partir de cinq mois, de la fonction testiculaire qui conduit à une réduction de 36 % de la réserve spermatique [28]. Cette observation montre que le niveau

d'expression de la transferrine dans le testicule doit être parfaitement contrôlé.

### Régulation de l'expression de la transferrine dans le testicule

La régulation de la synthèse de transferrine par les cellules de Sertoli a fait l'objet de nombreuses études. Plusieurs facteurs hormonaux, paracrines ou autocrines, peuvent influencer la synthèse de transferrine par les cellules de Sertoli. Ces facteurs ont fait l'objet de quelques études chez l'homme et chez la souris. Néanmoins, les études in vitro sont généralement réalisées sur des rats de 19-20 jours. La majorité des travaux concerne l'effet de la FSH sur l'expression et la régulation de la transcription du gène de la transferrine par cette hormone. La FSH, ajoutée à des cultures de cellules de Sertoli isolées de rats âgés de 20 jours, provoque une augmentation de 1,25 fois du niveau des transcrits de la transferrine et de 2,8 fois de la transferrine sécrétée. Cet effet de la FSH semble maximal à 25 ng/ml, puisqu'une augmentation de la concentration jusqu'à 1 µg/ml n'augmente plus son effet [29]. Les travaux de Suire et al. montrent que l'effet de la FSH passe par une augmentation de l'AMPC intracellulaire [30]. L'administration d'un analogue non hydrolysable de l'AMPC, le dibutyryl-AMPC, à 10 µM, mime l'action de la FSH et entraîne une augmentation respective de 1,5 et de 3 fois des ARNm et de la transferrine. Cet effet stimulateur de la FSH sur la sécrétion de la transferrine a été retrouvé chez la souris, le mouton et l'homme [31-33]. La région promotrice comprise entre [-126 ; +1pb] est suffisante pour assurer un niveau basal de transcription du gène de la transferrine humaine et sa régulation par la FSH dans les cellules de Sertoli. Cette région contient deux sites d'interaction ADN-protéines dénommés PRI et PRII. Les facteurs de transcription qui interagissent avec ces sites ont été caractérisés par gel retard. Le facteur COUP-TF se fixe sur le site PRI, tandis que le facteur CREB se fixe sur le site PRII [34]. La mutation du site PRI fait chuter la transcription basale de 20 % mais amplifie l'action de la FSH en facilitant l'action de la protéine CREB. Le facteur COUP-TF qui interagit avec le site PRI joue un rôle négatif sur la fixation de la protéine CREB. La mutation du site PRII fait chuter la transcription basale de 50 % et abolie l'effet de la FSH [34]. La sécrétion de la transferrine dans les cellules de Sertoli en réponse à une stimulation par la FSH varie selon l'âge des animaux testés. À dix jours, le niveau basal de transferrine, qui est de 2 ng/µg d'ADN, est stimuable d'environ deux fois après 72 heures d'incubation avec l'hormone. À 20 jours, le niveau basal à 20 ng/µg d'ADN est stimuable d'environ 1,7 fois dans les mêmes conditions. En revanche, à 35 jours, le niveau basal très

élevé est de 60 ng/ $\mu$ g d'ADN, et la FSH n'a aucun effet stimulateur sur la sécrétion de la transferrine [25].

In vivo, l'hypophysectomie de rats de 20 jours ou de 40 jours engendre un effondrement de 97 % des ARNm de la transferrine d'origine testiculaire. L'injection de FSH permet un rétablissement partiel des ARNm de la transferrine chez les animaux âgés de 20 jours. En revanche, à 40 jours, l'administration de la FSH n'a aucun effet [35]. Chez des animaux âgés de 60 jours, des expériences complémentaires ont montré que l'injection d'un analogue de la GnRH, qui bloque aussi bien la sécrétion de la FSH que de la LH, entraîne un effondrement du niveau des ARNm de la transferrine [36]. Il est important de signaler que l'hypophysectomie abolit non seulement les sécrétions de FSH et de LH, mais également celles d'autres hormones hypophysaires telles que la GH, la TSH ou l'ACTH.

Chez le rat, une carence en rétinol entraîne une diminution des ARNm de la transferrine d'origine testiculaire, alors que les ARNm de la transferrine d'origine hépatique restent inchangés [9]. Cette diminution des ARNm de la transferrine dans le testicule est d'environ 86 % et s'accompagne d'une diminution de la taille des testicules, ainsi que d'un arrêt de la spermatogenèse. Des injections d'acide rétinoïque ou une supplémentation en vitamine A entraînent une restauration de la spermatogenèse et une augmentation de l'expression des ARNm de la transferrine. Cette restauration du système va également favoriser la synchronisation du cycle de l'épithélium séminifère. In vitro, l'addition de la vitamine A sous forme d'acide rétinoïque ou de rétinol provoque une augmentation des ARNm et la sécrétion de la transferrine par les cellules de Sertoli chez le rat âgé de 20 jours [29,37]. Il a également été rapporté un effet stimulateur du rétinol sur la sécrétion de la transferrine sertolienne chez les ovins et chez l'homme [33,38]. Le rétinol ne modifie pas la stabilité des ARNm de la transferrine [9]. Il pourrait agir en augmentant l'activité transcriptionnelle ou la traduction des ARNm de la transferrine, mais jusqu'à présent, aucune étude précise montrant le mécanisme d'action du rétinol sur l'expression de la transferrine n'a été publiée.

La testostérone seule ne semble pas stimuler la sécrétion de la transferrine ni chez le rat, ni chez l'homme, ni chez les ovins [29,31,33]. Des études ont montré que l'ajout de la testostérone (200 ng/ml) sur des cultures de cellules de Sertoli postpubères humaines n'a pas d'effet sur la sécrétion de la transferrine par ces cellules [38]. Cependant, le niveau de transferrine pourrait réguler la stéroïdogenèse via les IGF-BP. En effet, il a été montré que la transferrine peut former un complexe avec les IGF-BP [39]. La formation de ce complexe a pour conséquence une augmentation accrue de l'affinité de l'IGF1 pour l'IGF-BP. Ce phénomène pourrait être à l'origine, dans le testicule, de la diminution de la réponse de la testostérone à la LH observée chez les

souris transgéniques surexprimant la transferrine dans le testicule [28]. En effet, il est connu chez le rat que l'IGF1 sécrété par les cellules de Sertoli contrôle l'expression des récepteurs à la LH, ainsi que l'activité d'enzymes de la stéroïdogenèse telles que P450<sub>scc</sub>, StAR [40].

Chez les rats hypophysectomisés de 20 jours, il y a un effondrement des ARNm de la transferrine. L'injection quotidienne de testostérone ne restaure pas les taux d'ARNm de la transferrine. En revanche, l'injection quotidienne de testostérone à des rats de 40 jours, après une hypophysectomie, rétablit de moitié le taux des ARNm de la transferrine [35]. Roberts et al. ont montré que l'augmentation des ARNm de la transferrine après injection de testostérone dans le cas de rats adultes hypophysectomisés était corrélée au nombre de cellules germinales plutôt qu'à la réponse à la testostérone [41]. En effet, il a été montré que des cocultures de cellules germinales (spermatocytes pachytènes et spermatides) ainsi que leurs milieux conditionnés stimulent l'expression des ARNm de la transferrine par les cellules de Sertoli de rat [42,43]. De plus, les cellules germinales peuvent agir sur la sécrétion de la transferrine via la sécrétion du facteur de croissance FGF2.

Les cellules péricubulaires, placées en coculture avec les cellules de Sertoli humaines, provoquent, elles aussi, une augmentation de la transferrine sécrétée dans le milieu [38]. Le facteur responsable de cet effet a été isolé et dénommé PModS. Le PModS stimule la sécrétion de la transferrine de quatre fois par les cellules de Sertoli isolées de rats âgés de 10, 20 ou 35 jours [25]. Cette augmentation de la sécrétion de la transferrine en présence de PModS est due à une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène de la transferrine. Le PModS n'influence pas la demi-vie des ARNm de la transferrine [44]. L'inhibition de l'action de PModS par le cycloheximide, inhibiteur de synthèse protéique, suggère que le facteur requière des protéines nouvellement synthétisées pour son action stimulatrice sur la transferrine. L'action du PModS sur la transcription du gène de la transferrine pourrait impliquer le proto-oncogène *c-fos*. En effet, il a été identifié deux sites de réponses (SRE et SIE) à PModS au niveau du promoteur du gène *c-fos*. L'addition de PModS provoque une augmentation rapide (environ une heure) de l'expression de *c-fos* [44]. *C-fos* activerait donc, via son site consensus *API*, un gène intermédiaire, qui reste à caractériser et dont le produit agirait sur deux sites, nommés SE1 et 2, au niveau du promoteur de la transferrine [45]. L'ensemble de ces données est à confirmer in vivo. Cependant, PModS est reconnu comme médiateur indirect de l'action des androgènes sur les cellules de Sertoli, car la réponse aux androgènes est amplifiée en sa présence. L'action des androgènes sur l'expression de la transferrine in vivo pourrait être médiée par les cellules péricubulaires via PModS.

La sécrétion de la transferrine par les cellules de Sertoli peut également être modulée par un grand nombre de facteurs de croissance. Parmi eux, on retrouve des facteurs de croissance qui peuvent se lier à des récepteurs à activité sérine-thréonine-kinase : le TGF $\beta$  et le FGF. L'ajout de TGF $\beta$  ou de TGF (10 ng/ml) dans le milieu de culture provoque une augmentation de la sécrétion de la transferrine par les cellules de Sertoli de rat. Il a également été montré que l'activine stimule la sécrétion de la transferrine par les cellules de Sertoli [46].

Dans des cultures de cellules de Sertoli polarisées en chambre bicamérale, l'addition de l'EGF stimule la sécrétion de la transferrine [47]. Cependant, les travaux de Hoeben et al. montrent qu'il est difficile de discerner l'effet spécifique de l'EGF, du FGF et du TGF $\beta$  sur la transferrine et de leur effet sur l'ensemble des sécrétions protéiques. En effet, en prenant en compte la quantité de protéines produites, l'effet de ces facteurs sur la sécrétion de la transferrine ne semble pas significatif [48].

Les interleukines (IL), IL-1 et 6 stimulent également la production de la transferrine par les cellules de rat et de souris en culture [32,49,50]. De même, le facteur de croissance TNF $\alpha$  stimule la production de la transferrine par les cellules de Sertoli [49,50]. Cependant, leurs modes d'action restent pour l'instant inconnus.

L'ensemble de ces travaux montre que de nombreux facteurs connus pour contrôler les fonctions sertoliennes sont capables d'activer l'expression de la transferrine par les cellules de Sertoli. Toutefois, à ce jour, il n'a pas été identifié de facteur capable de réprimer directement l'expression de la transferrine par les cellules de Sertoli.

## Rôle de la transferrine dans le testicule

La transferrine présente dans le sang est connue depuis de nombreuses années comme une protéine transporteur de fer, il est donc facile d'imaginer que cette protéine sécrétée par le testicule y joue le même rôle du fait de la présence de la barrière hémato-testiculaire. Le fer provenant de la circulation sanguine ne peut arriver directement aux cellules germinales méiotiques ou postméiotiques. De ce fait, la cellule de Sertoli a mis en place un système judicieux permettant de véhiculer le fer de la circulation sanguine vers les cellules germinales situées au-delà de cette barrière hémato-testiculaire. Le mécanisme proposé est le suivant : la transferrine sérique chargée de deux atomes de fer se fixe sur son récepteur situé du côté basal des cellules de Sertoli, le complexe est internalisé par la membrane basolatérale puis amené jusqu'aux endosomes. L'acidification à l'intérieur des endosomes (pH : 5,5), du fait de la présence de pompes à protons, entraîne une dissociation du fer du complexe transferrine-récepteur. L'apotransferrine sérique, liée à son récepteur, est recyclée

vers la surface. Le fer, libéré dans la cellule de Sertoli, est soit stocké par la ferritine qui peut recueillir plus de 4 500 atomes de fer, soit, dans la plupart des cas, pris en charge par la transferrine synthétisée par la cellule de Sertoli et transporté dans l'espace intercellulaire apicolatéral. La transferrine sertolienne, liée au fer, se fixe sur son récepteur situé au niveau des spermatozoïdes et des spermatides [51,52]. Le fer est alors pris en charge par la ferritine se trouvant dans la plupart des cellules germinales, en particulier les spermatozoïdes pachytènes, ou incorporé dans des protéines [53,54].

Il a également été identifié au niveau des endosomes des cellules de Sertoli et au niveau des phagosomes la présence d'un transporteur de fer Nramp2/DMT1, ferroportine. Ce dernier pourrait jouer un rôle dans le recyclage du fer provenant des cellules germinales phagocytées [55]. Il est tout de même important de noter qu'un excès de fer est néfaste pour le testicule, car une augmentation de fer dans cet organe, par des injections intrapéritonéales de FeSO $_4$  à des rats, conduit à une nécrose des cellules germinales et à une réduction du nombre de spermatides après trois jours de traitement [56]. Chez le rat, Idzerda et al. ont montré qu'un déficit en fer, in vivo, entraîne une augmentation de la quantité des ARNm de la transferrine d'origine hépatique, alors que celle d'origine testiculaire reste inchangée, suggérant que l'expression de la transferrine sertolienne n'est pas contrôlée par le niveau en fer [57].

Afin d'évaluer l'importance de la transferrine pour les fonctions des cellules de Sertoli, une approche par inhibition de l'expression de cette protéine via ARN interférence a été réalisée in vitro. Les ARN interférences (iARN ou siARN) sont de petits ARN doubles brins (21nt) capables d'induire la dégradation des transcrits endogènes homologues, mimant ainsi l'effet d'une perte de fonction de l'activité génique. Grâce à cette technologie, une diminution de 80 % de la transferrine sécrétée par des cultures primaires de cellules de Sertoli isolées de testicules de rats âgés de 19 jours a été obtenue. Cette diminution de 80 % de la transferrine ne modifie ni la viabilité des cellules de Sertoli, ni la production de lactate, principal substrat énergétique des cellules germinales. En revanche, l'inhibition de la transferrine entraîne une augmentation de la phagocytose des corps résiduels par les cellules de Sertoli. La phagocytose est un processus physiologique permettant l'élimination de cellules apoptotiques et des débris cellulaires. Elle peut être divisée en quatre grandes phases : une phase de reconnaissance, une phase d'adhésion, une phase d'ingestion, puis une phase de digestion. Dans le testicule, au cours de la différenciation spermatogénique, plus de la moitié des cellules meurent par apoptose avant d'atteindre le stade de spermatozoïde. De plus, lors de la spermiation, les spermatides allongées libèrent leur excès de cytoplasme résiduel (corps résiduels) avant de passer au stade spermatozoïde. Ces cellules germinales apoptotiques et ces corps résiduels sont phagocytés par les

cellules de Sertoli pour assurer le bon déroulement de la spermatogenèse. L'inhibition de l'expression de la transferrine provoque une augmentation accrue de la phase d'ingestion des corps résiduels. L'addition de transferrine inhibe la phase d'ingestion des corps résiduels par les cellules de Sertoli. Mais, de façon surprenante, la transferrine, pour être active, doit être sous une forme dimérique complexée à plusieurs atomes de fer. La forme monomérique de la transferrine n'a aucun effet sur ce processus de phagocytose [58]. De façon inattendue, la transferrine se révèle être un modulateur physiologique de la phagocytose des corps résiduels par les cellules de Sertoli.

Les cellules germinales apoptotiques sont reconnues par les cellules de Sertoli via une exposition de résidus phosphatidylsérine à leur surface [59]. Les cellules de Sertoli expriment des récepteurs qui reconnaissent ces résidus phosphatidylsérine. Il s'agit de récepteurs multiligands scavenger de classe B type I (SRBI) [60,61]. Toutefois, des études ont montré que l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre SRBI bloque en partie seulement la phagocytose des cellules germinales apoptotiques et des corps résiduels par les cellules de Sertoli [60]. En effet, il a été démontré qu'un autre membre de la famille des récepteurs scavenger de classe B, CD36, est également impliqué dans la reconnaissance des cellules phagocytiques par les cellules de Sertoli [62].

Outre les récepteurs CD36 et SRBI impliqués directement dans la reconnaissance des résidus phosphatidylsérine à la surface des cellules apoptotiques, les cellules de Sertoli expriment d'autres types de récepteurs pouvant reconnaître indirectement les signaux apoptotiques via des protéines de pontage. En effet, le récepteur Mer, un récepteur à activité tyrosine-kinase, ainsi que son ligand Gas6 ont été mis en évidence au niveau des cellules de Sertoli [63]. Aucune étude n'a montré, à ce jour, l'implication de Gas6 et de son récepteur Mer dans le processus de phagocytose médiée par les cellules de Sertoli. Toutefois, au niveau des macrophages, Gas6 forme un pont entre les cellules apoptotiques et les cellules phagocytiques [64]. Gas6 est une protéine  $\gamma$ -carboxylée composée d'un domaine Gla N-terminal, d'une répétition de quatre domaines EGF-like et d'un domaine SHBG en C-terminal. Gas6 interagit, d'une part, avec les résidus phosphatidylsérine via son domaine Gla (domaine constitué d'une répétition d'acides  $\gamma$ -carboxyglutamique) et, d'autre part, avec son récepteur Mer via son domaine SHBG [64,65]. Une invalidation du récepteur Mer entraîne une diminution de la phagocytose des thymocytes apoptotiques par les macrophages par inhibition de la phase d'ingestion [66,67]. Un rôle similaire dans la phagocytose par les cellules de Sertoli ne peut être exclu. En effet, l'action de la transferrine dimérique sur la phagocytose n'est pas exclusive aux cellules de Sertoli. Les travaux de Sakamoto et al. montrent que les formes dimérique et/ou tétramérique de la transferrine sont des activateurs de la phagocytose médiée par les

polynucléaires neutrophiles [68]. Il est donc probable que les mécanismes moléculaires, mis en jeu au cours de l'ingestion des particules à phagocyter par les phagocytes « professionnels », et les phagocytes « non professionnels » fassent intervenir les mêmes acteurs moléculaires. L'invalidation du récepteur Mer, ainsi que deux autres récepteurs de Gas6, Axl et tyro3, entraînent une diminution d'un tiers de la taille des testicules et un défaut de la spermatogenèse qui se traduit par une absence de spermatozoïdes matures [69].

L'ingestion des cellules germinales apoptotiques présentant des résidus phosphatidylsérine à leur surface peut être inhibée de 50 % par ajout de l'annexine A5 au début du processus d'apoptose des cellules germinales [70]. Cela implique l'existence d'autres signaux en plus de l'exposition des résidus de phosphatidylsérine pour transmettre le signal aux cellules phagocytiques. Il est tentant d'émettre l'hypothèse que la variation du niveau d'expression de la transferrine pourrait être ce signal. Plusieurs observations confortent cette hypothèse. L'addition de FSH inhibe l'ingestion des corps résiduels par les cellules de Sertoli, même si elle favorise leur liaison à la surface de ces cellules [71]. Or, la FSH est un puissant régulateur de l'expression de la transferrine par les cellules de Sertoli. Yefimova et al. ont montré que l'expression du dimère de la transferrine est détectée dans le milieu des cellules de Sertoli uniquement quand ces cellules sont stimulées par la FSH et le rétinol [58].

Au cours du cycle de l'épithélium séminifère, le niveau d'expression de la transferrine par les cellules de Sertoli varie. L'expression des ARNm de la transferrine s'effondre pendant les stades VIII et IX. Or, ces stades du cycle de l'épithélium séminifère correspondent à la spermiation, chez le rat, qui se caractérise par une élimination accrue des corps résiduels et par une forte activité de phagocytose des cellules de Sertoli [72-75]. Toutes ces observations sont compatibles avec l'idée que la diminution de l'expression de la transferrine pourrait être un signal inducteur de l'ingestion des corps résiduels et/ou que la transferrine est un régulateur du niveau d'ingestion des corps résiduels.

## Conclusion et perspectives

La découverte récente de l'existence de plusieurs formes de transferrine exprimées par les cellules de Sertoli ouvre un large champ d'investigation. En effet, de nombreuses questions se posent désormais : quelle est la structure moléculaire qui permet la constitution du dimère ? Comment et où se forme-t-il dans la cellule de Sertoli ? Comment la présence de fer modifie la conformation du dimère afin qu'il devienne actif ? La démonstration *in vitro* de l'implication de la forme dimérique de la transferrine dans la régulation de la phagocytose des corps résiduels par les cellules de Sertoli nous conduit, d'une part, à vérifier, *in vivo*, cette observation

en développant des modèles de souris invalidés conditionnellement pour la transferrine ou surexprimant spécifiquement la transferrine dimérique dans les cellules de Sertoli et, d'autre part, à identifier les mécanismes moléculaires qui permettent à la transferrine d'inhiber l'ingestion des corps résiduels par les cellules de Sertoli. Une attention particulière sera portée sur l'effet de la transferrine sur l'expression du récepteur Mer et de son ligand Gas6. Enfin, au regard de cette nouvelle fonction de la transferrine et de l'importance de l'élimination des cellules germinales apoptotiques et des corps résiduels par les cellules de Sertoli dont le dysfonctionnement peut entraîner des oligozoospermies et des azoospermies [76], il serait, peut-être, important de revisiter ces pathologies au travers de la recherche de la présence de mutations dans le gène de la transferrine.

**Déclaration de conflit d'intérêt :** Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

## Références

1. Skinner MK, Cosand WL, Griswold MD (1984) Purification and characterization of testicular transferrin secreted by rat Sertoli cells. *Biochem J* 218(2):313–320
2. Fuse H, Okomura M, Kazama T, Katayama T (1994) Correlation of seminal plasma transferrin concentration and hypoosmotic swelling of the sperm. *Arch Androl* 32(2):95–100
3. Sueldo C, Marrs RP, Berger T, et al (1984) Correlation of semen transferrin concentration and sperm fertilizing capacity. *Am J Obstet Gynecol* 150:528–531
4. Barthelemy C, Khalfoun B, Guillaumin JM, et al (1988) Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. *J Reprod Fertil* 82(1):113–118
5. Ber A, Vardinon N, Yogev L, et al (1990) Transferrin in seminal plasma and in serum of men: its correlation with sperm quality and hormonal status. *Hum Reprod* 5(3):294–297
6. Gilmont RR, Senger PL, Sylvester SR, Griswold MD (1990) Seminal transferrin and spermatogenic capability in bull. *Biol Reprod* 43(1):151–157
7. Bharshankar RN, Bharshankar JR (2000) Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. *Indian J Physiol Pharmacol* 44(4):456–460
8. Yoshida KI, Nakame Y, Uchijima Y (1988) Seminal plasma transferrin concentration in normozoospermic fertile men and oligozoospermic men associated with varicocele. *Int J Fertil* 33(6):432–436
9. Hugly S, Griswold M (1987) Regulation of levels of specific Sertoli cell mRNAs by vitamin A. *Dev Biol* 121(2):316–324
10. Zalata A, Hafez T, Schoonjans F, Comhaire F (1996) The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 11(4):761–764
11. Bernstein SE (1987) Hereditary hypotransferrinemia with hemosiderosis, a murine disorder resembling human atransferrinemia. *J Lab Clin Med* 110(6):690–705
12. Gorinski B, Horsburgh C, Lindsey PE, et al (1979) Evidence for the bilobal nature of differic rabbit plasma transferrin. *Nature* 281(5727):157–158
13. Heaphy S, Williams J (1982) The preparation and partial characterization of N-terminal and C-terminal: iron-binding fragments from rabbit serum transferrin. *Biochem J* 205(3):611–617
14. Aisen P, Leibman A, Zweier J (1978) Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem* 253(6):1930–1937
15. Morgan EH (1969) Factors affecting the synthesis of transferrin by rat tissue slices. *J Biol Chem* 244(15):4193–4199
16. Meehan RR, Barlow DP, Hill RE, et al (1984) Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and fetal liver. *EMBO J* 3(8):1881–1885
17. Cassia R, Besnard L, Fiette L, et al (1997) Transferrin is an early marker of hepatic differentiation, and its expression correlates with the postnatal development of oligodendrocytes in mice. *J Neurosci Res* 50(3):421–432
18. Yeoh GC, Morgan EH (1974) Albumin and transferrin synthesis during development in the rat. *Biochem J* 144(2):215–224
19. Levin MJ, Tuil D, Uzan G, et al (1984) Expression of the *transferrin* gene during development of non-hepatic tissues: high-level of transferrin mRNA in fetal muscle and adult brain. *Biochem Biophys Res Commun* 122(1):212–217
20. Bloch B, Popovici T, Chouham S, et al (1987) *Transferrin* gene expression in choroid plexus of the adult rat brain. *Brain Res Bull* 18(4):573–576
21. Yefimova MG, Jeanny JC, Guillonnet X, et al (2000) Iron, ferritin, transferrin and transferrin receptor in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(8):2343–2351
22. Lee EY, Barcellos-Hoff MH, Chen LH, et al (1987) Transferrin is a major mouse milk protein and is synthesized by mammary epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 23(3):221–226
23. Huggenvik JI, Idzerda RL, Haywood L, et al (1987) Transferrin messenger ribonucleic acid molecular cloning and hormonal regulation in rat Sertoli cells. *Endocrinology* 120(1):332–340
24. Migrenne S, Racine C, Guillou F, Habert R (2003) Pituitary hormones inhibit the function and differentiation of fetal Sertoli cells. *Endocrinology* 144(6):2617–2622
25. Anthony CT, Rosselli M, Skinner MK (1991) Actions of the testicular paracrine factor (P-Mod-S) on Sertoli cell transferrin secretion throughout pubertal development. *Endocrinology* 129(1):353–360
26. Suire S, Fontaine I, Guillou F (1997) *Transferrin* gene expression and secretion in rat Sertoli cells. *Mol Reprod Dev* 48(2):168–175
27. Morales C, Hugly S, Griswold MD (1987) Stage-dependent levels of specific mRNA transcripts in Sertoli cells. *Biol Reprod* 36(4):1035–1046
28. Lecureuil C, Staub C, Fouchécourt S, et al (2007) Transferrin overexpression alters testicular function in aged mice. *Mol Reprod Dev* 74(2):197–206
29. Skinner MK, Griswold MD (1982) Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biol Reprod* 27(1):211–221
30. Suire S, Fontaine I, Guillou F (1995) Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates *transferrin* gene transcription in rat Sertoli cells: cis and trans-acting elements involved in FSH action via cyclic adenosine 3'/5'-monophosphate on the *transferrin* gene. *Mol Endocrinol* 9(6):756–766
31. Foucault P, Carreau S, Kuczynski W, et al (1992) Human Sertoli cells in vitro. Lactate, estradiol-17 beta and transferrin production. *J Androl* 13(5):361–367
32. Huleihel M, Zeyse D, Lunenfeld E, et al (2002) Induction of transferrin secretion in murine Sertoli cells by FSH and IL-1: the possibility of different mechanism(s) of regulation. *Am J Reprod Immunol* 47(2):112–117
33. Monet-Kuntz C, Guillou F, Fontaine I, Combarnous Y (1992) Purification of ovine transferrin and study of the hormonal control of its secretion in enriched cultures of ovine Sertoli cells. *J Reprod Fertil* 94(1):189–201
34. Suire S, Maurel MC, Guillou F (1996) Follicle-stimulating hormone action on the *transferrin* gene in Sertoli cells is mediated by cAMP-responsive-element-binding-protein and antagonized by chicken

- ovalbumin-upstream-promoter-transcription factor. *Eur J Biochem* 239(1):52–60
35. Hugly S, Roberts K, Griswold MD (1988) Transferrin and sulphated glycoprotein-2 messenger ribonucleic acid levels in the testis and isolated Sertoli cells of hypophysectomized rats. *Endocrinology* 122(4):1390–1396
  36. Itoh N, Nanbu A, Tachiki H, et al (1994) Restoration of testicular transferrin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and spermatogenesis by exogenously administered purified FSH and testosterone in medically hypophysectomized rats. *Arch Androl* 33(3):169–177
  37. Sigillo F, Guillou F, Fontaine I, et al (1999) In vitro regulation of rat Sertoli cell transferrin expression by tumor necrosis factor alpha and retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol* 148(1–2):163–170
  38. Holmes SD, Lipshultz LI, Smith RG (1984) Regulation of transferrin secretion by human Sertoli cells cultured in the presence or absence of human peritubular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 59(6):1058–1062
  39. Storch S, Kübler B, Höning S, et al (2001) Transferrin binds insulin-like growth factors and affects binding properties of insulin-like growth factor binding protein-3. *FEBS Lett* 509(3):395–398
  40. Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, et al (1999) Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69(1–6):379–384
  41. Roberts KP, AWoniyi CA, Santulli R, Zirkin BR (1991) Regulation of Sertoli cell transferrin and sulphated glycoprotein-2 messenger ribonucleic acid levels during the restoration of spermatogenesis in the adult hypophysectomized rat. *Endocrinology* 129(6):3417–3423
  42. Le Magueresse B, Pineau C, Guillou F, Jégou B (1988) Influence of germ cells upon transferrin secretion by rat Sertoli cells in vitro. *J Endocrinol* 118(3):R13–R16
  43. Stallard BJ, Griswold MD (1990) Germ cell regulation of Sertoli cell transferrin mRNA levels. *Mol Endocrinol* 4(3):393–401
  44. Norton JN, Skinner MK (1992) Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: potential role of immediate-early genes. *Mol Endocrinol* 6(12):2018–2026
  45. Whaley PD, Chaudhary J, Cupp A, Skinner MK (1995) Role of specific response elements of the c-fos promoter and involvement of intermediate transcription factor(s) in the induction of Sertoli cell differentiation (transferrin promoter activation) by the testicular paracrine factor PModS. *Endocrinology* 136(7):3046–3053
  46. De Winter JP, Vanderstichele HM, Verhoeven G, et al (1994) Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin-A and express activin receptor type II in vitro. *Endocrinology* 135(2):759–767
  47. Onoda M, Suarez-Quian CA (1994) Modulation of transferrin secretion by epidermal growth factor in immature rat Sertoli cells in vitro. *J Reprod Fertil* 100(2):541–550
  48. Hoeben E, Deboel L, Rombauts L, et al (1994) Different cells and cell lines produce factors that modulate Sertoli cell function. *Mol Cell Endocrinol* 101(1–2):263–275
  49. Boockfor FR, Schwarz LK (1991) Effects of interleukin-6, interleukin-2, and tumor necrosis factor alpha on transferrin release from Sertoli cells in culture. *Endocrinology* 129(1):256–262
  50. Hoeben E, Van Damme J, Put W, et al (1996) Cytokines derived from activated human mononuclear cells markedly stimulate transferrin secretion by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 137(2):514–521
  51. Holmes SD, Bucci LR, Lipshultz LI, Smith RG (1983) Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes. *Endocrinology* 113(5):1916–1918
  52. Sylvester SR, Griswold MD (1984) Localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes. *Biol Reprod* 31(1):195–203
  53. Petrie RG Jr, Morales CR (1992) Receptor-mediated endocytosis of testicular transferrin by germinal cells of the rat testis. *Cell Tissue Res* 267(1):45–55
  54. Wauben-Penris PJ, Strous GJ, van der Donk HA (1988) Kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake by intact isolated rat seminiferous tubules and Sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 38(4):853–861
  55. Jabado N, Cannone-Hergaux F, Gruenheid S, et al (2002) Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells. *Blood* 100(7):2617–2622
  56. Merker HJ, Vormann J, Günther T (1996) Iron-induced injury of rat testis. *Andrologia* 28(5):267–273
  57. Idzerda RL, Huebers H, Finch CA, McKnight GS (1986) Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(11):3723–3727
  58. Yefimova MG, Sow A, Fontaine I, et al (2008) Dimeric transferrin inhibits phagocytosis of residual bodies by testicular rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 78(4):697–704
  59. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, et al (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5(7):551–562
  60. Kawasaki Y, Nakagawa A, Nagaosa, et al (2002) Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular Sertoli cells. *J Biol Chem* 277(30):27559–27566
  61. Shiratsuchi A, Kawasaki Y, Ykemoto M, et al (1999) Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. *J Biol Chem* 274(9):5901–5908
  62. Gillot I, Jehl-Pietri C, Gounon P, et al (2005) Germ cells and fatty acids induce translocation of CD36 scavenger receptor to the plasma membrane of Sertoli cells. *Cell Sci* 118(14):3027–3035
  63. Wang H, Chen Y, Ge Y, et al (2005) Immunorexpression of Tyro 3 family receptors Tyro3, Axl and Mer, and their ligand Gas6 in postnatal developing mouse testis. *J Histochem Cytochem* 53(11):1355–1364
  64. Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, et al (1997) Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 272(47):29411–29414
  65. Benzakour O, Gely A, Lara R, Coronas V (2007) Fonctions nouvelles de Gas6 et de la protéine S : facteurs vitamine K-dépendants et ligands des récepteurs tyrosine-kinase de la famille TAM. *Med Sci (Paris)* 23(10):826–833
  66. Scott RS, McMahan EJ, Pop SM, et al (2001) Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by Mer. *Nature* 411(6834):207–211
  67. Todt JC, Hu B, Curtis JL (2004) The receptor tyrosine-kinase Merck activates phospholipase C-gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages. *J Leukoc Biol* 75(4):705–713
  68. Sakamoto H, Sakamoto N, Oryu M, et al (1997) A novel function of transferrin as a constituent of macromolecular activators of phagocytosis from platelets and their precursors. *Biochem Biophys Res Commun* 230(2):270–274
  69. Lu Q, Gore M, Zhang Q, et al (1999) Tyro3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* 398(6729):723–728
  70. Kenis H, van Genderen H, Deckers NM, et al (2006) Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp Cell Res* 312(6):719–726
  71. Pineau C, Le Magueresse B, Courtens JL, Jégou B (1991) Study in vitro of the phagocytic function of Sertoli cells in the rat. *Cell Tissue Res* 264(3):589–598
  72. Garza MM, Schwarz LK, Bonner JM, Boockfor FR (1991) Sertoli cell function varies along the seminiferous tubule: the proportion

- and response of transferrin secretors differ between stage-associated tubule segments. *Endocrinology* 128(4):1869–1874
73. Morales C, Hugly S, Griswold MD (1987) Stage-dependent levels of specific mRNA transcripts in Sertoli cells. *Biol Reprod* 36(4):1035–1046
74. Morales CR, Alcinar AA, Hecht NB, Griswold MD (1989) Specific mRNAs in Sertoli and germinal cells of testes from stage synchronized rats. *Mol Endocrinol* 3(4):725–733
75. Wright WW, Parviven M, Musto, et al (1983) Identification of stage-specific proteins synthesized by rat seminiferous tubules. *Biol Reprod* 29(1):257–270
76. Maeda Y, Shiratsuchi A, Namiki M, Nakanishi Y (2002) Inhibition of sperm production in mice by annexin V microinjected into seminiferous tubules: possible etiology of phagocytic clearance of apoptotic spermatogenic cells and male fertility. *Cell Death Differ* 9(7):742–749

## Rôles des récepteurs TR $\alpha$ 1 et p43 dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli

### Résumé

Des changements dans le statut thyroïdien altèrent les fonctions testiculaires, impliquant, entre autre, le récepteur à la T3, TR $\alpha$ 1.

Lorsqu'un récepteur dominant-négatif de TR $\alpha$ 1 (TR $\alpha^{AMI}$ ) est spécifiquement introduit dans les cellules de Sertoli (lignée TR $\alpha^{AMI}$ -SC), on observe une augmentation significative de l'index de prolifération des cellules de Sertoli à 3 jpp, induisant une augmentation de la densité de ces cellules et du poids testiculaire chez l'adulte. Ce phénotype est corrélé à une modification de l'expression de gènes clés du cycle cellulaire dont Cdk4, JunD et c-myc.

Lorsque le récepteur TR $\alpha^{AMI}$  est introduit également dans les cellules de Leydig (lignée TR $\alpha^{AMI}$ -Aro), la sécrétion de testostérone est augmentée.

Enfin, nous montrons l'implication de l'isoforme mitochondriale p43 du récepteur TR $\alpha$ 1, dans ce contrôle T3-dépendant et autonome de la prolifération des cellules de Sertoli suggérant l'existence d'un crosstalk entre génome nucléaire et mitochondrial dans cette régulation par la T3.

**Mots-clés:** cellules de Sertoli, prolifération, développement post-natal, hormones thyroïdiennes, récepteur TR $\alpha$ 1

### Résumé en anglais

Changes in the thyroid status altered testicular functions, involving thyroid hormone receptors, among them, TR $\alpha$ 1 is implied

The expression of a TR $\alpha$ 1 dominant-negative receptor (TR $\alpha^{AMI}$ ) specifically in Sertoli cells (TR $\alpha^{AMI}$ -SC mice) leads to a significant increase in Sertoli cell proliferation at 3 dpp, inducing an increase in Sertoli cell density, testis weight and testicular spermatid reserve at adulthood. This phenotype is correlated with changes in cell cycle gene expression like Cdk4, JunD and c-myc.

When TR $\alpha^{AMI}$  is also expressed in Leydig cells (TR $\alpha^{AMI}$ -Aro mice), it induces an increase in testosterone levels.

Finally, we demonstrate that the mitochondrial p43 receptor is involved in this T3-dependant control of Sertoli cell proliferation, suggesting the existence of a crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes.

**Key words:** Sertoli cells, proliferation, post-natal development, thyroid hormones, TR $\alpha$ 1 receptor