

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand Frappier

**DÉVELOPPEMENT D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE DE GONOCYTES
FŒTAUX DE RAT POUR L'ÉVALUATION TOXICOLOGIQUE DE
POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX**

Par
Fabien Joao

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
Examinatrice interne

Isabelle Plante
INRS – Institut Armand Frappier

Examinatrice externe

Martine Culty
Department of Pharmacology and
Pharmaceutical Sciences
University of Southern California

Directeur de recherche

Géraldine Delbès
INRS – Institut Armand Frappier

REMERCIEMENTS

Je ne saurais commencer ce mémoire sans remercier les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'établissement de ce projet.

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Géraldine Delbès, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire et pour m'avoir transmis sa passion de la recherche. Je la remercie également pour la considération et la confiance qu'elle m'a apporté tout au long de ce projet. J'ai énormément appris dans son laboratoire, aussi bien au niveau technique mais aussi dans la gestion d'un laboratoire.

Je souhaiterais également remercier mes collègues de laboratoire Guylaine Lassonde, Hermance Beaud, Arlette Rwigemera, Bintou Gaye et Amélie Tremblay qui m'ont toutes beaucoup appris et ont permis de faire de mon passage dans le laboratoire un moment inoubliable. Merci pour toutes ces longues discussions utiles et inutiles, tous ces grands débats qui m'ont permis d'avancer et de me permettre d'être où je suis présentement. Un merci tout particulier à Guylaine pour son soutien technique pour les tris au FACS et sa bonne humeur contagieuse ! Un grand merci à Arlette pour sa participation dans l'élaboration des résultats de méthylation de l'ADN.

Merci également au Fond de Recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT) pour le financement du projet.

Finalement, je me dois de remercier énormément toute ma famille, mon père, ma mère, ma grand-mère et ma sœur sans qui tout ça n'aurait jamais été possible. Merci de m'avoir supporté durant ma maîtrise mais aussi tout au long de mes études. Merci d'avoir été présents malgré la distance et de m'avoir poussé quand la motivation était moins présente et de m'avoir toujours soutenu.

RÉSUMÉ

Les gonocytes, précurseurs fœtaux de toute la lignée germinale, sont sensibles aux perturbateurs endocriniens (PE). Afin de créer un modèle permettant d'étudier les mécanismes de dérégulation causés par les PE directement dans les gonocytes, nous proposons d'établir une lignée cellulaire de gonocytes fœtaux. Nous utilisons ici un modèle de rats qui expriment la protéine fluorescente verte (GFP) spécifiquement dans les cellules germinales. Les gonocytes en prolifération sont obtenus par tri en cytométrie en flux (FACS) à partir de testicules explantés au 16^{ème} jour de gestation. Nous avons testé les conditions de culture primaire dans différents milieux, et sur différents supports. Les cellules GFP-positives se cultivent le mieux sur la laminine, dans un milieu MEM α additionné de basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Leukemia Inhibiting Factor (LIF) et Stem Cell Factor (SCF). Après transfection avec un vecteur d'immortalisation contenant l'antigène large T SV40-mCherry, nous avons obtenu deux lignées de cellules immortalisées, positives pour la mCherry mais étonnamment négatives pour la GFP. La caractérisation cellulaire par microscopie électronique et immunofluorescence suivie d'une caractérisation moléculaire par RT-qPCR et pyroséquençage suggère un caractère somatique aux cellules de ces lignées. Nos données actuelles ne permettent pas encore d'identifier précisément la nature des cellules immortalisées. Des expériences complémentaires permettront d'identifier le type cellulaire de ces lignées afin de déterminer si ces dernières sont de bons modèles pour évaluer les effets directs des PE sur le développement du testicule fœtal.

Mot-clés : gonocytes, fœtal, GFP, lignée de cellules immortalisées, perturbateurs endocriniens, culture cellulaire

ABSTRACT

Gonocytes, the fetal precursors of the entire germ line, are sensitive to endocrine disruptors. To generate a model to resolve the deregulation mechanisms caused by endocrine disruptors directly in gonocytes, we propose to establish a fetal gonocyte cell line. Here, we use a rat model where the Green Fluorescent Protein (GFP) is only expressed in the germ cells. The proliferating gonocytes are obtained by flow cytometry (FACS) from testes explanted at 16 days of gestation. We tested the conditions of primary culture in different media, and on different coatings. The GFP-positive cells are best grown on laminin, in MEM α medium supplemented with basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Leukemia Inhibiting Factor (LIF) and Stem Cell Factor (SCF). After transfection with an immortalization vector containing the SV40-mCherry large T antigen, we obtained two immortalized cell lines positive for mCherry, but surprisingly negative for GFP. The cellular characterization by electron microscopy, immunofluorescence and the molecular characterization by RT-qPCR suggest that these cells maybe somatic in nature. However, our data do not make it possible to identify the cell type. Further experiments will allow the characterization of these cell line in order to determine if they are a good model for evaluating the direct effects of endocrine disruptors on the fetal testis.

Mot-clés : gonocytes, fetal, GFP, immortalized cell line, endocrine disruptors, cell culture

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTERATURE	2
1.1 LE TESTICULE.....	3
1.1.1 <i>Introduction</i>	3
1.1.2 <i>Les cellules de Sertoli</i>	4
1.1.3 <i>Les cellules de Leydig</i>	7
1.1.4 <i>Les autres types cellulaires somatiques du testicule</i>	9
1.1.5 <i>La lignée germinale</i>	10
1.2 LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET LA FERTILITE MASCULINE	14
1.2.1 <i>Introduction</i>	14
1.2.2 <i>Les perturbateurs endocriniens</i>	14
1.3 HYPOTHESE ET OBJECTIFS.....	23
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	25
2.1 LES ANIMAUX	25
2.1.1 <i>Les rats</i>	25
2.1.2 <i>Les accouplements</i>	25
2.2 PRELEVEMENTS DES TESTICULES	25
2.3 DIGESTION ENZYMATIQUE	26
2.4 TRI CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	27
2.5 CULTURE CELLULAIRE	27
2.5.1 <i>Les supports</i>	28
2.5.2 <i>Les milieux de culture</i>	28
2.5.3 <i>Les facteurs de croissance</i>	28
2.5.4 <i>L'éthynilestradiol</i>	28
2.6 MESURE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE	29
2.7 MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE	30
2.8 TRANSFECTION ET IMMORTALISATION.....	32
2.8.1 <i>Transfection</i>	32
2.8.2 <i>Immortalisation</i>	32
2.8.3 <i>Passages et doubling time</i>	32
2.9 ÉTUDE DE LA MORPHOLOGIE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	33

2.10	MESURE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE PAR IMMUNOFLUORESCENCE	34
2.11	MESURE DE LA METHYLATION DE L'ADN PAR PYROSEQUENÇAGE.....	36
2.11.1	<i>Extraction d'ADN</i>	36
2.11.2	<i>Conversion au bisulfite</i>	36
2.11.3	<i>PCR et Pyroséquençage</i>	36
2.12	MESURE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR RT-QPCR	38
2.12.1	<i>Extraction d'ARN</i>	38
2.12.2	<i>Transcription inverse et qPCR</i>	38
2.13	STATISTIQUES.....	39
CHAPITRE 3	: RESULTATS	41
3.1	PURIFICATION DES CELLULES GFP-POSITIVES PAR CYTOMETRIE EN FLUX	41
3.2	ÉTABLISSEMENT DES CONDITIONS DE CULTURE POUR LES CELLULES GFP-POSITIVES.....	42
3.2.1	<i>Les milieux de culture</i>	42
3.2.2	<i>Les supports</i>	43
3.2.3	<i>Les facteurs de croissance</i>	45
3.2.4	<i>L'éthinylestradiol</i>	46
3.3	TRANSFECTABILITE DES CELLULES GFP-POSITIVES ET IMMORTALISATION PAR LIPOFECTION.....	47
3.3.1	<i>Transfectabilité des cellules GFP-positives avec un vecteur pmCherry-C1</i>	47
3.3.2	<i>Immortalisation et établissement des lignées 1 et ½</i>	49
3.4	CARACTERISATION CELLULAIRE DES LIGNEES 1 ET ½.....	51
3.4.1	<i>Étude de la morphologie par microscopie électronique</i>	51
3.4.2	<i>Immunohistochimie de marqueurs de cellules testiculaires</i>	53
3.5	CARACTERISATION MOLECULAIRE DES LIGNEES 1 ET ½.....	56
3.5.1	<i>Études des profils de méthylation des lignées 1 et ½</i>	56
3.5.2	<i>Étude de l'expression des marqueurs des cellules testiculaires au niveau transcriptionnel</i>	58
CHAPITRE 4	: DISCUSSION ET CONCLUSION	61
3.6	DISCUSSION.....	61
3.7	CONCLUSION.....	67
REFERENCES	68

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1.1.1 Structure du testicule fœtal.....</i>	<i>3</i>
<i>Figure 1.1.3 Différenciation et mise en place des différents types cellulaires du testicule fœtal</i>	<i>5</i>
<i>Figure 1.1.4 Migration des cellules germinales primordiales dans la gonade primordiale</i>	<i>11</i>
<i>Figure 1.1.5 Chronologie du développement des gonocytes chez le rat.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 1.2.1 Structure chimique de quelques composés oestrogéniques, thyroïdogéniques et androgéniques</i>	<i>19</i>
<i>Figure 2.2.1 Différences morphologiques des gonades de fœtus de rat mâle et femelle à 16.5 dpc</i>	<i>26</i>
<i>Figure 2.7.1 Analyse du pourcentage de cellules BrdU-positives selon un comptage semi-automatique au Cytation5.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 3.1.1 Évolution de l'intensité du signal de la GFP selon l'âge de prélèvement des testicules</i>	<i>41</i>
<i>Figure 3.2.1 Évolution de la morphologie et de l'expression de la GFP des gonocytes triés à 16 dpc pendant 72h de culture sur deux supports de culture.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 3.2.2 Cellules BrdU-positives après 24h de culture en fonction de la composition du milieu en facteur de croissance.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 3.2.3 Cellules PI-positives après 24 de culture en présence ou non d'EE2.....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 3.3.1 Transfection des cellules de la fraction GFP-positive avec un vecteur pmCherry-C1</i>	<i>48</i>
<i>Figure 3.3.2 Immortalisation des cellules de la fraction GFP-positive avec un vecteur pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry et obtention de 2 lignées cellulaires</i>	<i>50</i>
<i>Figure 3.4.1 Observation de la morphologie des cellules de la lignée 1 par microscopie électronique à transmission</i>	<i>52</i>
<i>Figure 3.4.2 Expression de l'HSP90 dans les lignées 1 et ½.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 3.4.3 Expression de l'AMH dans les lignées 1 et ½</i>	<i>55</i>
<i>Figure 3.5.1 Profil de méthylation de Snrpn et H19 dans les fractions GFP-positive et GFP-négative et les lignées 1 et ½.....</i>	<i>597</i>
<i>Figure 3.5.2 Expression relative des marqueurs testiculaires des cellules des fractions GFP-positive et GFP-négative et des lignées 1 et ½.....</i>	<i>579</i>

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 2.10.1 Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la révélation de l'HSP90 et de l'AMH</i>	<i>35</i>
<i>Tableau 2.11.1 Gènes et séquences des amorces utilisés pour le pyroséquençage</i>	<i>37</i>
<i>Tableau 2.13.1 Marqueurs des différents types cellulaires du testicule et séquences de leurs amorces associées pour l'étude de l'expression par RT-qPCR.....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 3.2.1 Autofluorescence des milieux à l'étude et leur impact sur la morphologie et l'intensité de la GFP sur les cellules GFP-positives en culture.</i>	<i>42</i>

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3 β Hsd	3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase
A-SMA	Alpha-smooth muscle actin
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMH	Anti-mullerian hormone
ARE	Éléments de réponse aux androgènes
ARKO	Androgen receptor knockout
ARN	Acide ribonucléique
bFGF	basic Fibroblast growth factor
BPA	Bisphénol A
BPC	Biphényles polychlorés
BrdU	Bromodésoxouridine
CCPA	Comité canadien de protection des animaux
CIPA	Comité institutionnel de protection des animaux
CNBE	Comité national de biologie expérimentale
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
Dpc	<i>Days post coitum</i>
Dpp	<i>Days post coitum</i>
EE2	Éthynilestradiol
ERE	Éléments de réponse aux œstrogènes
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Sérum foetal bovin

GFP	Green fluorescent protein
HBSS	Hank's balance salt solution
HSP90	Heat-shock protein 90
IDT	Integrated DNA technologies
IAF	Institut Armand-Frappier
INRS	Institut national de la recherche scientifique
LIF	Leukemia inhibiting factor
MEM	Minimum essential medium
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBDE	Polybromodiphényléther
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Perturbateur endocrinien
PGC	Cellule germinale primordiale
PI	Iodure de propidium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-qPCR	Transcription inverse-Réaction en chaîne par polymérase quantitative
SCARKO	Sertoli cells androgen receptor knockout
SCF	Stem cell factor
SRY	Sex-determining region of Y chromosome
SSEA-1	Antigène-1 embryonnaire de souris stade-spécifique
SSC	Cellule souche spermatogoniale
TDS	Syndrome de dysgénésie testiculaire
Tm	Température de fusion
vWF	von Willebrand factor
WHO	World Health Organization

INTRODUCTION

« Toutes les choses sont poison et rien n'est sans poison; seule la dose détermine ce qui n'est pas un poison ». Cet énoncé de Paracelse, un médecin-alchimiste du 16^{ème} siècle, fait partie intégrante encore aujourd'hui des principes de la toxicologie moderne. La toxicologie, ou l'étude des effets néfastes de produits chimiques ou physiques sur les organismes vivants, remonte aussi loin que les premiers humains qui utilisaient le venin d'animaux et des extraits de plante pour la chasse, la guerre ou l'assassinat. Aujourd'hui, l'étude de ces effets néfastes implique une compréhension des mécanismes ou des modes d'action au niveau de l'organe, de la cellule mais également au niveau moléculaire. Dans notre société en constante évolution et aux besoins grandissants, de nouvelles molécules sont produites chaque année pour répondre à la demande dans les domaines pharmaceutiques, agricoles et miniers, pour ne citer qu'eux. Ces molécules peuvent se retrouver dans l'environnement et affecter la faune et la flore. En effet, il existe un nombre considérable de molécules ayant un impact possible sur la santé humaine qui n'ont encore jamais été testées. Le système reproducteur peut être une cible de ces molécules. La fonction de reproduction étant responsable du maintien de la biodiversité et de la transmission du patrimoine de génération en génération, une dérégulation de ce système pourrait avoir de lourdes conséquences. Les effets sur la fonction de reproduction de certaines de ces molécules sont déjà connus, mais il reste encore beaucoup à découvrir.

Notre laboratoire s'intéresse notamment aux cellules germinales fœtales, les gonocytes, et aux effets des PE sur ces cellules. Il a en effet été montré qu'un dérèglement des cellules germinales fœtales par les PE pourrait être en cause dans les problèmes de fertilité à l'âge adulte. Cependant, les mécanismes d'action par lesquelles ces molécules affectent les cellules germinales sont encore mal connus en raison, entre autres, du manque de modèle d'étude adéquat. En effet, à ce jour, il n'existe pas de modèle d'étude fiable à long terme pour l'étude des gonocytes.

Le présent projet a pour but d'établir une lignée cellulaire de gonocytes chez le rat pour l'étude toxicologique des polluants environnementaux sur la fertilité masculine. Le premier chapitre du mémoire présente une revue de la littérature sur les composants cellulaires du testicule et sur les PE. Le second chapitre contient le matériel et les méthodes utilisés pour mener à bien ce projet. Le troisième chapitre traite des résultats obtenus. Le quatrième chapitre est une discussion et une conclusion portant sur les résultats présentés.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Le testicule

1.1.1 Introduction

Le testicule est un organe qui assure 2 fonctions principales : la production de testostérone et la production de gamètes. Schématiquement, le testicule peut être divisé en deux compartiments : le compartiment interstitiel et le compartiment tubulaire. Le compartiment interstitiel est composé notamment des cellules de Leydig, les cellules productrices de testostérone, de macrophages ainsi que de vaisseaux sanguins. Le compartiment tubulaire est composé d'une couche de cellules myoépithéliales appelées les cellules péritubulaires, entourant des cellules somatiques nommées les cellules de Sertoli et enfin, des cellules germinales (Figure 1.1.1).

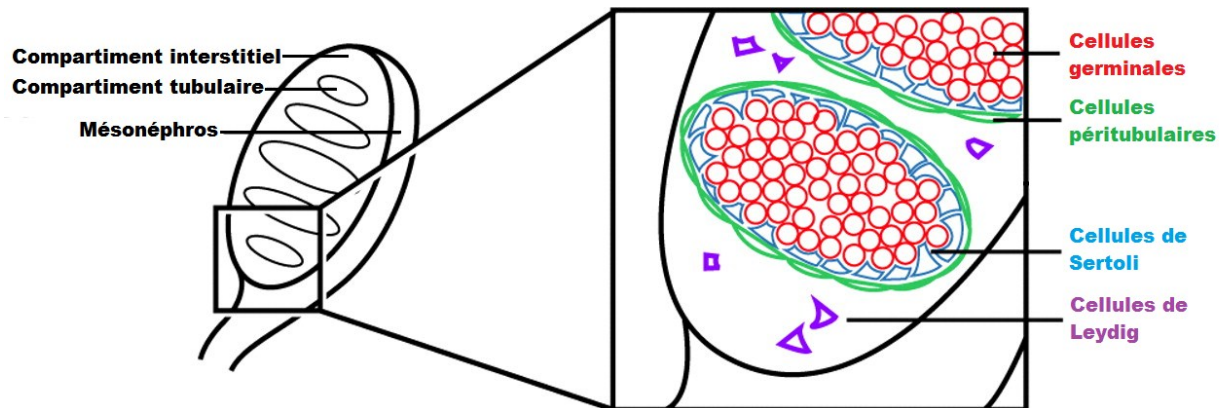


Figure 1.1.1 Structure du testicule fœtal Le testicule est composé du compartiment tubulaire qui comprend les cellules de Sertoli, les cellules péritubulaires et les cellules germinales, et du compartiment interstitiel, où se situe les cellules de Leydig. *Adapté de Wilhelm et al. 2007.*

1.1.2 Les cellules de Sertoli

Origine

Chez les mammifères, la formation des crêtes génitales établit la gonade primordiale, un organe indifférencié retrouvé aussi bien chez le mâle que chez la femelle. Cet organe se forme à 12,5 jours de gestation (*days post coitum*, dpc) chez le rat (Magre *et al.* 1991). La gonade primordiale aussi appelé gonade bipotentielle contient, entre autres, les précurseurs des cellules de Sertoli (Figure 1.1.2). Il a en effet été montré que des cellules de l'épithélium cœlomique vont migrer dans la gonade bipotentielle pour donner naissance aux cellules de Sertoli, ainsi qu'aux cellules de l'interstitium (Karl *et al.* 1998). On voit apparaître les premières cellules de Sertoli en différenciation à partir de 13,5 dpc chez le rat (Magre *et al.* 1991).

Différenciation

Dans les gonades mâles (XY), c'est l'expression du gène SRY qui va induire une cascade d'activation de gènes menant à la différenciation des précurseurs des cellules de Sertoli et au développement du testicule. L'action du gène SRY induit l'expression de différents gènes comme SRY-type HMG box 9 (Sox9), indispensable à la masculinisation de la gonade. En effet, il a été montré que Sox9 était essentiel pour la différenciation du testicule grâce à un modèle de souris transgénique Sox9 (-/-) conditionnel (Barrionuevo *et al.* 2006). En l'absence de Sox9, on observe une expression de marqueurs spécifiques à l'ovaire précoce, Wnt4 et Foxl2, et une absence de formation des cellules de Leydig dans des gonades XY (Barrionuevo *et al.* 2006). Une fois activé, Sox9 permet également de réguler l'expression de l'hormone anti-Müllérienne (AMH) par les cellules de Sertoli (Jakob *et al.* 2011). L'AMH va ensuite permettre la régression des canaux de Müller chez le mâle et laisser place aux canaux de Wolff, qui deviendront les canaux déférents. Pour résumer, l'activation de SRY va induire l'expression de Sox9 qui va à son tour réguler des signaux sous-jacents et mener à la différenciation des cellules de Sertoli (Barrionuevo *et al.* 2011). Une fois différenciées, les cellules de Sertoli vont participer à la différenciation de la gonade bipotentielle en testicule et à la formation des cordons séminifères. À l'âge adulte, les cellules de Sertoli vont être les cellules nourricières des cellules germinales et vont servir de support structurel pour la spermatogénèse tout en formant la barrière hémato-testiculaire (Barrionuevo *et al.* 2011).

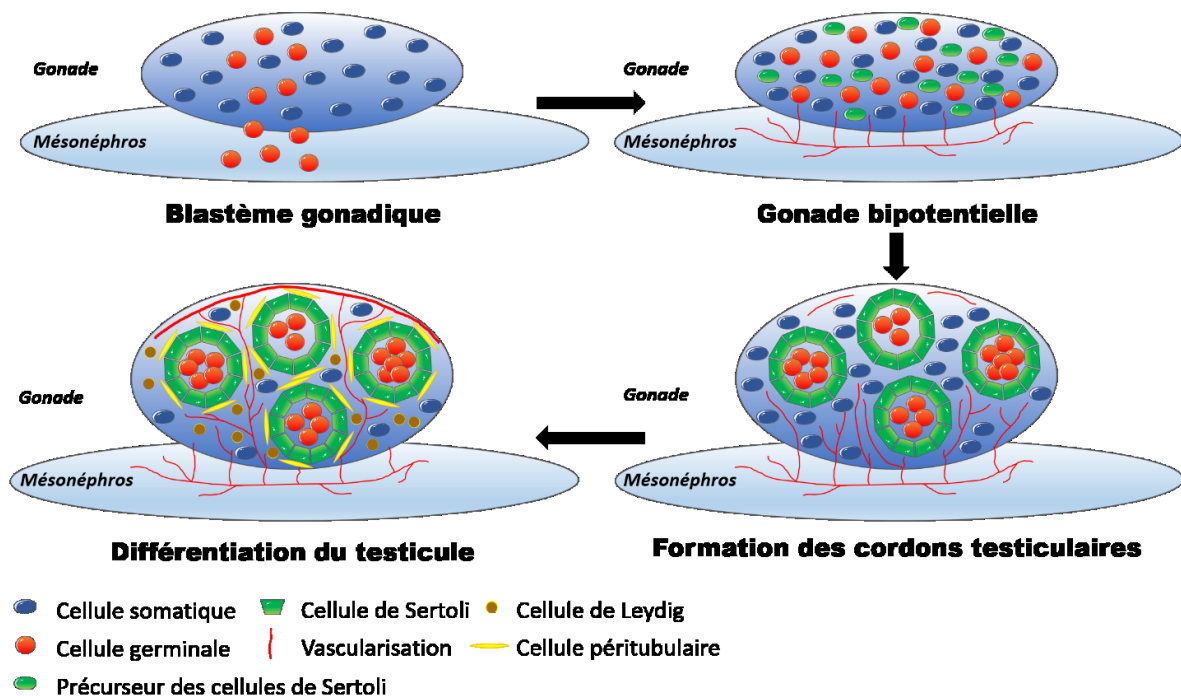


Figure 1.1.2 Différenciation et mise en place des différents types cellulaires du testicule fœtal. Peu de temps après la formation des crêtes génitales, les cellules germinales primordiales migrent dans la gonade. Les précurseurs des cellules de Sertoli vont exprimer les gènes nécessaires à la masculinisation du testicule dans la gonade bipotentielle pour former les cordons testiculaires par la suite en englobant les cellules de germinales. Après la formation des cordons, les autres types cellulaires du testicules se différencient. *Adapté de Barrionuevo et al. 2011.*

Chez les rongeurs, le nombre de cellules de Sertoli augmente continuellement après leur différenciation jusqu'au début de la puberté (Wang et al. 1989; Vergouwen et al. 1993; Baker et al. 2001). Chez le rat, on observe une augmentation du nombre de cellules de Sertoli de près de 30 fois entre la naissance et 15 jours après la naissance due à une prolifération active. Ce nombre reste cependant stable par la suite puisqu'aucune augmentation n'est observée chez des animaux âgés de 70 jours ou moins (Wang et al. 1989). Par ailleurs, cet arrêt de la prolifération coïncide avec l'établissement de la barrière hémato-testiculaire formée par les cellules de Sertoli, ainsi qu'avec l'entrée en méiose des cellules germinales (Bergmann et al. 1983). Ainsi, le nombre de cellules de Sertoli produit durant cette phase de prolifération est très important pour le développement normal du testicule. En effet, Orth et al. (1988) ont observé une diminution de la

production de cellules germinales dans un modèle de rats appauvris en cellules de Sertoli démontrant que la population de cellules germinales à l'âge adulte est dépendante, du moins en partie, de la population de cellules de Sertoli obtenue pendant la période périnatale (Orth *et al.* 1988).

Régulation par les stéroïdes

La prolifération et l'expression des gènes des cellules de Sertoli sont régulées par divers facteurs comme les œstrogènes et la testostérone (Walker *et al.* 2005; Lucas *et al.* 2011). Chez le rat, il a en effet été montré que les cellules de Sertoli possèdent les récepteurs aux androgènes (AR), une fois différenciées après la naissance, et aux œstrogènes (ESR2), leur permettant d'être réceptives à ces molécules (You *et al.* 1998; van Pelt *et al.* 1999; Lucas *et al.* 2011). Dans un modèle de souris ESR2-Knock Out (KO), il a été montré qu'une inactivation du récepteur ESR2 n'affectait cependant pas le nombre de cellules de Sertoli dans des testicules néonataux (Delbès *et al.* 2004). En revanche, dans un modèle de culture organotypique pendant la période fœtale, une exposition à du diéthylstilbestrol, un composé à caractère oestrogénique, induit une diminution du nombre de cellules de Sertoli (Lassurguère *et al.* 2003). Dans des testicules de souris fœtaux et de rats prépubères, il a également été montré qu'une exposition à de l'éthinylestradiol diminuait le nombre de cellules de Sertoli dans les tubules séminifères (Yasuda *et al.* 1985; Filipiak *et al.* 2009). Dans des souris dont le gène du récepteur aux androgènes a été inactivé (ARKO), une diminution progressive du nombre de cellules de Sertoli par testicule a été observée, en comparaison aux témoins (Tan *et al.* 2005). Cependant, dans un modèle de souris inactivées pour le récepteur aux androgènes spécifiquement dans les cellules de Sertoli (SCARKO), aucune différence phénotypique n'a été observée entre les animaux témoins et les animaux SCARKO (Tan *et al.* 2005), suggérant l'implication d'au moins un autre type cellulaire dans la réponse des cellules de Sertoli aux androgènes. Pendant la vie fœtale, dans un modèle de souris « Testicular feminized » (Tfm), des souris portant une mutation naturelle pour le gène du récepteur aux androgènes, une diminution du nombre de cellules de Sertoli ainsi qu'un défaut de la différenciation des cellules péritubulaires causés par l'inactivation du gène de l'AR ont été observés (Merlet *et al.* 2007a). Ceci suggère que les cellules péritubulaires participent à l'action des androgènes sur les cellules de Sertoli.

De nombreuses études ont démontré l'effet des stéroïdes sur les fonctions des cellules de Sertoli. Par exemple, il a été montré à l'aide d'une lignée de cellules de Sertoli murine (TM4) que la

communication intercellulaire via les jonctions gap était affectée en présence de nonylphénol (Aravindakshan *et al.* 2005). Dans une étude *in vivo* sur des rats, il a également été montré qu'une supplémentation en stéroïdes androgènes anabolisants, une drogue utilisée par les coureurs, induisait une diminution du nombre de cellules de Leydig, de cellules de Sertoli et de spermatozoïdes (Takahashi *et al.* 2004). Chez des rats prépubères, une diminution du nombre de cellules de Sertoli suite à une exposition à du diethylstilbestrol, un PE à caractère oestrogénique a également été observée (Filipiak *et al.* 2009).

En bref, les cellules de Sertoli sont affectées par les stéroïdes endogènes via leur action sur AR et ESR2 et sont donc des cibles potentielles des molécules exogènes qui agissent par ces voies.

1.1.3 Les cellules de Leydig

Origine et différenciation

Les cellules de Leydig prendraient leur origine dans le tissu interstitiel à partir de cellules mésenchymateuses (Habert *et al.* 2001). Considérée comme l'origine des cellules de Leydig fœtales la plus acceptée, cette dernière n'est cependant pas forcément exacte. En effet, d'autres origines comme les cellules de la crête neurale, les cellules épithéliales du mésonéphros et de l'épithélium cœlomique, ont également été proposées (Griswold *et al.* 2009). Quelle que soit leur origine, les cellules de Leydig fœtales produisent de la testostérone, détectable à partir de 15 jours de gestation chez le rat (Habert *et al.* 1984). Bien que le signal de leur différenciation soit inconnu, les cellules de Leydig fœtales se différencient après l'apparition des cellules de Sertoli et la formation du testicule à partir de la gonade bipotentielle (Figure 1.1.3). Il a été montré que les cellules de Leydig sont dépendantes de signaux en provenance des cellules de Sertoli puisque l'on observe un blocage de la différenciation des précurseurs des cellules de Leydig adultes et une diminution de l'expression d'enzymes de la stéroïdogénèse dans un modèle de souris qui surexpriment l'AMH (Racine *et al.* 1998). De plus, il a été montré que l'AMH diminue l'activité de l'aromatase, une enzyme nécessaire à la stéroïdogénèse, pendant la période fœtale et prépubère, chez le rat (Rouiller-Fabre *et al.* 1988).

Chez la souris, on observe une phase de différenciation et de prolifération des cellules de Leydig fœtales, accompagnée d'une augmentation de la production de testostérone et des enzymes de la stéroïdogénèse, entre le 13^{ème} et le 18^{ème} jour de gestation (O'shaughnessy *et al.* 1998). Cette phase de prolifération est suivie d'une phase de régression pendant laquelle la production de testostérone et des enzymes de la stéroïdogénèse diminuent (O'shaughnessy *et al.* 1998). Bien

que la phase de régression débute en fin de gestation, la population de cellules de Leydig adultes n'apparaît pas avant 11-12 jours après la naissance chez le rat. De plus, cette population de cellules de Leydig ne provient pas des cellules de Leydig fœtales, mais trouve son origine dans des cellules souches non différenciées (Habert *et al.* 2001)..

Fonctions principales dans le testicule

La fonction principale des cellules de Leydig est la production de testostérone à partir du cholestérol, à travers une série de réactions enzymatiques. Chez l'humain et les primates, il existe 3 populations de cellules de Leydig : une population fœtale, une population infantile et une population adulte. Chez les autres mammifères étudiés, dont les rongeurs, seules les populations de cellules de Leydig fœtales et adultes sont présentes (Griswold *et al.* 2009). Les cellules de Leydig fœtales vont produire la testostérone et participer à sa conversion en dihydrotestostérone afin de masculiniser le tractus génital mâle. Les cellules de Leydig adultes vont quant à elles produire la testostérone nécessaire à la spermatogénèse et au maintien des caractères sexuels secondaires (Habert *et al.* 2001).

Régulation des fonctions des cellules de Leydig

La différenciation et les fonctions des cellules de Leydig peuvent être altérées par différents facteurs et agir au niveau de la production de testostérone ou des fonctions stéroïdogéniques. Ainsi, les cellules de Leydig sont sensibles à l'AMH pendant la période de développement fœtal (Rouiller-Fabre *et al.* 1998) ainsi qu'à l'âge adulte (Racine *et al.* 1998). Il a également été montré que les cellules de Leydig pouvaient être régulées par les stéroïdes puisque ces cellules expriment les récepteurs aux œstrogènes (ESR1 et ESR2) et aux androgènes (Rouiller-Fabre *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2002). Dans des modèles de souris ESR1-KO et ESR2-KO, il a été montré qu'une inactivation d'ESR2 n'affecte pas le nombre et l'activité des cellules de Leydig (Delbès *et al.* 2004) alors qu'une inactivation d'ESR1 augmente la production de testostérone (Delbès *et al.* 2005), suggérant un rôle d'ESR1 dans la stéroïdogénèse. Dans des modèles de souris adultes SCARKO et ARKO, une diminution du nombre de cellules de Leydig et une expression anormale de marqueurs des cellules de Leydig ont été observées (De Gendt *et al.* 2005). En comparant ces deux modèles, les auteurs ont également montré que les défauts observés seraient en partie dépendants de l'action des androgènes sur les cellules de Sertoli (De Gendt *et al.* 2005). Cependant, dans des fœtus de souris Tfm, aucune différence dans l'expression de quatre gènes

impliqués dans la stéroïdogénèse n'a été observé comparé aux souris témoins (Merlet *et al.* 2007a). Cela suggère donc que les fonctions stéroïdogéniques des cellules de Leydig fœtales ne sont pas dépendantes des androgènes.

Des études ont montré l'impact de certaines molécules endogènes et exogènes sur la production de testostérone pendant la vie fœtale et à l'âge adulte. Par exemple, de fortes concentrations d'acide rétinoïque ou de 17 β -estradiol ont un impact négatif sur la production de testostérone pendant la vie fœtale (Livera *et al.* 2000; Delbès *et al.* 2007). Certains PE comme le benzo[a]pyrène ou le diéthylstilbestrol semblent également diminuer la production de testostérone dans les cellules de Leydig pendant la période fœtale (Delbès *et al.* 2007) et à l'âge adulte (Oh 2014).

La présence d'ESR1 et d'ESR2 dans les cellules de Leydig font donc de ces cellules des cibles directes des molécules à caractère oestrogénique endogènes et exogènes.

1.1.4 Les autres types cellulaires somatiques du testicule

Les cellules périlitubulaires

Les cellules périlitubulaires sont une classe de cellules myoïdes qui entourent les tubules séminifères dans le testicule (Figure 1.1.1). Ces cellules contiennent de nombreux filaments d'actine qui leur donnent leur forme caractéristique. Ces cellules ont des propriétés contractiles et sont notamment impliquées dans le transport des spermatozoïdes et des fluides dans le testicule (Maekawa *et al.* 1996). Récemment, il a été montré que le maintien du phénotype des cellules périlitubulaires était dépendant des cellules de Sertoli (Rebourcet *et al.* 2014), suggérant une communication active entre ces deux types cellulaires. Les cellules périlitubulaires, en collaboration avec les cellules de Sertoli, sont également impliquées dans la formation de la matrice extracellulaire qui compose le compartiment interstitiel du testicule (Tung *et al.* 1984) De plus, les cellules périlitubulaires influencent le microenvironnement de la niche spermatogoniale et participent au maintien des SSCs (Chen *et al.* 2014, Oatley *et al.* 2009).

Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales constituent la couche de cellules la plus interne des vaisseaux sanguins. Lors de l'embryogénèse, des cellules endothéliales migrent jusqu'à la gonade en formation et permettent la vascularisation de l'organe, nécessaire à son développement et à son maintien à l'âge adulte. Il a notamment été montré que cette migration et l'organisation vasculaire associée étaient indispensables à la formation des cordons testiculaires pendant la vie fœtale (Combes *et al.* 2008).

Les macrophages

Certaines cellules du système immunitaire peuvent être retrouvées dans le compartiment interstitiel du testicule. Ainsi, des cellules dendritiques, des macrophages, des cellules T et des cellules NK ont déjà été observées dans des testicules de rats adultes (Pérez *et al.* 2013). Pendant la période fœtale, il est déjà possible d'observer des macrophages à partir du 19^{ème} jour de gestation chez le rat grâce à l'expression de marqueurs spécifiques comme ED1, ED2 et OX-42 (Hutson 1990). Dans le testicule, on retrouve deux populations de macrophages : une population anti-inflammatoire, qui contribue à l'immunosuppression du testicule, et une population pro-inflammatoire qui aurait un rôle pendant l'inflammation systémique (Winnall *et al.* 2013). Ces différentes populations sont impliquées dans la maintenance du privilège immunitaire du testicule, un phénomène permettant d'éviter une réponse du système immunitaire envers les gamètes mâles, qui sont hautement antigénique (Meinhardt *et al.* 2011).

1.1.5 La lignée germinale

Origine et migration

Chez les mammifères, les cellules germinales sont à l'origine de nouveaux organismes et assurent la perpétuation des informations génétiques et épigénétiques à travers les générations. Les cellules germinales trouvent leur origine pendant la vie embryonnaire. Dès le 6^{ème} jour de gestation chez la souris, on voit apparaître les précurseurs des cellules germinales primordiales (PGC) dans l'épiblaste proximal (Lawson *et al.* 1994). D'origine extra-embryonnaire, les cellules germinales primordiales appartiennent à une population de cellules capables de générer à la fois

la lignée germinale mâle et la lignée germinale femelle. La description de l'origine et de la migration des PGCs chez la souris a été montrée pour la première fois par Chiquoine, en 1954. Ces cellules sont observées dans l'endoderme du sac vitellin à la base de l'allantois au 10^{ème} de gestation chez le rat (Kemper *et al.* 1987) et au 8^{ème} jour de gestation chez la souris (Chiquoine 1954), d'où elles migreront à travers le tube digestif jusqu'aux crêtes génitales (Figure 1.1.3). Chez la souris, ces cellules sont identifiées par l'expression de *Blimp1*, *Prdm1* et *Prdm14*, des gènes impliqués dans la différenciation en PGCs (Nikolic *et al.* 2016).

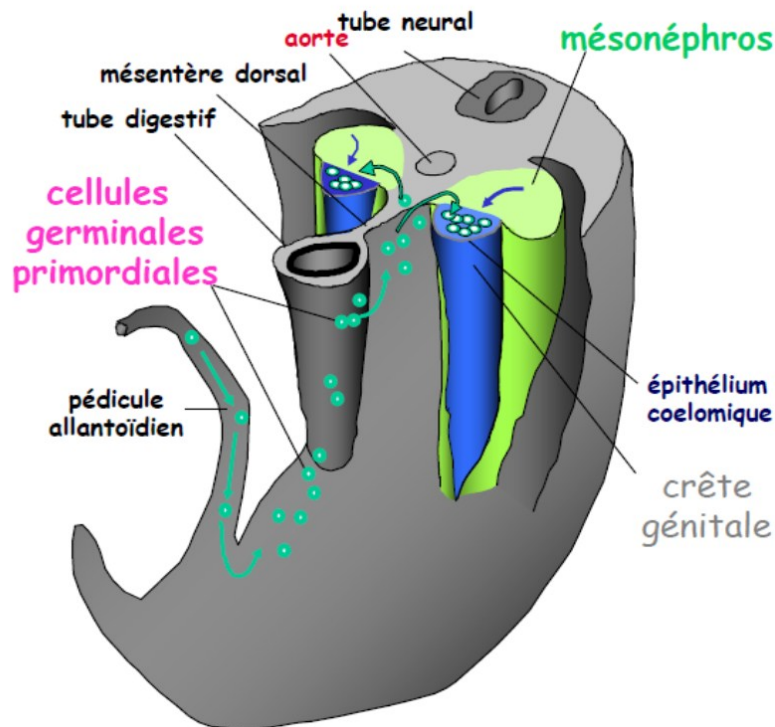


Figure 1.1.3 Migration des cellules germinales primordiales dans la gonade primordiale. D'après Rouiller-Fabre *et al.* 2003

Évolution pendant la vie foetale

Les PGCs vont migrer à l'intérieur du mésoderme extra-embryonnaire, à la base de l'allantoïde, pour aller jusqu'à la crête génitale (Zhao *et al.* 2002). Les cellules germinales ayant migrées dans la gonade sous l'effet du Steel factor (SCF), sont alors appelées gonocytes. Chez le rat, les gonocytes s'établissent dans la gonade à partir de 13 dpc (Culty 2009) et s'engagent dans le développement mâle ou femelle en réponse à leur environnement somatique. Chez le mâle, cet

environnement est établi par les cellules de Sertoli (Barrionuevo et al. 2011). Morphologiquement, les gonocytes sont de forme ronde, avec un noyau proéminent, et sont localisés au centre des cordons séminifères (Baillie 1964). Les gonocytes représentent un stade de développement unique dans la lignée des cellules germinales mâles et subissent une succession de phases de développement : une phase mitotique et une phase de transition et ce, aussi bien chez l'humain que chez les rongeurs (Wartenberg et al. 1976; Vergouwen et al. 1991). La phase mitotique se déroule entre le 13^{ème} et le 18^{ème} jour de gestation chez le rat (Figure 1.1.5). Les gonocytes resteront par la suite quiescents jusqu'à 3 jours après la naissance. Enfin, les gonocytes vont reprendre leur division cellulaire pendant 2 jours (entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour de gestation chez le rat) et migreront jusqu'à la membrane basale pour se différencier en cellules souches spermatogoniales (Figure 1.1.5) (Culty 2009). Il

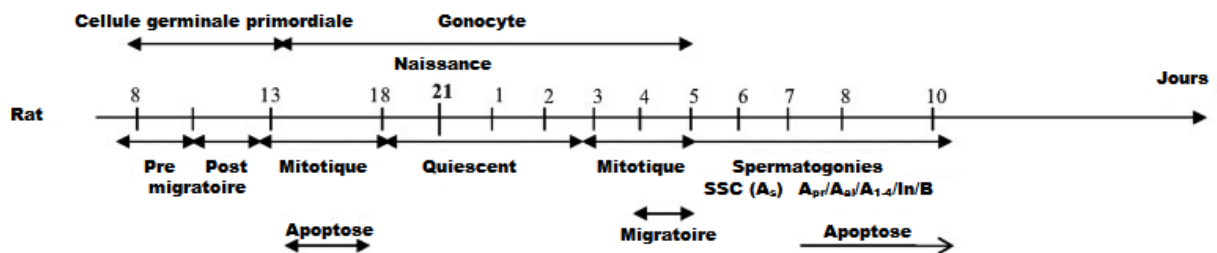


Figure 1.1.4 Chronologie du développement des gonocytes chez le rat. Adapté de Culty et al. 2009

a été montré qu'il existe des différences entre les populations de gonocytes fœtaux et néonataux. En effet, dans une étude sur le transcriptome de gonocytes fœtaux et néonataux de souris, il a été montré qu'un groupe de 37 gènes incluant les marqueurs des cellules germinales Nanog et Oct4 était préférentiellement ou spécifiquement exprimés dans les testicules fœtaux, tandis que 143 gènes étaient fortement exprimés dans les testicules néonataux (Rolland et al. 2011). De plus, grâce à un modèle de culture organotypique chez le rat, il a été montré que ces deux populations avaient différentes réponses à une supplémentation du milieu en acide rétinoïque (Livera et al. 2000). Ainsi, dans des testicules explantés à 14,5 dpc, bien qu'une augmentation de la prolifération des gonocytes fût observée, le nombre total de gonocytes a diminué en réponse à une augmentation importante de l'apoptose. Cependant, dans des testicules explantés à 3 jours après la naissance (*days post partum*, dpp) la supplémentation en acide rétinoïque a augmenté le nombre total de gonocytes et n'a pas eu d'effet sur l'apoptose (Livera et al. 2000). Il

a également été montré dans un modèle de culture *in vitro* qu'une exposition à de fortes concentrations en 17 β -estradiol et en diéthylstilbestrol diminue le nombre de gonocytes lorsque ces derniers sont prélevés à 16,5 dpc, mais pas lorsqu'ils sont prélevés à 3 dpp (Delbès *et al.* 2007).

Les cellules souches spermatogoniales et établissement de la spermatogénèse

Les cellules souches spermatogoniales (SSC) sont dérivées d'une portion de la population des gonocytes différenciés puisqu'il a été montré que certains gonocytes donnaient directement naissance à des spermatogonies différenciées (Yoshida *et al.* 2006). Ces cellules vont être à l'origine de la spermatogénèse et assurer un apport continu de cellules différenciées grâce à leur capacité d'auto-renouvellement.

Régulation de la prolifération des gonocytes

Les gonocytes sont seulement présents durant la période de développement périnatale du testicule et sont critiques pour le devenir des cellules germinales. Pendant leur phase mitotique foétale, les gonocytes sont très sensibles aux androgènes et cette période est décrite comme « la phase de programmation aux androgènes » (Welsh *et al.* 2008). L'action des androgènes sur les gonocytes serait cependant indirecte et médiée par les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli (Sharpe 2001; van den Driesche *et al.* 2017). Il a par ailleurs été montré que la testostérone avait un effet inhibiteur sur la prolifération des gonocytes foetaux dans un modèle de souris féminisé et dans un modèle de culture organotypique (Merlet *et al.* 2007b). La différenciation sexuelle mâle dépendrait donc de façon critique de l'action des androgènes et un ratio non balancé d'androgène/œstrogènes, pourrait la perturber (Sultan *et al.* 2001). On sait également que les œstrogènes endogènes ont un rôle prépondérant dans la régulation de la fonction du testicule (Akingbemi 2005) et que les cellules germinales expriment ESR2 (Saunders *et al.* 1998). Chez des rats âgés de 3 jours, il a été montré que le platelet-derived growth factor et le 17 β -estradiol stimule la prolifération des gonocytes de manière dose-dépendante (Li *et al.* 1997). Dans un modèle de souris ESR2-KO, il a été montré que l'inactivation d'ESR2 induit une augmentation du nombre de gonocytes néonataux par 50% alors que le nombre de cellules de Sertoli et de cellules de Leydig ainsi que la production de testostérone restent inchangés (Delbès *et al.* 2004). Ceci suggère ainsi que les œstrogènes agissent directement sur les gonocytes. Des études ont montré que la phase mitotique des gonocytes foetaux est particulièrement sensible à certains PE. Ainsi,

une exposition aux œstrogènes induit une diminution du nombre de gonocytes dans des testicules explantés entre le 14^{ème} et le 16^{ème} jour de gestation chez le rat (Lassurguère et al. 2003, Delbès et al. 2007). Cet effet n'est cependant pas observé *in vitro* dans des testicules explantés à 3 dpp exposés aux œstrogènes (Delbès *et al.* 2007).

L'action des œstrogènes sur les gonocytes fœtaux, possiblement via ESR2, suggère que ces cellules sont bien sensibles à ces molécules et qu'elles sont ainsi des cibles potentielles des PE.

1.2 Les perturbateurs endocriniens et la fertilité masculine

1.2.1 Introduction

Depuis les 50 dernières années, on observe une augmentation des troubles de l'appareil reproducteur mâle caractérisés par une augmentation de l'incidence du cancer du testicule (Shanmugalingam *et al.* 2013), une diminution de la qualité du sperme et du compte spermatique (Carlsen *et al.* 1992 ; Roland *et al.* 2013; Centola *et al.* 2016) ainsi qu'une augmentation de l'incidence du cryptorchidisme, la non descente des testicules, et de l'hypospadias, un défaut de fusion de l'urètre (Skakkebaek *et al.* 2001). En 1993, Sharpe *et al.* ont posé l'hypothèse que ces anomalies sont dues à une perturbation du développement et du fonctionnement du testicule périnatal en réponse à des composés oestrogéniques (Sharpe *et al.* 1993).

1.2.2 Les perturbateurs endocriniens

Définition

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), un PE est défini comme « une substance ou une mixture exogène qui altère les fonctions du système endocrinien et qui entraîne par conséquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou de sa descendance » (WHO, 2013). Les PE sont des composés qui peuvent ainsi interagir avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison ou l'élimination des hormones qui sont responsables du maintien de l'homéostasie, du développement, du comportement et/ou des fonctions de reproduction (Kabir *et al.* 2015; Kavlock *et al.* 1996).

Origine et structure

Les PE appartiennent à un groupe de molécules très hétérogènes. Les PE peuvent être classés de deux façons différentes (Kabir *et al.* 2015) :

1. Selon leur origine naturelle ou synthétique :

- Les PE d'origine naturelle
 - Composés chimiques retrouvés dans la nourriture (ex : les phytoestrogènes comme la génistéine et le coumestrol)
- Les PE d'origine synthétique
 - Composés chimiques retrouvés dans les solvants industriels, les lubrifiants et leur sous-produits (ex : biphényles polychlorés -BPCs-, les biphényles polybromés ou -PBBs- et les dioxines)
 - Composés chimiques retrouvés dans les plastiques (ex : bisphénol A - BPA, phtalates)
 - Composés chimiques retrouvés dans les pesticides (ex : dichlorodiphényltrichloroéthane -DDT-)
 - Composés chimiques retrouvés dans les fongicides (ex : vinclozoline)
 - Composés chimiques retrouvés dans certains produits pharmaceutiques (ex : l'éthinylestradiol -EE2- et le diéthylstilbestrol -DES-)

2. Selon leur source :

- Hormones naturelles et artificielles (ex : phytoestrogènes, Oméga-3, et pilule contraceptive -éthinylestradiol-)
- Médicaments avec des effets secondaires sur les hormones (ex : EE2)
- Composés chimiques retrouvés au niveau domestique et industriel (ex : phtalates, retardateurs de flammes, plastifiants, solvants, 1,4 dichloro-benzène et les biphényles polychlorés)

Les PE peuvent exercer leurs effets sur l'organisme via différents mécanismes d'action. L'antagonisme et l'agonisme au niveau des récepteurs aux stéroïdes sont les plus courants d'entre eux. Certains PE vont se lier aux récepteurs des hormones endogènes comme les récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes (Yang *et al.* 2015). Ceci pourrait être expliqué par le fait que certains PE ont une structure chimique proche du composé qu'ils miment comme on

peut le voir sur la figure 1.2.1. Il existe en effet des caractéristiques structurales qui peuvent indiquer des activités oestrogéniques, androgéniques ou thyroïdiennes (WHO 2013). De plus, les PE peuvent également avoir des effets sur le bon fonctionnement des enzymes et le transport des protéines (Wuttke *et al.* 2010).

Présence dans l'environnement

Les PE sont présents dans notre environnement à tous les niveaux puisqu'on les retrouve dans les sols, l'eau et dans l'atmosphère. Par exemple, dans la région de Heibei, en Chine, certains PE (Bisphénol A, nonylphénol, triclosan etc.) ont été retrouvés en grande quantité dans des sols irrigués par des eaux usées (Chen *et al.* 2011). Dans la région des montagnes de la Sierra Nevada en Californie (USA), Lyons *et al.* (2014) ont observé de hautes concentrations en nonylphénol dans l'eau de surface, la neige et dans l'atmosphère. Ce composé est un produit de dégradation du nonylphénol polyéthoxylé, une substance utilisée dans la composition de certains pesticides et peut se retrouver ainsi dans l'environnement après pulvérisation (Lyons *et al.* 2014). Au Portugal, dans l'estuaire de la rivière Mondego, des composés à caractère oestrogénique comme le 17 β -oestradiol, le 17 α -éthynilestradiol, le bisphénol A et le nonylphénol ont été retrouvés dans l'eau (Rocha *et al.* 2014). En Ontario, au Canada, une étude sur des tortues serpentes a mesuré des concentrations en pesticides organochlorés plus élevées dans ces animaux dans des lacs contaminés par l'industrie et les stations d'épuration environnantes en comparaison à des lacs non ou moyennement pollués (De Solla *et al.* 1998). Dans les sites contaminés, des anomalies des systèmes reproducteurs mâle et femelle ont été observées, suggérant que ces contaminants environnementaux pourraient affecter les tortues serpentes (de Solla *et al.* 1998). Au Québec, au Canada, des dysfonctionnements du système reproducteur mâle chez les menés à tâches noires se trouvant dans certaines portions du fleuve Saint-Laurent contaminées par des composés oestrogéniques ont été observés (Aravindakshan *et al.* 2004). En plus d'être retrouvés dans l'environnement et dans la faune sauvage, les PE sont également présents chez l'homme. Par exemple, des études réalisées en Australie (Toms *et al.* 2012), Italie (Alivernini *et al.* 2011), Allemagne (Hoopmann *et al.* 2012) ou encore au États-unis (Turyk *et al.* 2010) ont montré la présence de polybromodiphényléthers (PBDEs) et/ou de BPCs dans le lait maternel et/ou le sang des individus testés. De même, le bisphénol A, un PE à caractère oestrogénique est également retrouvé dans le sérum de femmes enceintes et dans le lait maternel (Schönfelder *et al.* 2002 ; Kuruto-Niwa *et al.* 2007) ainsi que le cordon ombilical, le placenta (Schonfelder *et al.* 2002) et dans le foie fœtal (Nahar *et al.* 2013),), indiquant une

exposition du fœtus en développement à ce composé. De plus, diverses concentrations en BPA ont également été retrouvés dans l'urine d'adultes et d'enfants testés dans deux études indépendantes (Calafat *et al.* 2008 ; Braun *et al.* 2011). De plus, des concentrations variées de phtalates, un autre groupe de PE, ont été retrouvées dans le cordon ombilical et le sang maternel (Lin *et al.* 2008) ainsi que dans l'urine d'enfants hospitalisés (Strommen *et al.* 2016). Dans une étude réalisée au Japon entre 2002 et 2005 sur des femmes enceintes, il a été montré qu'une exposition prénatale au di(2-ethylhexyl) phthalate, un PE, est associée avec des niveaux réduits d'oestradiol, de testostérone, de progestérone et d'inhibine B dans le sang fœtal (Akari *et al.* 2014). En Suède, les niveaux de diisononyl phtalate, un remplaçant potentiel du di(2-ethylhexyl) phthalate, présents dans l'urine de jeunes enfants sont associés avec une diminution de la distance ano-génitale ; une distance ano-génitale plus courte étant un possible indicateur de défauts du système reproducteur mâle (Bornehag *et al.* 2015). Ces études sont des exemples parmi tant d'autres qui démontrent la présence des PE à différents niveaux, aussi bien dans l'environnement que dans la faune sauvage et l'homme.

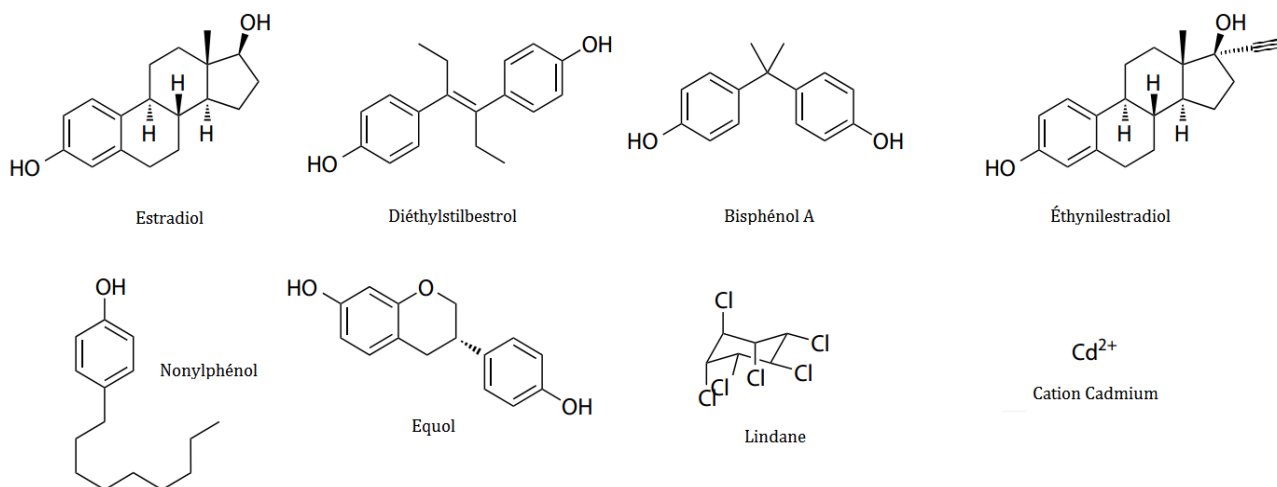
Système de régulation au Canada

Au Canada, la régulation concernant les PE est actuellement assujettie aux termes de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement de 1999 (LCPE). Sous ces termes, l'Initiative de recherche sur les substances toxiques (TSRI) a vu le jour en 2000. Sous la supervision d'un comité composé de scientifiques gouvernementaux et non gouvernementaux, ce fond d'investissement participe à l'avancée de la recherche dans différents domaines, incluant les effets de substances toxiques qui perturbent le système hormonal. En 1995, la loi sur les produits antiparasitaires (PCPA) est établie par la toute nouvelle Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (PMRA). Cette loi stipule que tous les pesticides importés, manufacturés, utilisés ou vendus au Canada doivent être enregistrés au niveau fédéral. Les PE posant un problème pour la santé humaine ne pourront pas être enregistrés. Au niveau international, le Canada et 43 pays européens et Nord-américains sont signataires de plusieurs protocoles visant à résoudre le problème posé par les PE. Le but ultime de ces accords est de réduire les émissions et le relâchement des substances perturbant le système hormonal comme les phtalates, le DDT et les BPCs qui s'accumulent dans l'environnement (Labelle 2000).

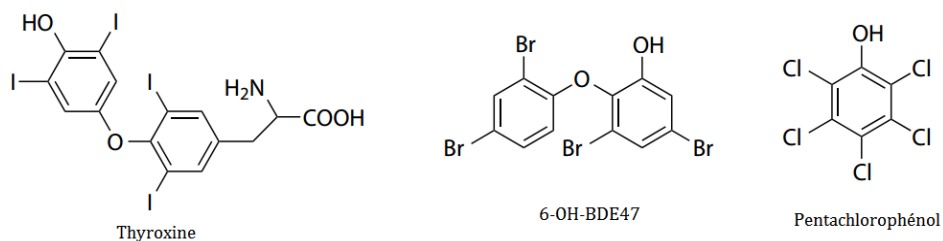
Observations sur les fonctions de reproduction de la faune sauvage

Des altérations des fonctions de reproduction sont observées dans la faune sauvage chez les mâles et les femelles depuis de nombreuses années (WHO 2013). Ces altérations pourraient potentiellement être dues à une exposition de la faune sauvage à des PE. En 1994, Guillette *et al.* ont observé une réduction de la taille des phallus, des changements dans l'organisation de la structure des testicules ainsi qu'une diminution des concentrations de testostérone plasmatique dans des alligators mâles du lac Apopka, en Floride (USA) en comparaison à des alligators du lac Woodruff, un lac témoin (Guillette *et al.* 1994). La pollution dans ce lac est principalement due à des installations agricoles qui y déversent continuellement leurs déchets ainsi qu'à un déversement majeur accidentel de pesticides en 1980. Les alligators sont ainsi exposés à de fortes concentrations en DDT et à ses métabolites, l'un des principaux déchets déversés dans le lac (Guillette *et al.* 1994). En 2006, Sonne *et al.* ont observé un lien entre la concentration en polluants organohalogénés et la taille des testicules chez les ours polaires mâles de l'Est du Groenland (Sonne *et al.* 2006). Dans le Massachussets aux USA, du tissu ovarien a été retrouvé dans certains sternes mâles provenant d'une colonie de Bird Island. Cette anomalie a été associée aux concentrations élevées de BPCs et de dioxines retrouvées dans les œufs de ces oiseaux (Hart *et al.* 1998). Dans certaines rivières qui reçoivent des eaux usées traitées au Royaume-Uni, il a aussi été montré que certains gardons sauvages mâles avaient une croissance des gonades inhibée ainsi qu'une spermatogénèse retardée (Jobling *et al.* 2002). Dans une revue publiée en 2006, Delbès *et al.* ont répertorié les effets de certains PE sur la faune sauvage, aussi bien observé chez des mammifères (panthère et ours) que chez des oiseaux et des poissons (Delbès *et al.* 2006). Ces effets incluent entre autres, une diminution du compte spermatique, une diminution des taux de testostérone, une féminisation des mâles et un dysfonctionnement du développement des gonades (Delbès *et al.* 2006). Ainsi, ces études démontrent des impacts potentiels des PE retrouvés dans l'environnement sur les fonctions de reproduction du mâle, dans différentes espèces animales.

Composés oestrogéniques



Composés thyroïdogéniques



Composés androgéniques

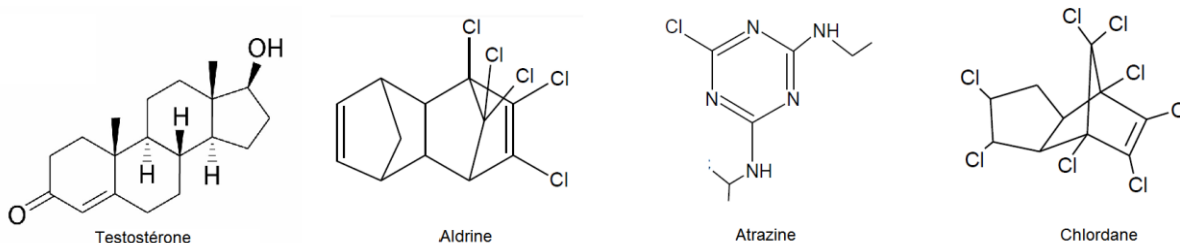


Figure 1.2.1 Structure chimique de quelques composés oestrogéniques, thyroïdogéniques et androgéniques. Noter que l'oestradiol, la thyroxine et la testostérone sont des composés produits naturellement. Noter également la grande variabilité des structures dans une même classe de composés. *Adapté de WHO 2013 et Mnif et al. 2011*

Observations sur la santé humaine et effets suspectés sur la reproduction

L'implication d'un PE sur des altérations des fonctions de reproduction chez l'humain est difficile à prédire. Certains paramètres comme le niveau, le stade développement et la durée de l'exposition sont très difficiles à mesurer et sont difficilement pris en compte dans la plupart des études épidémiologiques chez l'humain. Les modes d'exposition et les mécanismes d'action de certains PE sont bien décrits dans des modèles animaux, mais peuvent ne pas représenter l'exposition humaine. C'est, entre autres, pourquoi l'impact des PE sur la santé humaine est encore controversé à ce jour. Cependant, l'augmentation du nombre de certaines anomalies du système reproducteur mâle depuis les 50 dernières années dans différents pays a été corrélée avec l'augmentation croissante des PE dans l'environnement (Skakkebaek *et al.* 2001). En 1993, Sharpe *et al.* ont proposé de regrouper ces anomalies, soit le cancer du testicule, le cryptorchidisme, l'hypospadias ainsi que la diminution du compte spermatique, sous un même syndrome : le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) (Sharpe *et al.* 1993).

Dans une méta-analyse publiée en 1992, Carlsen *et al.* ont montré une diminution de presque de moitié du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat des hommes, passant de 113×10^6 spermatozoïdes par ml en 1940 à 66×10^6 spermatozoïdes par ml en 1990 (Carlsen *et al.* 1992). Une étude réalisée entre 2003 et 2013 sur des jeunes hommes aux USA a également démontré une légère diminution du compte spermatique et de la motilité des spermatozoïdes (Centola *et al.* 2016). Une étude réalisée entre 1989 et 2005 en France a également démontré une baisse de plus de 30% de la concentration en spermatozoïde, où la concentration moyenne chez un homme de 35 ans est passée de 74 millions de spermatozoïdes/ml en 1989 à 50 millions de spermatozoïdes/ml en 2005 (Rolland *et al.* 2013).

Une augmentation de l'incidence du cancer des testicules a également été observée depuis le milieu des années 1950 (WHO 2013). Dans les régions industrialisées avec une population caucasienne et une forte activité agricole, de très hauts taux de cancers du testicule ont été documentés. En comparaison, dans les populations asiatiques et mixtes (ex : Afro-américains), de plus faibles incidences du cancer des testicules ont été démontrées, suggérant l'implication d'un facteur environnemental et/ou génétique (WHO 2013).

D'autres troubles de l'appareil reproducteur mâle comme le cryptorchidisme et l'hypospadias ont vu leur incidence augmenter durant les 50 dernières années (Skakkebaek *et al.* 2001). Dans la région de Copenhague, la fréquence du cryptorchidisme chez les nouveau-nés était de 1,8% dans les années 1960 contre 8,4% au début des années 2000 (Toppari *et al.* 2010). Par ailleurs, certaines études ont montré que des jeunes garçons exposés à des pesticides pendant la vie

foétale avaient un plus grand risque de cryptorchidisme (Virtanen *et al.* 2012). Dans une méta-analyse de 2014, Botta *et al.* ont conclu que les PE joueraient un rôle critique dans l'établissement de l'hypospadias (Botta *et al.* 2014).

Les modèles d'études des perturbateurs endocriniens sur la reproduction masculine

De plus en plus d'évidences suggèrent que les PE ont un impact sur la santé humaine, et plus particulièrement sur les fonctions de reproduction. Bien que les mécanismes derrière les effets de ces PE soient de mieux en mieux compris, il reste encore beaucoup à faire. Dans les domaines de la toxicologie et de la pharmacologie, il existe de nombreux modèles animaux qui pourraient être utilisés pour combler ce manque de connaissance. En toxicologie, les modèles de rongeurs (souris et rats) sont les plus communs, mais d'autres modèles comme le mouton ou le chien sont également fréquemment utilisés (Hau *et al.* 2011). Cependant, ces modèles sont souvent très coûteux et, avec l'implémentation de principes directeurs pour une utilisation plus éthique des animaux, comme le principe des 3Rs, il n'est pas possible de recourir à une quantité illimitée de spécimens. Décrit pour la première fois en 1959 par Russel et Burch dans « The principles of humane experimental technique », le principe des 3Rs traite de concepts visant une utilisation plus éthique des animaux dans le domaine des sciences (Russel *et al.* 1959). Ce principe a pour but de **remplacer** les modèles animaux dans la mesure du possible, de **réduire** le nombre d'animaux utilisés et de **raffiner** les procédures expérimentales et les conditions d'hébergement pour minimiser la douleur et la détresse des animaux (Olsson *et al.* 2012). Dans cette optique, l'utilisation des modèles *in vitro* en toxicologie est en pleine expansion. Bien que ces modèles ne permettent pas de répliquer complètement toutes les conditions physiologiques retrouvées dans un organisme entier, ils représentent un outil puissant pour cribler la toxicité de milliers de molécules rapidement tout en étant peu coûteux. Ces modèles couvrent en fait une variété de types de culture (culture organotypique, culture primaire et lignées cellulaires) et de types cellulaires (Stanley, 2014), qui possèdent leurs propres avantages et inconvénients. Différents modèles d'étude sont disponibles pour l'étude des testicules fœtaux. La culture organotypique, la culture d'organe à l'extérieur de l'organisme, permet notamment de conserver la structure du tissu et la communication entre les différents types cellulaires présents dans l'organe. Ce modèle est utilisé dans notre laboratoire pour l'étude des xénoestrogènes sur le testicule fœtal et néonatal (Livera *et al.* 2006; Delbès *et al.* 2007; Lassonde *et al.* 2015; Rwigemera *et al.* 2017). La culture primaire offre également la possibilité d'étudier l'interaction de différents types cellulaires dans un modèle *in vitro*, en conservant la communication entre les cellules. Des cultures primaires ont été

déjà établies en utilisant des suspensions de cellules testiculaires fœtales. Cependant, les gonocytes isolés en culture montrent un faible taux de survie (Van den ham *et al.* 1997). En 1997, Li *et al.* ont maintenus des gonocytes néonataux seuls (3 dpp) pendant 48h avec un taux de viabilité supérieur à 90% en présence de 2,5% FBS (Li *et al.* 1997). Les auteurs n'ont cependant pas montré si ce taux de survie était maintenu sur une culture à plus long terme. Lorsque les gonocytes sont mis en culture avec des cellules nourricières (cellules de Sertoli), les taux de survie et de prolifération sont grandement augmentés dans des gonocytes de souris prélevés à 13.5 dpc (Iwahashi *et al.* 2007) et des gonocytes de rats prélevés à 16.5 dpc (Delbès *et al.* 2007). Ce système de co-culture permet aux gonocytes d'avoir accès à des facteurs de survie et de prolifération auxquels ils sont exposés naturellement dans le testicule. Cependant, ce modèle ne permet pas aux cellules de proliférer sur de longues périodes et les gonocytes finissent éventuellement par mourir. Par exemple, Iwahashi *et al.* ont maintenus des gonocytes pendant seulement 6 jours en présence de cellules nourricières et leur nombre était grandement réduit à la fin de la culture (Iwahashi *et al.* 2007). De plus, dans le modèle de co-culture, l'interaction entre les cellules nourricières et les gonocytes ne sont pas et ne peuvent pas être contrôlées. Le modèle de culture primaire et le modèle de co-culture requièrent une attention particulière (substrat, supplémentation en facteurs de croissance etc.) pour leur maintien, et l'optimisation des paramètres de culture est souvent une tâche difficile. Ces modèles nécessitent également de nouveaux prélèvements d'échantillons fréquents sur les animaux.

Au contraire, le modèle de lignées de cellules immortalisées permet virtuellement de maintenir les cellules en culture éternellement. Il existe des lignées de cellules immortalisées provenant des différents types cellulaires du testicule comme par exemple, des lignées de cellules de Sertoli humaines (Wen *et al.* 2017), de rat (Pognan *et al.* 1997) et de souris (Hofmann *et al.* 2003), de cellules de Leydig murines (Mahler *et al.* 1997; Finaz *et al.* 1987) et de rat (Nagpal *et al.* 1994), de cellules péritibulaires de rat (Mather *et al.* 1984) et de souris (Hofmann *et al.* 1992), de spermatogonie de type A et B murines (Hofmann *et al.* 1992; Vecino *et al.* 2001) et de cellules souches spermatogoniales murines (Hoffman *et al.* 2005) et de rat (van Pelt *et al.* 2002), pour ne citer qu'elles. En revanche, il n'existe aucun modèle de cellules germinales fœtales immortalisées. De plus, les cellules germinales fœtales sont sensibles aux PE, mais les mécanismes associés sont encore mal compris. Un modèle de cellules germinales fœtales immortalisées pourrait donc répondre à un besoin grandissant et permettre de tester rapidement l'effet des PE directement sur ces cellules et déterminer les mécanismes sous-jacents.

1.3 Hypothèse et objectifs

Les gonocytes, les cellules germinales fœtales, sont les précurseurs de toute la lignée germinale. Ces cellules passent par des périodes clés de développement qui, si dérégulées, pourraient être à l'origine de l'infertilité masculine. Il a été suggéré que les PE affectent la fertilité masculine, surtout si une exposition survient pendant le développement fœtal. Toutefois, les mécanismes d'action restent mal compris. Ceci pourrait être dû au fait qu'il n'existe actuellement pas de modèle d'étude des gonocytes *in vitro* pour des études à long terme car ils sont difficiles à purifier et survivent mal, seuls en culture.

L'objectif global du projet est donc d'établir une lignée de gonocytes fœtaux de rat qui permettra de mieux comprendre les effets des polluants environnementaux sur les cellules germinales fœtales.

Le premier objectif est d'établir les conditions de culture sans sérum ni cellule de soutien, permettant le meilleur maintien de la morphologie et du taux de prolifération des gonocytes. Le second objectif est d'immortaliser les gonocytes avec le vecteur SV40 antigène grand T. Finalement, le dernier objectif est de caractériser les propriétés cellulaires et moléculaires des lignées cellulaires obtenues.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Les animaux

2.1.1 Les rats

Pour toute la durée de l'étude, des rats Sprague-Dawley de souche **GCS-EGFP** (don du Dr Hammer, Texas SouthWestern Medical Center U., TX, USA) ont été utilisés. Ces animaux ont été produits par Cronkhite *et al.* en 2005 et ont la particularité d'exprimer la GFP spécifiquement dans les cellules germinales mâles et femelles sous le contrôle d'un promoteur ROSA26 (Cronkhite *et al.* 2005). L'expression est initiée dans l'embryon dès le stade 2-cellules tardif et est maintenue dans les cellules germinales primordiales, fœtales et adultes (Cronkhite *et al.* 2005). Pour cette étude, des animaux adultes et des fœtus homozygotes et hétérozygotes pour la GFP ont été utilisés. Les études sur ces animaux ont été conduites en accord avec les lignes directrices établies par le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA), et approuvées par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) du Centre National de Biologie Expérimentale (CNBE) de l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) (Protocole N° : 1405-06).

2.1.2 Les accouplements

Un mâle est placé dans une cage avec deux femelles entre 15h et 17h le jour de l'accouplement. Le lendemain matin, des frottis vaginaux sont réalisés et la présence de spermatozoïdes dans les frottis, détectée sous microscope optique (Zeiss PrimoStar, Allemagne), indique un accouplement réussi. Ce jour est désigné comme 0 dpc.

2.2 Prélèvements des testicules

À 16 dpc, les rattes gestantes sont euthanasiées par asphyxie au CO₂ suivie d'une dislocation cervicale. Les fœtus, toujours dans leur sac amniotique lié au placenta, sont prélevés à partir de la corne utérine de la femelle gestante et déposés sur glace dans une boîte de pétri en verre préalablement refroidie. Les fœtus sont par la suite transférés sous une hotte à flux laminaire (Microzone, Ontario, Canada). Après avoir retiré l'amnios et vidé son contenu, les fœtus sont

disséqués un à un sous loupe binoculaire (Leica M80, Ontario, Canada). Le sexe des fœtus est déterminé par la morphologie des gonades : à 16 dpc, le testicule est moins long et plus large que l'ovaire et possède une veine testiculaire apparente (Figure 2.2.1). Après identification, les testicules sont extraits du fœtus, puis déposés dans de HBSS sans calcium ni magnésium (Gibco™ #14175095) sur glace.

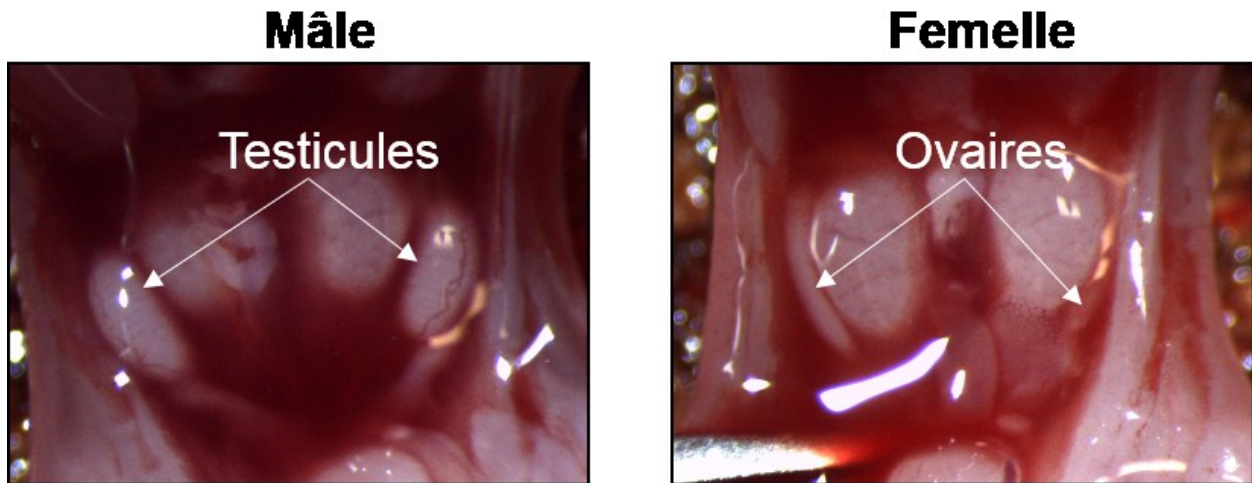


Figure 2.2.1 Différences morphologiques des gonades de fœtus de rat mâle et femelle à 16 dpc.

2.3 Digestion enzymatique

Le protocole débute par une double digestion permettant l'obtention d'une suspension de cellules testiculaire à partir de laquelle les cellules positives pour la GFP pourront être purifiées. Tous les testicules d'une portée, ou plus si nécessaire, sont collectés et plongés dans une solution HBSS contenant 1mg/ml de collagénase (Sigma #C9891) et 0,02 mg/ml DNase (50% glycérol, 0,1 M NaCl, 50 mM chlorure de magnésium, 20 mM Tris pH 7.2, 1mM chlorure de calcium, 20 mg de DNase I (Sigma #D4527) et ddH₂O) pour dissocier les cellules et la matrice de l'interstitium. Après une incubation à 37°C pendant 15 minutes avec agitations périodiques, la suspension cellulaire est diluée en ajoutant 7ml de HBSS. Après centrifugation à 500g pendant 5 minutes, le culot est resuspendu dans une solution de trypsine-EDTA 0,25% (Gibco™ #25200072) supplémentée de 0,02 mg/ml DNase pendant 10 minutes à 37°C avec agitations périodiques afin de dissocier les cellules des cordons testiculaires. Après l'ajout de 1 ml de sérum foetal bovin (FBS, HyClone™ #SH30396.03, Canada), pour inhiber la trypsine, et 5 ml de HBSS, une digestion mécanique par pipetage est effectuée : au moins 15 pipetages avec des cônes 1ml standards sont réalisés, jusqu'à l'obtention d'une suspension cellulaire sans morceau de tissu apparent. Les cellules sont ensuite filtrées (filtre 70 µm, Falcon #352350) afin d'éliminer les amas de cellules. La suspension

de cellules est par la suite centrifugée à 500g pendant 5 minutes et les cellules présentes dans le culot sont resuspendues dans 500 µl de tampon de tri (PBS - Gibco™ #14190144 - supplémenté en EDTA 1mM – Fisher #6381-92-6 - et HEPES 25 mM -Gibco™ #15630080- et FBS 1%), sur glace. Enfin, le nombre de cellules et la viabilité cellulaire sont déterminés avec un hémacymètre par la méthode d'exclusion au bleu de trypan (Sigma #T6146). La suspension cellulaire est ensuite diluée dans du tampon de tri pour obtenir une concentration de cellules à 1-2 millions de cellules/ml.

2.4 Tri cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules sont triées à environ 2500 événements/seconde en fonction de leur taille (FCS), de leur complexité (SSC) et de leur niveau d'expression de la GFP à l'aide d'un FACSJazz (BD Biosciences, San Jose, CA). Les cellules sont excitées par un laser à 488 nm et l'émission de la fluorescence est mesurée en utilisant un filtre 530/40 (FITC/GFP). Les cellules possédant une fluorescence importante pour la GFP sont identifiées comme « GFP-positives » (Figure 3.3.1). Toutes les autres cellules sont identifiées comme « GFP-négatives ». Les cellules GFP-positives et GFP-négatives sont récoltées dans deux tubes différents à fond rond (Falcon #352063) contenant 500 µl de FBS. Après tri, la pureté des fractions GFP-positive et GFP-négative est établie par une analyse au FACS sur 500 à 1000 cellules en évaluant le nombre de cellules GFP-positives dans chaque tube. Enfin, les cellules sont lavées et le nombre et la viabilité cellulaire sont déterminés avec un hémacymètre par la méthode d'exclusion au bleu de trypan. Les cellules GFP-positives sont ensuite mises en culture ou les deux fractions (GFP-positive et GFP-négative) sont culotées et congelées à -80°C pour extraction d'ARN ou d'ADN ultérieures.

2.5 Culture cellulaire

La suspension de cellules GFP-positives est centrifugée à 500g pendant 5 minutes, puis les cellules sont resuspendues dans les différents milieux de culture et sur les différents supports cités plus bas dans des plaques 96 puits Nunclon Delta Surface (ThermoScientific #25382-329) à raison de 30 000 cellules/puits. Les plaques sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂.

2.5.1 Les supports

Laminine

Les puits sont recouverts de 50 µl d'une solution de laminine (Sigma #L2020) à 3 µg/cm² diluée dans du HBSS, puis incubés à 37°C pendant 2 heures, suivi d'un double rinçage à l'HBSS.

Matrigel

Après décongélation à 4°C pendant la nuit, 50 µl de la solution mère de Matrigel (Corning #356234) sont ajoutés à chaque puits. La plaque 96 puits Nunclon Delta Surface est ensuite centrifugée avec une Sorwall LegenRT (ThermoFisher Scientific, Ontario, Canada) à 2000g pendant 2 minutes à 4°C pour permettre au Matrigel de se déposer de façon homogène dans les puits, puis incubée à 37°C pendant 30 minutes.

2.5.2 Les milieux de culture

Les cellules GFP-positives obtenues après tri sont maintenues en culture dans du DMEM (Gibco™ #11965092), du DMEM/F12 (Gibco™ #11039021), du RPMI (Gibco™ #11875085) ou du MEMα (Gibco™ #41061029). L'autofluorescence de ces milieux et le comportement des cellules GFP-positives (intensité de fluorescence et morphologie) sont étudiés par des observations visuelles sur un microscope à fluorescence (Nikon eclipse Ti-s, Ontario, Canada).

2.5.3 Les facteurs de croissance

Le milieu de culture est additionné de bFGF (Gibco™ #13256029) à 2 ng/ml, LIF (Peprotech #AF-300-05) à 20 ng/ml et/ou de SCF à (60 ng/ml).

2.5.4 L'éthynilestradiol

Le milieu de culture additionné de bFGF (2 ng/ml), LIF (20 ng/ml) et SCF (60 ng/ml) est supplémenté avec 0,1 nM, 10 nM ou 1 µM de 17α-éthynilestradiol (Sigma #E4876).

2.6 Mesure de la prolifération cellulaire

La prolifération des cellules en culture est évaluée après 24h par incorporation de 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine en utilisant le Cell proliferation Kit (GE Healthcare #RPN20) et l'anticorps secondaire anti-mouse IgG Alexa Fluor® 594 (New England Biolabs #8890). Dans un premier temps, le milieu de marquage est préparé selon les recommandations du manufacturier : 1 µl de BrdU du kit est ajouté à 124 µl de milieu de culture. Par la suite, 50 µl du milieu de culture sont remplacés par un volume équivalent du milieu de marquage. Après une incubation de 2 heures à 37°C, 100 µl de milieu de culture sont remplacés par 150 µl de liquide fixatif de Bouin (acide picrique 75% dans de l'eau, formol 20% et acide acétique glacial 5%) pendant 15 minutes à température ambiante. Le milieu est par la suite remplacé entièrement par 200 µl du liquide de Bouin, suivie d'une incubation de 20 minutes à température ambiante. Les puits de culture sont rincés 3 fois avec de l'éthanol 70% pendant 3 minutes, suivi de 3 rinçages au PBS de 3 minutes. Les cellules sont par la suite incubées pendant une heure en présence du mélange nucléase/anticorps anti-BrdU (Cell proliferation kit), rincées 3 fois 3 minutes dans du PBS, puis incubées une nouvelle fois pendant 30 minutes à température pièce en présence de l'anticorps secondaire anti-mouse IgG Alexa Fluor® 594 (1:200). Après un dernier rinçage au PBS, les cellules sont recouvertes de 50 µl de liquide de montage contenant du 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Vector Laboratories #H-1200), puis analysées au Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek) avec le logiciel d'analyse Gen5 (Biotek, v 2.0). Le pourcentage de cellules en prolifération (BrdU-positives) est déterminé par un comptage semi-automatique des cellules sur une image fusionnée contenant 16 champs à un grossissement de 20x au centre du puits. Toutes les images sont obtenues selon les paramètres suivants : Red : LED Intensity 10 / Temps d'exposition 232 / Gain 10 et DAPI : LED Intensity 8, / Temps d'exposition 100 / Gain 0. Un masque établi par le logiciel d'analyse Gen5 selon les paramètres prédéfinis dans les deux canaux (rouge et bleu) (Threshold = 7000 ; Min = 5 ; Max = 40 ; Include side object = ON), permet d'établir le nombre de cellules présentes sur chaque image (Figure 2.7.1). Le pourcentage de prolifération cellulaire est par la suite déterminé en mesurant le ratio du nombre de cellules BrdU-positives en rouge, sur le nombre de cellules totales en bleu à raison de 65 à 370 cellules totales/image fusionnée.

2.7 **Mesure de la viabilité cellulaire**

La viabilité des cellules en culture est mesurée après 24h de culture en utilisant le kit commercial Ready Probes Cell Viability Imaging kit Blue Red (ThermoFisher #R37610). Ce kit comprend un réactif contenant de l'iodure de propidium (PI), un marqueur des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (cellules mortes), et un réactif contenant du DAPI. Le marquage des cellules en culture est réalisé en suivant les recommandations du manufacturier. Le pourcentage de mortalité des cellules est déterminé comme décrit précédemment pour la prolifération, par un comptage semi-automatique des cellules avec le Cytation 5. Le pourcentage de mortalité est déterminé en mesurant le ratio du nombre de cellules marquées au PI en rouge, sur le nombre de cellules totales en bleu, avec un nombre total de cellules variant de 120 à 610 cellules/image fusionnée et les mêmes paramètres que ceux établis pour la mesure de la prolifération cellulaire.

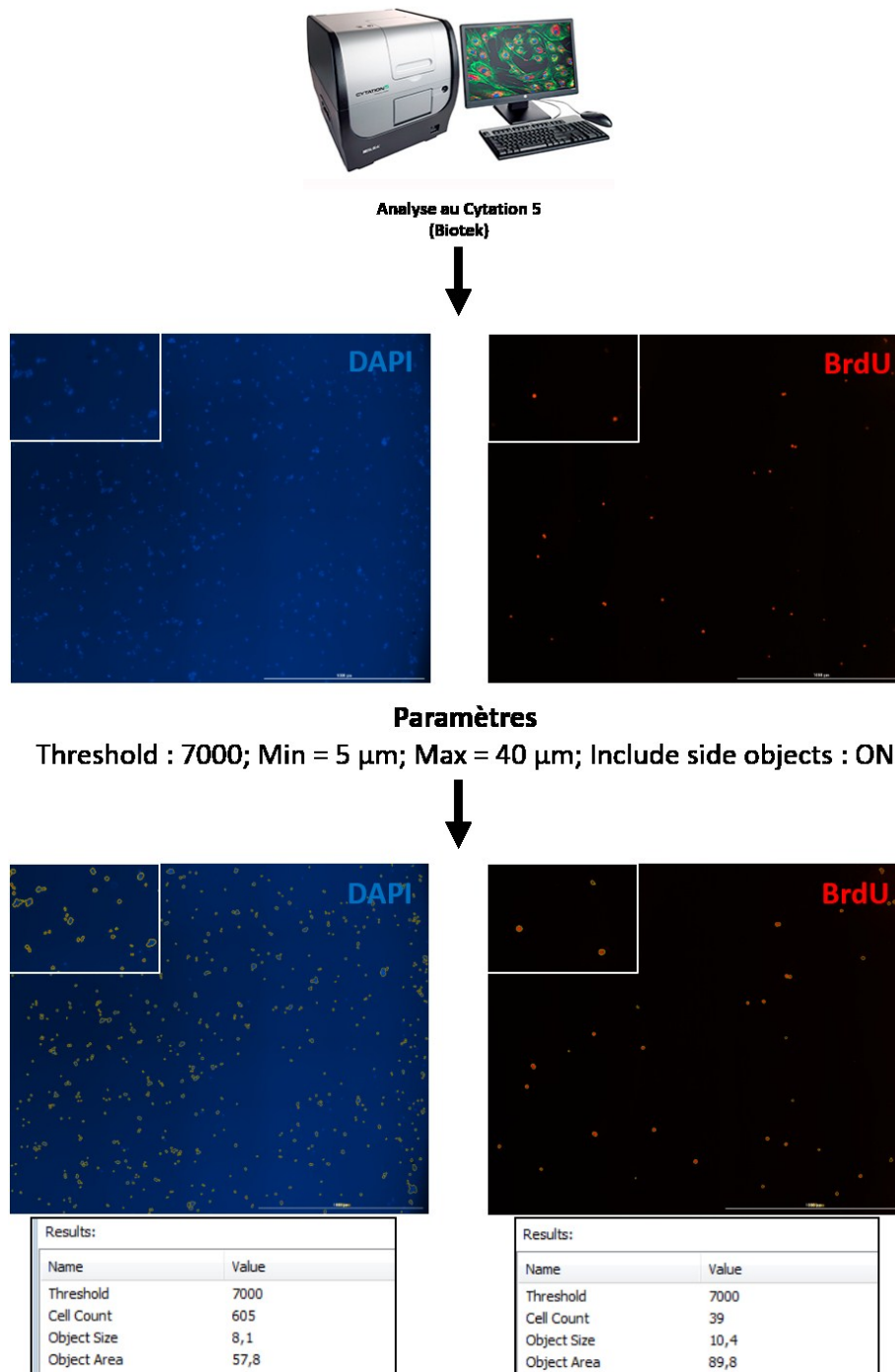


Figure 2.7.1 Analyse du pourcentage de cellules BrdU-positives selon un comptage semi-automatique au Cytation5. Après marquage au BrdU et au DAPI, les cellules GFP-positives sont analysées avec le Cytation5, un lecteur multi-mode et son logiciel associé, Gen5. Après établissement des paramètres d'analyse, un masque automatique est établi par Gen5 sur les cellules marquées. Les résultats sont par la suite présentés sous forme de valeurs déterminées par le logiciel et le nombre de cellules totales comptées (Cell Count) est pris en considération. Échelle : 1000 µm.

2.8 Transfection et immortalisation

2.8.1 Transfection

Nous avons voulu tester la capacité de transfection des cellules GFP-positives en utilisant un plasmide témoin contenant le gène de la mCherry (pmCherry-C1, don du Dr Lefrançois, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec). Cela nous permet de compter les cellules transfectées qui deviennent rouges sous le microscope à fluorescence. Nous avons combiné ce plasmide à divers agents de transfection : Lipofectamine 3000 (Invitrogen LifeTechnologies #L3000001), TransIT® (Mirus, X2 #MIR6003, LT1 #MIR2304 et 2020 #MIR5404), et JetPRIME (Polypus-transfection #114-01) ou Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen LifeTechnologies #13778030), selon les recommandations du fabricant, après 4 à 24 heures de culture. Des observations ont été réalisées à partir de 24 heures de culture jusqu'à disparition du signal dans les puits. Un taux de transfection est déterminé après 48 heures de culture par un comptage de 39 à 207 cellules/images (3 images par puit) en mesurant le nombre de cellules mCherry-positives, en rouge, sur le nombre de cellules total, semi-transparentes sur fond clair. Les images ont été obtenues avec un microscope inversé Nikon eclipse Ti-S (Mississauga, Ontario, Canada), la caméra Nikon Ds RiS (Mississauga, Ontario, Canada) et le logiciel Nis Element D4.30 selon les paramètres suivants : Fond clair : Temps d'exposition = 90 ms / Gain = 4X et TRITC : Temps d'exposition = 400 ms / Gain = 4X.

2.8.2 Immortalisation

L'immortalisation des cellules est réalisée avec un plasmide pRRLsin-SV40 T antigène-IRES-mCherry (Addgene plasmid #58993; Holczbauer et al 2013) 24h après ensemencement avec la Lipofectamine 3000 à 1,5%, la Lipofectamine RNAiMax, le JetPrime et TransIT® selon les recommandations du fabricant.

2.8.3 Passages et doubling time

Afin de maintenir une culture continue des lignées obtenues, les cellules sont passées après avoir atteint 70-80% de confluence. Dans un premier temps, le milieu de culture est retiré et remplacé par 50 µl d'une solution de trypsine-EDTA 0,25% pendant 5 minutes à température ambiante afin de remettre les cellules en suspension. Après l'ajout de 10 µl de FBS pour inhiber la trypsine et 200

µl de HBSS, une digestion mécanique par pipetage est effectuée : au moins 4 pipetages par puits avec des cônes 200 µl standards sont réalisés. Après rinçage du puits avec 200 µl d'HBSS, la suspension cellulaire est centrifugée à 500g pendant 5 minutes avec une centrifugeuse Sorvall LegenRT et les cellules sont resuspendues dans 500 µl de MEMα sans facteur de croissance. Les cellules sont finalement comptées avec un hémacymètre, diluées dans du MEMα additionné de bFGF et SCF à raison de 4 000 cellules/200 µl/puits dans 5 puits d'une plaque 96 puits Nuclon Delta préalablement enduite de laminine à 3 µg/cm² diluée dans du HBSS. La moitié des cellules restantes est cryoconservée à -150°C dans une solution de DMSO (Sigma #472301) 8% et FBS 20% dans du MEMα à raison de 100 000 cellules minimum/viale de cryoconservation. L'autre moitié est congelée à -80°C à raison de 100 000 cellules minimum/tube pour analyses biomoléculaires ultérieures. À chaque passage, le doubling time des deux lignées est mesuré selon l'équation suivante :

$$\text{Doubling time} = \frac{\log_{10} 2}{\log_{10} \frac{\text{Nombre de cellules après passage}}{\text{Nombre de cellules ensemencées}}} \times \text{Temps de culture}$$

Nombre de cellules après passage : millions de cellules

Nombre de cellules ensemencées : millions de cellules

Temps de culture : heures

2.9 Étude de la morphologie par microscopie électronique

La préparation et l'analyse des cellules est réalisée en collaboration avec le service de microscopie électronique à transmission de l'INRS-IAF. Un total de 1 170 000 cellules de la lignée 1 a été utilisé pour cette étude. Les cellules en culture dans des plaques 96 puits Nuclon Delta sont tout d'abord remises en suspension un traitement avec 50 µl de solution de trypsine-EDTA 0,25% pendant 5 minutes. La trypsine est ensuite neutralisée par l'ajout de 10 µl de FBS 100% et de 200 µl de HBSS. Les puits sont rincés une nouvelle fois avec du HBSS et les cellules sont centrifugées à 2 000 rpm avec une centrifugeuse de paillasse Spectrafuge 16M (Labnet, New Jersey, États-Unis) pendant 10 minutes. Le surnageant est par la suite retiré et le culot est fixé avec une solution de glutaraldéhyde 2,5% pH 7.2. Après avoir été doucement décollé des parois avec un pic en bois, le culot est mis à 4°C pendant la nuit. Après fixation, le culot est rincé par 3 lavages de 30 minutes de tampon cacodylate contenant 3% de saccharose et conservé dans le dernier tampon de lavage à 4°C, jusqu'à l'enrobage. La préparation des couches minces est initialisée par une seconde fixation à l'aide de tétraoxide d'osmium 1.3% dans du tampon collidine.

L'échantillon fixé est ensuite déshydraté par des passages successifs dans des solutions de 25, 50, 75 et 95% d'acétone pendant 15-30 minutes, suivi de 2 bains d'acétone 100% de 30 minutes chaque. Après immersion de l'échantillon dans du Spurr:acétone pendant 16-18 heures, l'échantillon est enrobé par immersion dans 2 bains successifs d'un mélange de SPURR et de résine (10 g de Vinyl cyclohexen dioxide, 6 g de diglycidyl ether de polypropylene glycol, 26g de nonenyl succinic anhydride et 0.4g de diméthylaminoéthanol) pendant 2 heures chacun. Le mélange est par la suite ajouté aux moules correspondants (SPI #1070924), incubé à température ambiante pendant 16-18 heures et placé au four à 60-65°C pendant 20-30 heures afin de polymériser la résine. Les blocs de résine polymérisés sont ensuite découpés avec un ultramicrotome (LKB 2128 Ultratome®). Les coupes minces en résultant sont déposées sur des grilles de cuivre recouvertes de Formvar (Mecalab #8016) et colorées avec de l'acétate d'uramyle dans l'éthanol 50% pendant 20-25 minutes et du citrate de plomb pendant 5-7 minutes. Les coupes minces sont examinées avec un microscope électronique à transmission Hitachi H-7100 (Hitachi High Technologies America), une caméra AMT (Advanced Microscopy Techniques, Massachusetts, USA) et le logiciel Image Capture Engine v600.147 (Advanced Microscopy Techniques, Massachusetts, USA).

2.10 Mesure de l'expression protéique par immunofluorescence

Le marquage par immunofluorescence est réalisé sur les cellules des fractions GFP-positives et GFP-négatives et des lignées 1 et ½. Après avoir atteint une confluence supérieure à 80%, les cellules des lignées obtenues sont fixées dans 200 µl de liquide de Bouin pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules de la fraction GFP-positives et GFP-négatives sontensemencées à raison de 30 000 cellules/puits et fixées 24 heures plus tard dans du liquide de Bouin : 150 µl du milieu de culture sont remplacés par du liquide de Bouin, suivi d'une incubation de 20 minutes à température ambiante. Le milieu est par la suite remplacé au complet par 200 µl de liquide de Bouin, suivi d'une incubation de 15 minutes. Dans tous les puits, après 3 rinçages de 3 minutes d'éthanol 70% suivi de 3 rinçages de 3 minutes de PBS, les cellules sont incubées à température ambiante dans une solution de blocage et perméabilisation (FBS 5%, Triton 0,1% dans du PBS) pendant 30 minutes. Après dilution de l'anticorps primaire (Tableau 2.10.1) dans la solution de blocage, les cellules sont incubées à 4°C pendant la nuit. Suivant un rinçage de 3 fois 3 minutes de PBS, les cellules sont mises en présence de l'anticorps secondaire (Tableau 2.10.1) dilué dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante, dans le noir. Enfin, après 3

rinçages de 3 minutes de PBS, 50 µl de liquide de montage contenant du DAPI sont ajoutés dans le puits contenant les cellules, Enfin, l'expression des marqueurs protéiques est analysée au Cytation5. Les images sont obtenues selon les paramètres suivants : GFP : LED 10 / Temps d'exposition 172 / Gain 10 et DAPI : LED 8, / Temps d'exposition 100 / Gain 0. Le pourcentage de cellules AMH-positives et HSP90-positives dans les fractions GFP-positives et GFP-négatives est déterminé par un comptage d'au moins 74 cellules (n=1) en comparant le nombre de cellules totales (DAPI) sur le nombre de cellules marquées à l'AMH ou à l'HSP90 (GFP).

Tableau 2.10.1 Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la révélation de l'HSP90 et de l'AMH

Protéine	Type	Hôte	Cible	Dilution	Référence	
HSP90	Anticorps primaire	Polyclonal	Souris	HSP90aa humaine	1:1000	BD Biosciences #610419
	Anticorps secondaire	Couplé Alexa fluoro 488	Chèvre	IgG de souris	1:200	LifeTechnologies #A11001
AMH	Anticorps primaire	Polyclonal	Chèvre	AMH humaine	1:50	Santa Cruz #A-11001
	Anticorps secondaire	Couplé Alexa fluoro 488	Poulet	IgG de chèvre	1:200	LifeTechnologies #A21467

2.11 Mesure de la méthylation de l'ADN par pyroséquençage

2.11.1 Extraction d'ADN

Après avoir lentement décongelé les culots de cellules (86 000 cellules minimum) des fractions GFP-positives, GFP-négatives et des lignées obtenues à 4°C et amené à température ambiante, l'ADN est extrait par le biais du kit QIAamp DNA micro de Qiagen (Qiagen, #56304) selon les recommandations du fabricant. L'ADN est quantifié en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) à 260 nm.

2.11.2 Conversion au bisulfite

La conversion au bisulfite est réalisée sur 500 ng d'ADN/échantillon avec le kit EpiTect Fast Bisulfite Conversion (Qiagen, #59824). Dans un premier temps, l'ADN est mis en solution avec le Bisulfite Mix (kit EpiTect Fast Bisulfite Conversion), de l'eau RNase-free et du tampon DNA Protect (kit EpiTect Fast Bisulfite Conversion) selon les recommandations du fabricant. La conversion au bisulfite est effectuée en utilisant un thermocycleur Biometra T3000 (Biometra, Göttingen, Allemagne) selon le programme suivant : première étape de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, suivie d'une incubation de 10 minutes à 60°C, puis d'une seconde dénaturation à 95°C pendant 5 minutes et d'une incubation finale de 10 minutes à 60°C. Pour finir, l'ADN converti au bisulfite est conservé à -20°C.

2.11.3 PCR et Pyroséquençage

Les régions différentiellement méthylées (DMRs) sélectionnées pour *H19* et *Snrpn*, la conception et les séquences des amorces ainsi que les étapes du pyroséquençage sont décrits dans Rwigemera et al. (2017). Le logiciel PyroMark Q24 (Qiagen) a été utilisé pour la conception des amorces des régions d'intérêt (Tableau 2.11.1). Brièvement, 50 à 100 ng d'ADN converti sont amplifiés en utilisant le kit HotStarTaq (Qiagen #203443) avec le thermocycleur Biometra T3000, selon le programme suivant : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 minutes (non répétée), suivie d'une dénaturation de 15 secondes à 95°C, une hybridation de 30 secondes à la température d'hybridation (51°C pour *H19* et 60°C pour *Snrpn*) et enfin, une étape d'extension de 15 secondes à 72°C. Les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'extension ont été répétées 49 fois. Une dernière étape d'extension de 10 minutes à 72°C termine le programme. À partir

d'une réaction de PCR de 50 µl, deux volumes de 24 µl sont utilisés pour le séquençage en duplicata tandis que les 2 µl restants servent à établir l'efficacité de la réaction d'amplification par migration sur gel d'agarose 2%. Une fois vérifiées sur gel, les séquences amplifiées sont séquencées par le biais du kit PyroMark Q24 Advanced (Qiagen, #970922) et la plateforme de travail PyroMark Q24 Vaccum du laboratoire du Dr Sarah Kimmins (McGill University, Montréal, Québec, Canada), selon les recommandations du manufacturier, tel que décrit précédemment (Rwigemera et al. 2017).

Tableau 2.11.1 Gènes et séquences des amorces utilisés pour le pyroséquençage.

Gène	Amorce PCR	Amorce de séquençage
<i>H19</i>	Forward : 5'-GGTTTTAGGTGAT-TTGGGA-TATT-3' Reverse : 5'-ACATTTAAATTTATAAAA-TAATCCCCTTCT-3'	5'-GTTGAATTTTAGTTTTTTTTTATGG-3'
<i>Snrpn</i>	Forward : 5'-TGGTGGTTT-GAGGTTGTTGAT-3' Reverse : 5'-TCCTAAAACCCAAAAACCATTCAATAAC-3'	5'-GGATGTAGGAG-TTATGT-3'

2.12 Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR

2.12.1 Extraction d'ARN

Deux échantillons de 6 testicules chacun prélevés à 16 dpc sont lentement décongelés (-80°C) à 4°C et amenés à température ambiante afin d'en extraire l'ARN avec le kit d'extraction d'ARN RNeasy micro (Qiagen #74004) selon les recommandations du fabricant. Ces échantillons de testicules entiers sont utilisés ici comme témoins positifs pour l'expression des différents marqueurs étudiés en qPCR. L'ARN est quantifié en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 à 260 nm, et conservé à -20°C ou utilisé immédiatement pour transcription inverse.

Après avoir lentement décongelé les culots de cellules congelées (94 000 cellules minimum) des fractions GFP-positives, GFP-négatives, et des lignées obtenues à 4°C, et amené à température ambiante, l'ARN est extrait par le biais du kit d'isolation d'ARN ARCTURUS® Picopure (Applied Biosystems, #KIT0204) selon les recommandations du fabricant. L'ARN est quantifié en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 à 260 nm et conservé à -20°C ou utilisé immédiatement pour transcription inverse.

2.12.2 Transcription inverse et qPCR

La transcription inverse (RT) est réalisée avec le kit qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences #95048-500) selon les recommandations du fabricant et le thermocycleur Biometra T3000. Afin d'établir une courbe standard lors de l'amplification par qPCR, 500ng d'ARN de testicules entiers prélevés à 16 dpc sont rétrotranscrits et des dilutions successives d'ADNc (1:10 ; 1:100; 1:1000) sont réalisées. En raison de limitations de matériel pour les cellules GFP-positives, GFP-négatives et les lignées, 125 ng d'ARN par échantillon sont rétrotranscrits. Les amorces sont générées avec le logiciel en ligne Primer3 Plus à partir de la séquence d'ARNm des gènes de rat (*Rattus*), située dans la banque de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Après génération, les amorces sont hybridées *in silico* avec la fonction « Primer-BLAST » de la base de données de NCBI et la correspondance avec la séquence recherchée est vérifiée. Les amorces sont commandées chez Integrated DNA Technologies (IDT) selon l'option « 25 nmole DNA Oligo ». À la réception, les amorces sont diluées à une concentration de 500 nM dans une solution Tris 10 mM pH 7.5 dans de l'H₂O (Trizma Base, Sigma #T1503), sous une hotte à PCR AirClean A600 (AirClean systems, Caroline du Nord, USA). Les amorces sont par la suite diluées une nouvelle fois à 50 nM, puis à 5 nM dans de l'H₂O RNase free. Les solutions d'amorces

à 5 nM sont utilisées pour les amplifications par qPCR. Les séquences des amorces, la température de fusion (T_m), la taille des produits correspondants et le numéro d'accèsion NCBI se trouvent dans le tableau 2.13.1. Les amplifications par qPCR sont réalisées avec le RotorGene RG-3000A (Corbett Research), le logiciel Rotor-Gene 6, et le Perfecta SYBR Green SuperMix (Quanta Biosciences #95054), selon les recommandations du manufacturier, sur un total de 30 cycles, avec une dénaturation initiale de 10 minutes. Par la suite, chaque cycle comprend une dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, suivie d'une étape d'hybridation au T_m de l'amorce « Reverse » définie par IDT (Tableau 2.13.1) pendant 15 secondes, et enfin, une étape d'extension à 72°C pendant 20 secondes. La contamination à l'ADN génomique lors de l'extraction d'ARN est testée en ajoutant 10 ng d'ARN non rétro-transcrit de chaque échantillon analysé à chaque amplification par qPCR. La taille des produits d'amplification obtenus de testicule entier à 16 dpc (dilution 1:10) a tout d'abord été validée par une migration sur gel d'agarose 2% et comparée avec la taille indiquée par le logiciel Primer3 Plus. La séquence des échantillons est vérifiée au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill par un séquençage de type Sanger avec un 3730cl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Après analyse, les séquences obtenues sont hybridées *in silico* avec la fonction « Nucleotide-BLAST » de la base de données de NCBI et la correspondance avec la séquence recherchée du rat (*Rattus*) est vérifiée. Les ADNc amplifiés des échantillons sont ensuite analysés avec le logiciel Rotor-Gene 6. La valeur du seuil est définie à 0,021 pour tous les échantillons. Le niveau d'expression est exprimé en termes d'expression relative, une valeur calculée selon la formule suivante : Expression relative = $2^{-\Delta Ct}$, où ΔCt correspond au Cycle Threshold (Ct) de la Bêta-actine, un gène de référence, de l'échantillon dont on soustrait la valeur du Ct du gène recherché.

2.13 Statistiques

Les valeurs des données sont exprimées par la moyenne \pm SEM d'au moins 3 réplicats biologiques (n). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Le seuil de signification a été établie à $p < 0,05$. La différence entre les moyennes des pourcentages de prolifération selon la supplémentation en facteurs de croissance a été évaluée avec un test *t* de Student. La différence de la réponse entre les moyennes des doses d'EE2 a été évaluée avec un test ANOVA one-way suivi d'un test de Tukey.

Tableau 2.13.1 Marqueurs des différents types cellulaires du testicule et séquences de leurs amorces associées pour l'étude de l'expression par RT-qPCR. Noter que le vWF a été invalidé par séquençage, la séquence obtenue ne correspondant pas à la séquence attendue.

Type cellulaire	Symbole du gène	Nom du gène	Amorces (5' → 3')	Température de fusion	Taille de l'amplicon	Séquences validées	Numéro d'accession
Germinales	<i>Hsp90a1</i>	Heat shock protein 90, alpha, class A member 1	F : GAGGAAACCCAGACCCCAAGA	56,2	159 pb	Validé par séquençage	NM_175761.2
			R : AGCGTCTGAGGAGTTGGAAA				
	<i>Pou5f1 (Oct4)</i>	POU class 5 homeobox 1	F : ACGAGAAAGATGATGAGGCCG	56,7	250 pb	Validé par séquençage 2	NM_001009178.
			R : TACCTCCCTTCCTTGCCTTG				
Leydig	<i>Cyp11a1</i>	Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1	F : CACGCACCTCCGGTACTTGG	59,8	80 pb	Validé par séquençage	NM_017286.3
			R : CGGATATTTCCAGCTCGCAATCCG				
	<i>36Hsd</i>	3Béta-hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta5-4-isomerase type 4-like	F : ATCTGTTGGAGGCCTGTGTC	55,1	228 pb	Validé par séquençage 2	XM_003749361.
			R : AAGTATGCAATGTGCCACCA				
Sertoli	<i>Amh</i>	Anti-Mullerian hormone	F : CACACCTCTCTGCTGCTG	57,3	250 pb	Validé par séquençage	NM_012902.1
			R : GACTCTTGGACAGCCTCCAG				
Endothéliales	<i>vWF</i>	von Willebrand Factor	F : CTGGCCCTCAAGTACAGAGC	57,9	188 pb	Invalidé par séquençage	NM_053889.1
			R : AGAGGTTCTCTGGCTGGTCA				
Péritubulaires	<i>Acta2</i>	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	F : GAAGAGGAAGACACACAGC	55,8	233 pb	Validé par séquençage	NM_031004.2
			R : TTGGTGATGATGCCGTGTTTC				
Gène de référence	<i>Actb</i>	Actin, beta	F : TCTGTGGATTGGTGGCTCTA	55,4	69 pb	Validé par séquençage	NM_031144
			R : CTGCTTGCTGATCCACATCTG				

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Purification des cellules GFP-positives par cytométrie en flux

Le modèle de rat établi par Cronkhite et *al.* en 2005 (souche eGFP-GCS) permet de purifier et d'isoler les cellules germinales par cytométrie en flux de par leur expression spécifique de la GFP. Lors de la mise au point du tri par cytométrie en flux à différents temps de différenciation des gonocytes, nous avons pu constater une augmentation de l'intensité du signal de la GFP dans chaque cellule avec l'âge qui n'avait jamais été décrite avant (Figure 3.1.1). L'objectif étant de maintenir des gonocytes pendant la période de prolifération fœtale, nous avons réalisé des tris par FACS sur des testicules explantés à 15 et 16 dpc. À 15 dpc, nous obtenons seulement 3600 ± 790 cellules ($n=5$) GFP-positives/testicule. À 16 dpc cependant, nous sommes capables d'obtenir $18\ 000 \pm 1131$ ($n=27$) cellules GFP-positives/testicule avec une fraction de cellules GFP-positives ayant une pureté de $91\% \pm 0,46$ ($n=27$) et une viabilité après tri de $96\% \pm 0,45$ ($n=27$). Cette fraction de cellules GFP-positives représente $19\% \pm 0,68$ ($n=27$) de la population totale de cellules triées à cet âge. De plus, nous obtenons une pureté de $100\% \pm 0$ pour la fraction GFP-négative. Nous avons ainsi continué avec des testicules explantés à 16 dpc seulement.

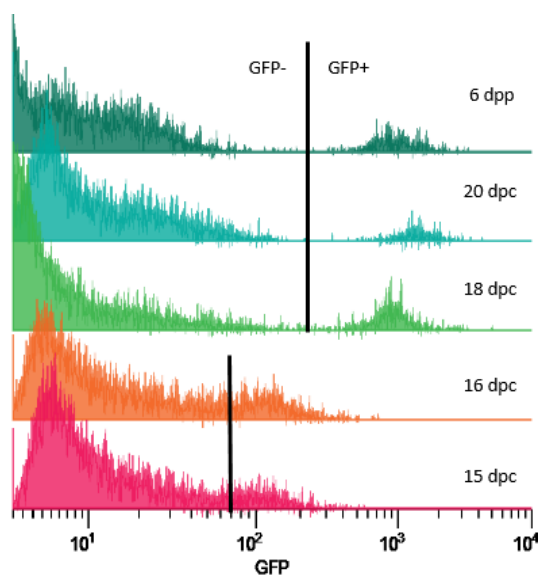


Figure 3.1.1 Évolution de l'intensité du signal de la GFP selon l'âge de prélèvement des testicules. Des suspensions de cellules testiculaires ont été triées par cytométrie en flux lorsque les testicules sont explantés à 15, 16, 18 et 20 dpc et 6 dpp. *Adapté de Delbès G. 2015 (données non publiées).*

3.2 Établissement des conditions de culture pour les cellules GFP-positives

3.2.1 Les milieux de culture

Afin de déterminer les conditions les plus propices à la culture des gonocytes fœtaux, nous avons sélectionné le milieu de culture le plus adapté en comparant l'autofluorescence du milieu ainsi que l'intensité de fluorescence et la morphologie des gonocytes pendant 72h. Nous avons comparé le DMEM, DMEM/F12, RPMI et MEM α (Tableau 3.2.1). Le DMEM et le RPMI présentaient la plus forte autofluorescence de tous, ceci pouvant être dû à la présence de rouge de phénol. Ainsi, dans ces milieux, le signal de la GFP des gonocytes était plus faible rendant l'observation difficile. Parallèlement, bien que le DMEM/F12 ne contienne pas de rouge de phénol, nous avons aussi observé une forte autofluorescence dans ce milieu. De plus, le DMEM/F12 et le RPMI ne permettent pas un maintien suffisant de la morphologie typique (large cellule ronde) des gonocytes. Finalement, le MEM α , sans rouge de phénol, a une autofluorescence faible favorisant l'observation des gonocytes avec un signal de la GFP plus intense. Puisque le MEM α permettait aussi un bon maintien de la morphologie des cellules sur 72h, nous avons choisi ce milieu comme milieu de base pour toutes les mises en culture ultérieures.

Tableau 3.2.1 Autofluorescence des milieux à l'étude et leur impact sur la morphologie et l'intensité de la GFP sur les cellules GFP-positives en culture.

	DMEM	DMEM/F12	RPMI	MEM α
Fluorescence du milieu	+++	+++	++	+
Rouge de phénol	+	-	+	-
Intensité de fluorescence des cellules	+	+	++	+++
Morphologie des cellules	++	+	+	++

3.2.2 Les supports

Nous avons ensuite déterminé le meilleur support de culture pour la culture des gonocytes *in vitro*. Il a en effet été montré que les gonocytes en culture n'adhèrent pas sur le verre ou sur le plastique (van Dissel-Emiliani *et al.* 1993). En revanche, il est possible de maintenir les gonocytes en culture sur une préparation de matrice extracellulaire (Matrigel) ou sur certaines protéines de cette matrice et en particulier la laminine (van Dissel-Emiliani *et al.* 1993 ; Garcia-Castro *et al.* 1997 ; Hasthorpe *et al.* 1999). Nous avons observé l'évolution de la morphologie et de du signal des cellules GFP-positif en culture, pendant 72h, sur laminine et Matrigel (Figure 3.2.1). Après 24h de culture, nous avons observé le maintien de la morphologie typique des gonocytes (larges cellules rondes) aussi bien sur la laminine, que sur le Matrigel. Après 48h de culture, nous avons observé la formation de petits amas cellulaires (Figure 3.2.1, flèches) sur les deux supports, mais cet effet était plus marqué dans le Matrigel. Cependant, après 72h de culture, nous avons vu apparaître une augmentation drastique de la mort cellulaire, confirmée par la présence de débris cellulaires, aussi bien dans la laminine que dans le Matrigel (Figure 3.2.1, astérisques). Concernant l'expression de la GFP, on observe une diminution globale du signal en réponse à l'augmentation de la mort cellulaire avec le temps, aussi bien dans la laminine que dans le Matrigel. Les deux supports semblent ainsi offrir les mêmes conditions de maintien sans que l'un ne soit avantageux par rapport à l'autre.

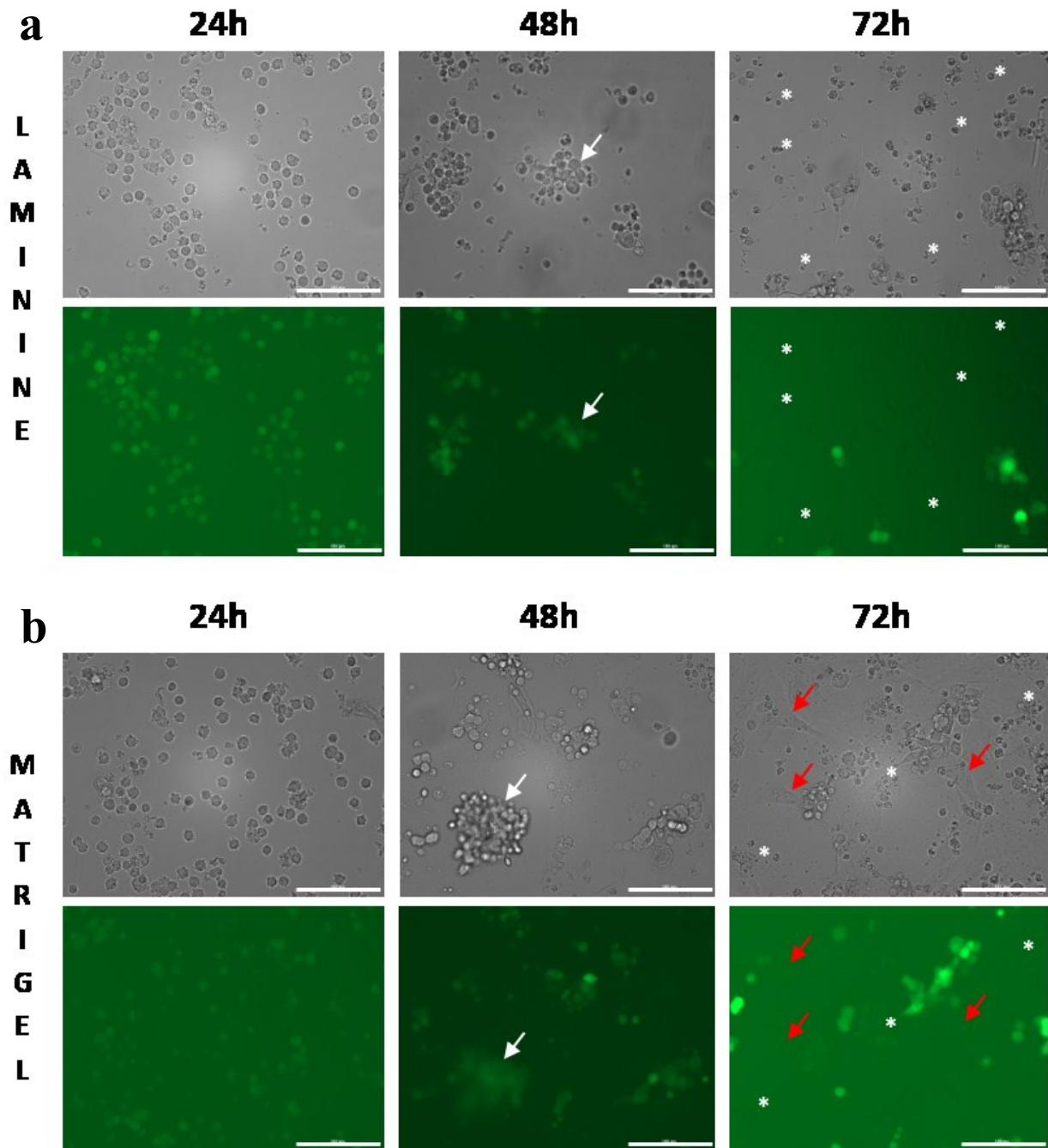


Figure 3.2.1 Évolution de la morphologie et de l'expression de la GFP des gonocytes triés à 16 dpc pendant 72h de culture sur deux supports de culture. Les cellules ont été maintenues sur de (a) la laminine à $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ou du (b) Matrigel pendant 72h. Noter la formation d'amas (flèches blanches) à partir de 48h de culture et une augmentation drastique de la mort cellulaire se traduisant par une augmentation du nombre de débris cellulaire (astérisques) après 72h de culture dans les deux supports. Noter également la présence de cellules somatiques apparentes après 72h de culture dans le matrigel (flèches rouges). Barre d'échelle : $100 \mu\text{m}$.

3.2.3 Les facteurs de croissance

Par la suite, nous avons mesuré l'impact de l'ajout de facteurs de croissance sur la prolifération des gonocytes. Il a été montré que des facteurs de croissance comme le bFGF, le LIF et le SCF sont essentiels pour la survie et/ou la prolifération des gonocytes en culture (van Dissel-Emiliani *et al.* 1996 ; De Miguel *et al.* 1996 ; Hasthorpe *et al.* 1999 ; Orth *et al.* 1997). Nous avons donc testé l'impact de 2 ng/ml de bFGF, 20 ng/ml de LIF et 60 ng/ml SCF seuls ou en combinaison sur la prolifération des cellules GFP-positives mesurée par incorporation de BrdU, après 24h de culture (Figure 3.2.2). Lorsqu'additionné individuellement, seul le bFGF permet de maintenir la prolifération des cellules GFP-positives. Combiné avec le LIF, le bFGF ne permet pas d'obtenir un taux de prolifération différent que celui obtenu lorsque ce dernier est seul. Cependant, une combinaison de bFGF et SCF induit une augmentation du taux de prolifération en comparaison au bFGF seul. Toutefois, cette différence n'est pas significativement différente. En revanche, l'addition des trois facteurs de croissance au milieu de culture, sur laminine, permet d'obtenir le taux de prolifération le plus élevé. Sur Matrigel, nous avons étudié l'impact de l'ajout de bFGF seul, de bFGF additionné de LIF et des trois facteurs de croissance. Sur ce support, nous n'avons pas observé de différence au niveau du taux de prolifération entre le MEM α additionné de bFGF et le MEM α additionné de LIF et/ou SCF (Figure 3.2.2). Le milieu additionné de bFGF, LIF et SCF a donc été sélectionné pour toutes les mises en culture ultérieures.

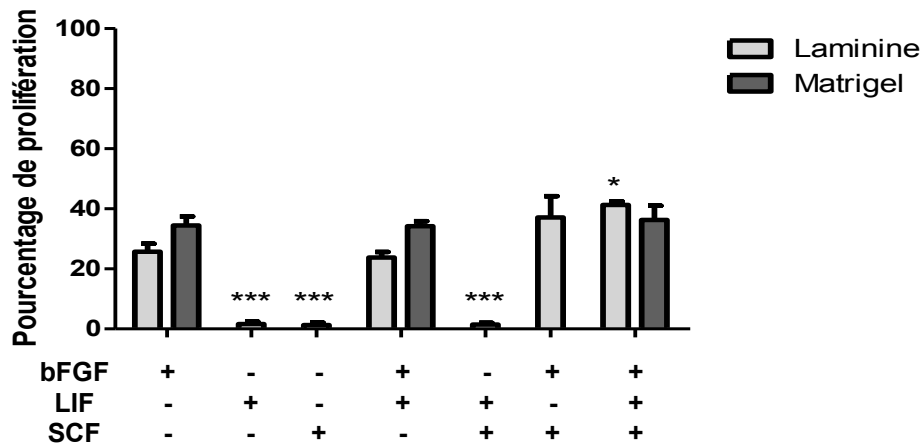


Figure 3.2.2 Cellules BrdU-positives après 24h de culture en fonction de la composition du milieu en facteur de croissance. Le pourcentage de prolifération a été déterminé avec des cellules de la fraction GFP-positive obtenues par FACS et provenant de testicules prélevés à 16 dpc, après 24h de culture. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ selon un test t de Student entre les différentes compositions en facteurs de croissance et le bFGF seul. Les résultats sont présentés selon la moyenne des échantillons \pm SEM (Laminine : $n = 3-6$; Matrigel : $n = 3$).

3.2.4 L'éthinylestradiol

Nous avons finalement testé l'impact de l'ajout d'œstrogènes sur la mortalité des cellules GFP-positives en culture. Il a été montré par Habert *et al.* en 1984 que les niveaux de 17 β -œstradiol intra-testiculaire variaient entre 0,15 et 0,18 pg par testicule entre 18,5 et 20,5 dpc (Habert *et al.* 1984). Dans une étude de 1997, Li *et al.* ont démontré un effet mitogénique dose-dépendant d'une supplémentation en 17 β -œstradiol dans des gonocytes néonataux avec une réponse maximale à 1 μ M (Li *et al.* 1997). En revanche, au stade fœtal, une addition d'1 μ M de 17 β -œstradiol induit une diminution du nombre de gonocytes en culture à 16,5 dpc (Delbès *et al.* 2007). Nous avons voulu tester l'effet d'une supplémentation en œstrogènes en utilisant l'EE2, un dérivé synthétique du 17 β -œstradiol, à une dose proche des niveaux endogènes ainsi qu'à de plus fortes doses sur la viabilité des cellules GFP-positives en culture. Le milieu de culture, sans sérum, supplémenté en bFGF, LIF et SCF a ainsi été additionné de 0,1 nM, 10 nM ou 1 μ M d'EE2. Nous n'avons pas observé de différence en terme de mortalité entre le témoin et les différentes doses d'éthinylestradiol (Figure 3.2.3). Il est cependant intéressant de noter les taux de mortalité élevés aussi bien dans les cellules témoins que dans les cellules traitées, suggérant que la culture *in vitro* des cellules GFP-positives induit une mortalité importante en soi.

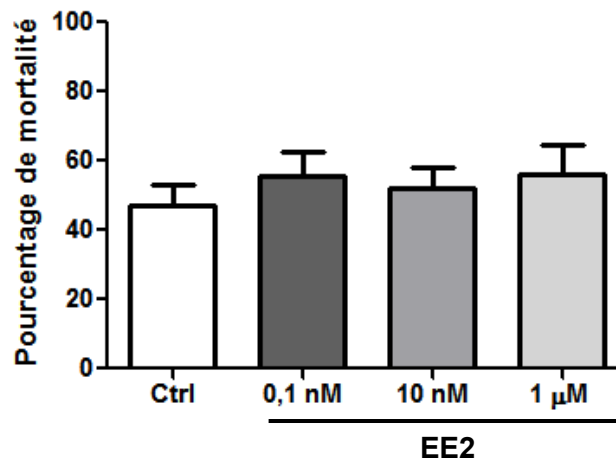


Figure 3.2.3 Cellules PI-positives après 24 de culture en présence ou non d'EE2. Les cellules de la fraction GFP-positive obtenues après tri par FACS ont été ensemencées sur laminine dans du MEM α additionné de bFGF, LIF et SCF pendant 24h. Le pourcentage de mortalité a été déterminé par un marquage des cellules mortes à l'iodure de propidium et des cellules totales au DAPI. Un test ANOVA-one way suivi d'un test de Tukey ont été utilisés ici sur les différentes doses d'EE2 et le témoin (Ctrl). Les valeurs obtenues correspondent aux moyennes des échantillons (n=3) \pm SEM.

3.3 Transfectabilité des cellules GFP-positives et immortalisation par lipofection

3.3.1 Transfectabilité des cellules GFP-positives avec un vecteur pmCherry-C1

Nous avons transfecté les cellules GFP-positives avec un plasmide pmCherry-C1 (Figure 3.3.1a) et divers agents de transfection (Lipofectamine 3000, TransIT®, JetPRIME ou Lipofectamine RNAiMax), entre 4h et 24h de culture. Le taux de transfection a été déterminé après 48 heures de culture en mesurant le nombre de cellules en rouge sur le nombre de cellules total. Peu importe l'agent utilisé, la transfection des gonocytes en culture semble être peu efficace (Figure 3.3.1b). En effet, on n'observe que très peu de cellules qui expriment la protéine mCherry (Figure 6.5b ; flèches rouges) 48h après transfection. Le calcul du taux de transfection nous permet d'observer que ce dernier est similaire peu importe la concentration en Lipofectamine 3000 (Figure 3.3.1c). La transfection est cependant plus efficace sur laminine que sur Matrigel (Figure 3.3.1c). L'utilisation du Matrigel a donc été éliminé et seuls des ensemencements sur laminine ont été réalisés par la suite.

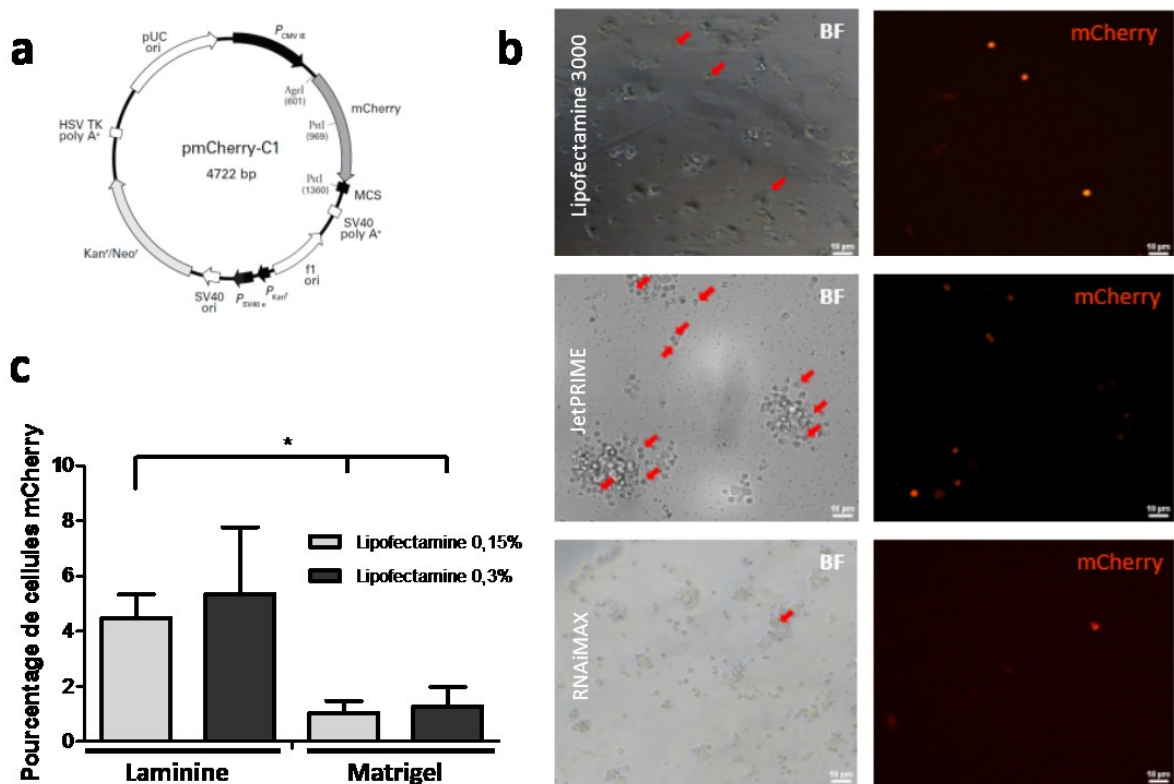


Figure 3.3.1 Transfection des cellules de la fraction GFP-positif avec un vecteur pmCherry-C1. (a) Le vecteur *pmCherry-C1* a été utilisé dans la transfection des cellules de la fraction GFP-positif avec différents agents (b). Le pourcentage de transfection a été déterminé après 48h dans la Lipofectamine 3000 en mesurant le nombre de cellules mCherry-positif présentes dans les puits préenduits de laminine et de Matrigel en fonction du nombre de cellules totales (c). Les valeurs obtenues sont présentées selon la moyenne des échantillons ($n=3$) \pm SEM. * $p < 0,05$ selon un test *t* de Student comparant les différents pourcentages à la Lipofectamine 3000 0,15% dans la laminine. Échelle : 10 μ m

3.3.2 Immortalisation et établissement des lignées 1 et 1/2

Des tentatives d'immortalisation avec un plasmide pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry (Figure 3.3.2a) ont été réalisées 24h après ensemencement avec les différents agents cités plus haut. Nous avons obtenu 2 lignées cellulaires, nommées lignée 1 et lignée 1/2, avec la Lipofectamine RNAiMAX seulement. La lignée 1 est issue de cellules de testicules de fœtus de rats homozygotes pour la GFP prélevés à 16 dpc et a été observé pour la première fois après 24 jours de culture par formation d'un tapis cellulaire. La lignée 1/2 provient de cellules de testicules de fœtus de rats hétérozygotes pour la GFP (père eGFP-GCS homozygote et femelle Wild Type) et a été observée après 11 jours de culture, par formation d'un tapis cellulaire. Les cellules de la lignée 1 et 1/2, de forme épithéliale, ont un doubling time de $28,7h \pm 2,16h$ (n=7) et $27,1h \pm 1,74h$ (n=13), respectivement. De plus, ces cellules sont bien fluorescentes dans le rouge, mais pas dans le vert, suggérant qu'elles expriment bien la mCherry et pas ou plus la GFP. Des expansions clonales ont été réalisées, mais des problèmes de contamination récurrents ont empêché le maintien de ces colonies. Les analyses suivantes ont donc été réalisées sur la population totale non-sélectionnée de cellules immortalisées obtenues.

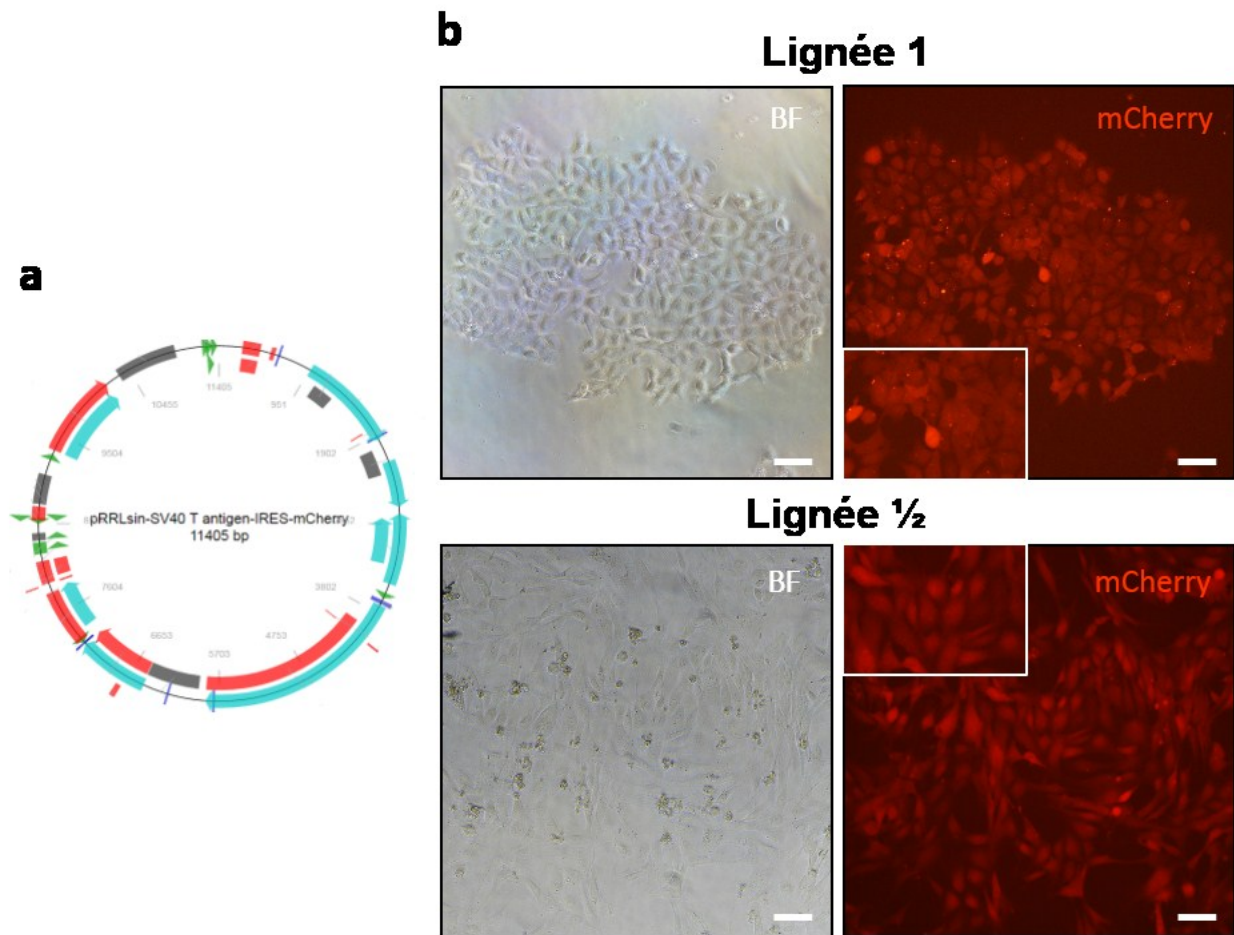


Figure 3.3.2 Immortalisation des cellules de la fraction GFP-positif avec un vecteur pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry et obtention de 2 lignées cellulaires. (a) Le vecteur pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry C1 a été utilisé dans l'immortalisation des cellules de la fraction GFP-positif avec la Lipofectamine RNAiMax (b). Les lignées 1 et 1/2 forment un tapis de cellules de type épithéliales et semblent bien exprimer la protéine mCherry, en rouge, mais n'expriment pas la GFP. Échelle : 10 μ m

3.4 Caractérisation cellulaire des lignées 1 et 1/2

3.4.1 Étude de la morphologie par microscopie électronique

Il est possible de distinguer les différents types de cellules testiculaires par l'étude de caractéristiques morphologiques spécifiques par microscopie électronique de coupe de testicule (Novi *et al.* 1968; Kerr *et al.* 1988; Ehrlich *et al.* 1986). La microscopie électronique est donc un bon moyen pour identifier la nature des cellules du testicule. Nous avons étudié la morphologie des cellules de la lignée 1 par microscopie électronique à transmission. Nous avons pu observer une population de cellules qui semblent hétérogènes avec des différences morphologiques et structurelles (Figure 3.4.1). En étudiant les noyaux des cellules, nous avons pu observer que certains d'entre eux possèdent un ou deux nucléoles alors que d'autres en sont dépourvus (Figure 3.4.1 a). Nous avons également observé la présence de nombreuses mitochondries rondes et/ou ovoïdes dans certaines cellules (Figure 3.4.1b; flèche et tête de flèche); les crêtes de ces mitochondries sont par ailleurs bien définies (Figure 3.4.1c; flèche et tête de flèche). Nous avons également pu observer des ribosomes libres seuls ou en groupes ainsi que des ribosomes liés au réticulum endoplasmique rugueux (Figure 3.4.1d; astérisques). En bref, les observations ne correspondent pas aux caractéristiques spécifiques des gonocytes telles que décrites sur coupe de testicule.

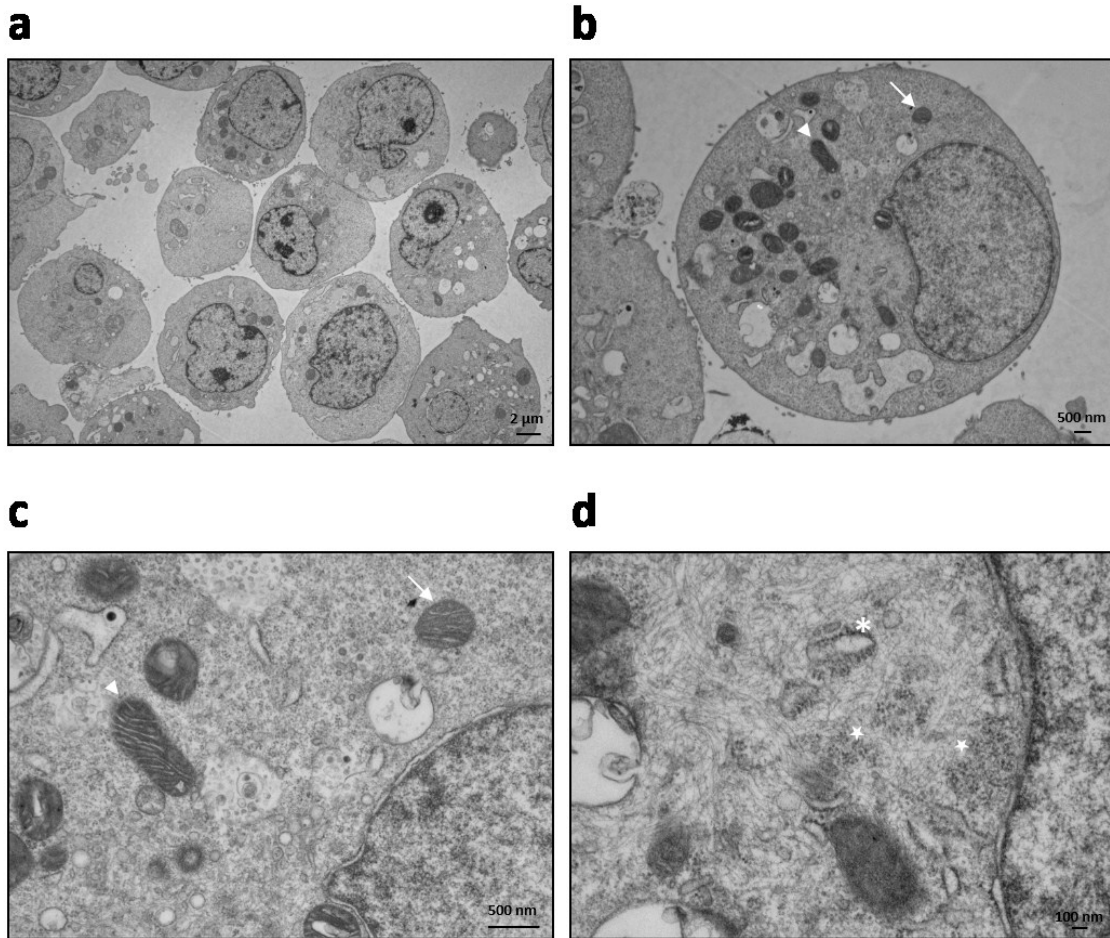


Figure 3.4.1 Observation de la morphologie des cellules de la lignée 1 par microscopie électronique à transmission. Les cellules de la lignée 1 ont été décollées par trypsinisation, culottées, puis préparées pour analyse au microscope électronique à transmission. **(a)** Vue d'ensemble des cellules de la lignée 1. Noter les différences de forme des noyaux entre les cellules. Échelle : 2 µm. **(b)** Cellule ronde avec un noyau bien défini et de nombreuses mitochondries rondes (flèche) et ovoïdes (tête de flèche). Échelle : 500 nm. **(c)** Crêtes mitochondriales bien visibles dans les mitochondries rondes (flèches) et ovoïdes (tête de flèche). Échelle : 500 nm. **(d)** Ribosomes libres (étoile) ou liés au réticulum endoplasmique rugueux (astérisque). Échelle : 100 nm.

3.4.2 Immunohistochimie de marqueurs de cellules testiculaires

Nous avons voulu caractériser les lignées 1 et ½ en étudiant l'expression de l'HSP90 et de l'AMH au niveau protéique par immunofluorescence et utiliser les fractions GFP-positives et GFP-négatives obtenues après tri par FACS comme témoins. Nous avons voulu ensuite établir la nature des lignées 1 et ½ en les comparant à ces différents types cellulaires. Bien que tous les échantillons étudiés aient été analysés dans différents puits, l'utilisation d'une même concentration d'anticorps et des mêmes conditions de prise d'images permet de comparer les niveaux de marquages. Nous avons observé un marquage cytoplasmique de l'HSP90 dans au moins 84% (n=1) des cellules de la fraction GFP-positives et une absence de marquage dans la fraction GFP-négative (Figure 3.4.2). Nous avons observé un marquage cytoplasmique de l'AMH dans 10% (n=1) des cellules de la fraction GFP-négative (Figure 3.4.3). Bien que la majeure partie des cellules de la fraction GFP-positives n'exprime pas l'AMH, nous avons observé 1% (n=1) de cellules AMH-positives (Figure 3.4.3, flèche), suggérant une contamination somatique de la fraction GFP-positives lors du tri par FACS. Dans les cellules des lignées 1 et ½, on observe une légère expression de l'HSP90. Le niveau de marquage est cependant beaucoup plus faible que celui observé dans les cellules de la fraction GFP-positives (Figure 3.4.3). De plus, les 2 lignées ne semblent pas exprimer l'AMH puisque l'on n'observe aucun marquage dans ces cellules (Figure 3.4.3), suggérant que les cellules immortalisées ne sont pas des cellules de Sertoli.

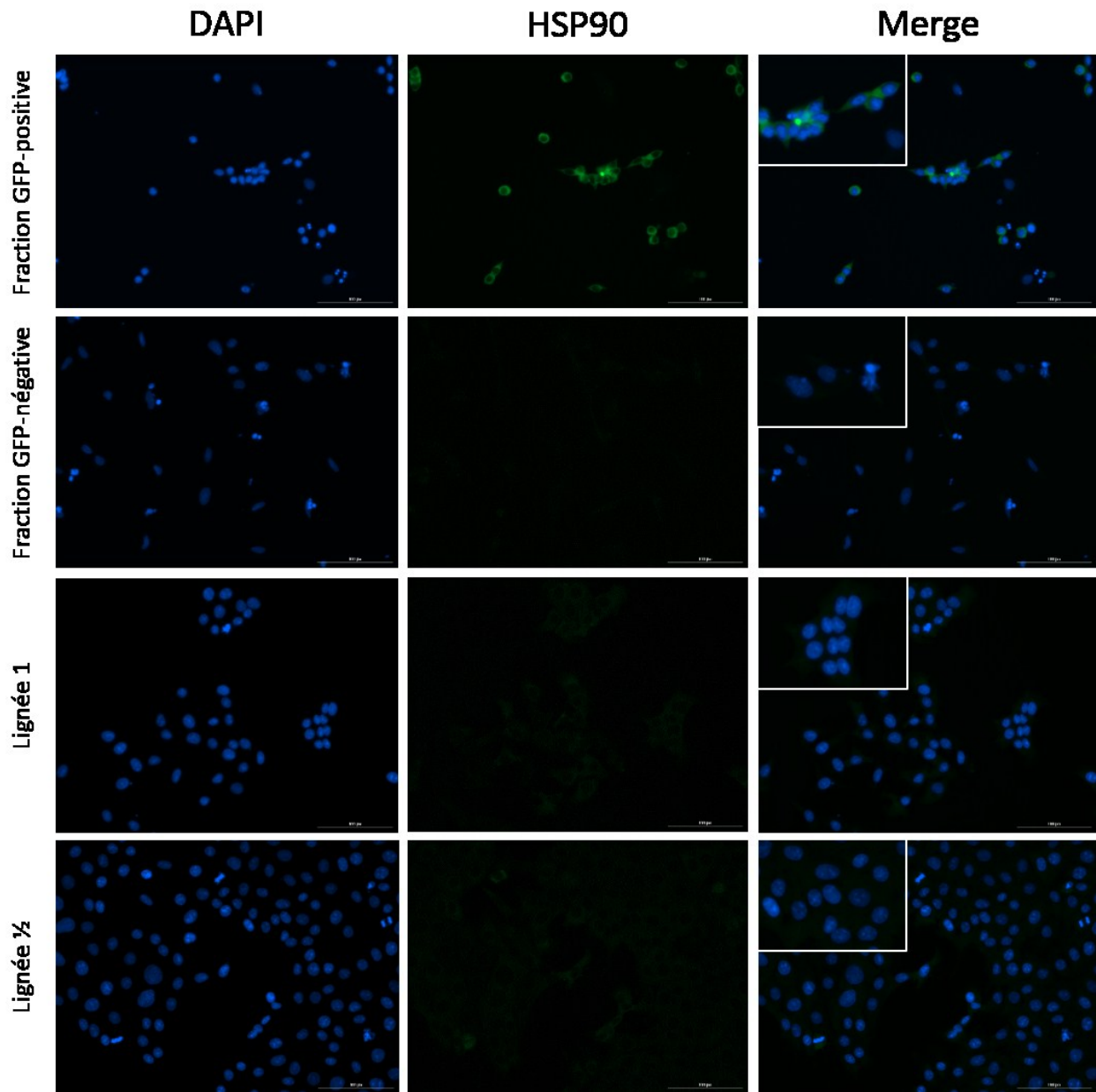


Figure 3.4.2 Expression de l'HSP90 dans les lignées 1 et ½. Le co-marquage du DAPI (bleu) et de l'HSP90 (vert) a été réalisé sur les cellules des fractions GFP-positives et GFP-négatives et des lignées 1 et ½. Noter le léger marquage dans les cellules des deux lignées. Échelle = 100 µm

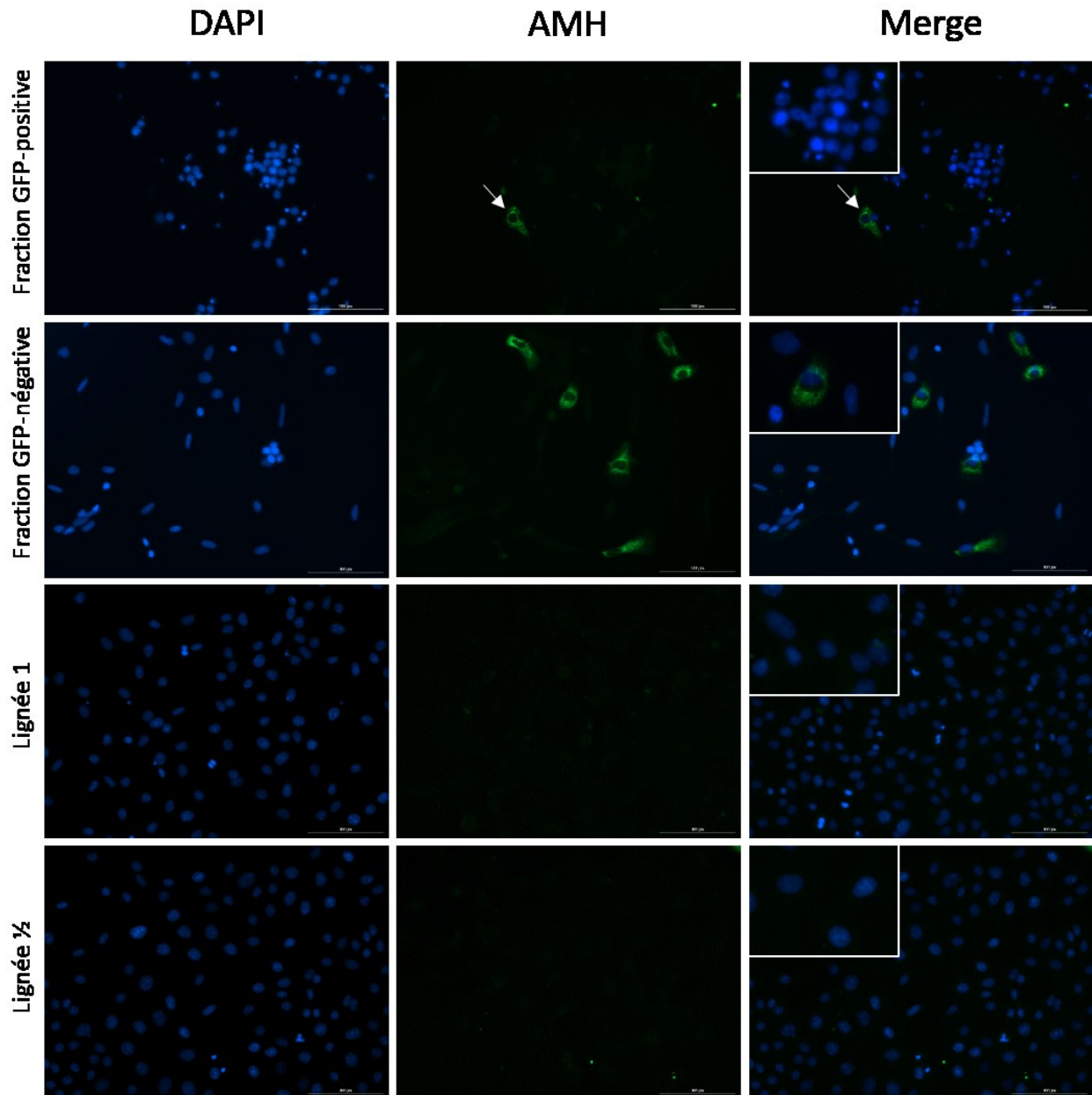


Figure 3.4.3 Expression de l'AMH dans les lignées 1 et 1/2. Le co-marquage du DAPI (bleu) et de l'AMH (vert) a été réalisé sur les cellules des fractions GFP-positive et GFP-négative et des lignées 1 et 1/2. Noter la présence d'une cellule AMH-positive (flèche) dans la fraction GFP-positive. Échelle = 100 µm

3.5 Caractérisation moléculaire des lignées 1 et ½

3.5.1 Études des profils de méthylation des lignées 1 et ½

Pendant la période de développement foetal, on observe une reprogrammation de l'épigénome caractérisée par la réinitialisation des marques épigénétiques dans les cellules germinales (Ly *et al.* 2015). À 16 dpc, les cellules germinales sont déméthylés et l'établissement des nouveaux patrons de méthylation s'effectue à 18,5 dpc chez le rat (Rose *et al.* 2014). Les cellules somatiques ne subissent cependant pas d'effacement de ces marques épigénétique et maintiennent un profil identique tout au long du développement (Rose *et al.* 2014). La mesure de la méthylation de l'ADN est donc un bon moyen pour distinguer les cellules germinales des cellules somatiques à notre stade d'intérêt. Nous avons tout d'abord déterminé le profil de méthylation des cellules des fractions GFP-positif et GFP-négatif obtenues après tri par FACS. Nous avons pu observer que les niveaux de méthylation de l'ADN de la fraction GFP-positif sont bas pour *Snrpn* et *H19* (Figure 3.5.1), ce qui correspond à un profil de cellules germinales. Nous avons aussi observé que les profils de méthylation de l'ADN de la fraction GFP-négatif sont proches de 50% (Figure 3.5.1), ce qui correspond à un profil de cellules somatiques. Dans les cellules des lignées 1 et ½, nous avons obtenu un profil de méthylation de l'ADN similaire aux cellules somatiques puisque les niveaux de méthylation sont comparables à ceux observés dans la fraction GFP-négatif (Figure 3.5.1).

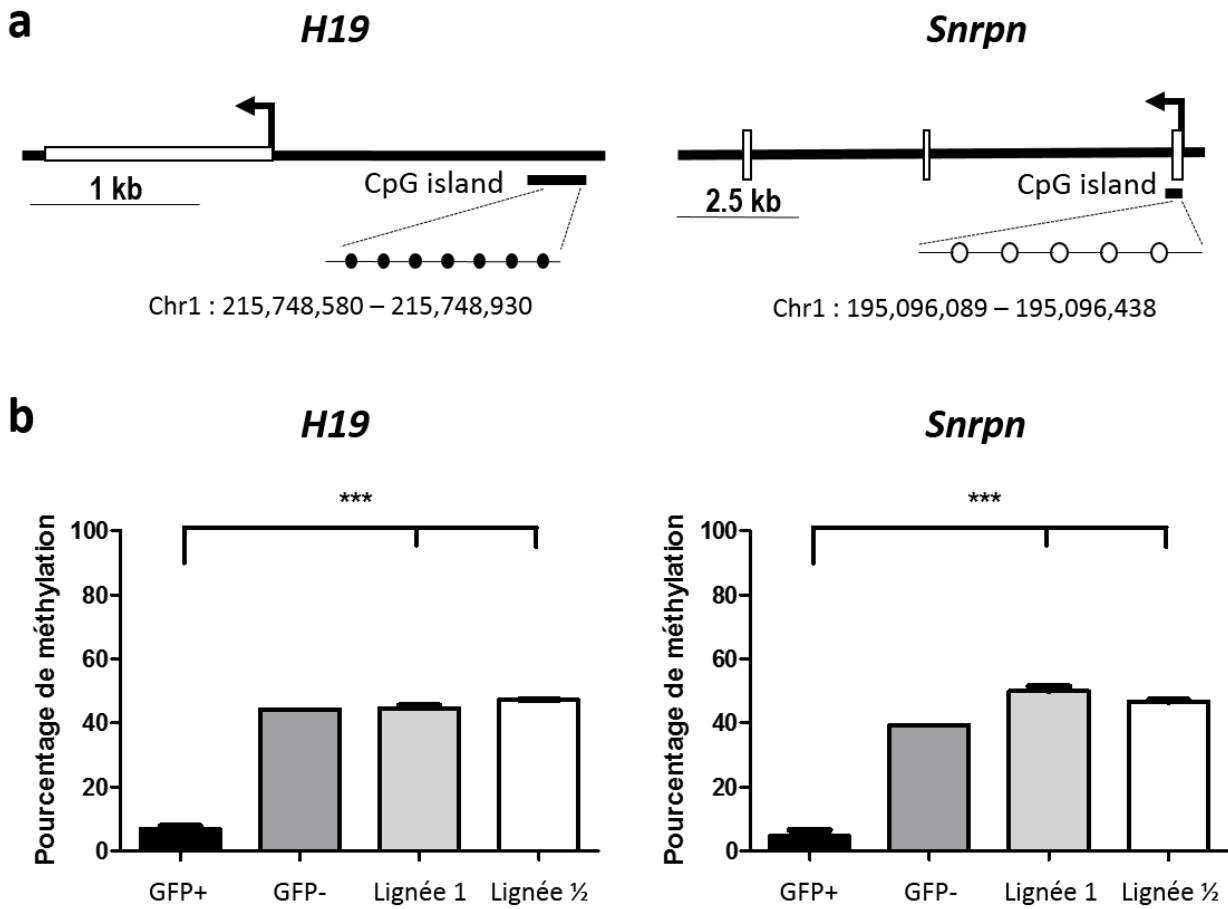


Figure 3.5.1 Profil de méthylation de Snrpn et H19 dans les fractions GFP-positive et GFP-négative et les lignées 1 et 1/2. (a) les pourcentages de méthylation ont été déterminés par l'analyse de 5 (*Snrpn*) et 7 (*H19*) sites CpG de leur gène correspondant (Rwigemera *et al.* 2017) dans la fraction GFP-positive (GFP+), la fraction GFP- (GFP-) et les lignées 1 et 1/2. (b) Les données représentent le pourcentage de méthylation moyen \pm SEM, s'il y a lieu (GFP+/Lignées 1 et 1/2 : n=3 et GFP- : n=2). *** $p < 0,0001$ selon un test *t* de Student comparant les lignées 1 et 1/2 à la fraction GFP-positive.

3.5.2 Étude de l'expression des marqueurs des cellules testiculaires au niveau transcriptionnel

Afin de caractériser les lignées 1 et 1/2, nous avons mesuré les niveaux d'expression de marqueurs spécifiques aux différents types cellulaires du testicule fœtal. Nous avons donc testé des marqueurs des cellules germinales (Hsp90 et Oct4), des cellules de Leydig (3βhsd et P450scc), des cellules de Sertoli (Amh) et des cellules péritubulaires (α-sma). Un marqueur des cellules péritubulaires, le von Willebrand Factor (vWF) a également été testé. Cependant, la séquence obtenue par séquençage ne correspondait pas à la séquence attendue. De nouvelles amorces devront donc être générées pour mesurer les niveaux d'expression de ce marqueur des cellules péritubulaires. L'Hsp90 et Oct4, deux marqueurs de cellules germinales, sont bien détectés dans le testicule entier et enrichis dans la fraction GFP-positif par rapport à la fraction GFP-négative où les niveaux sont bas ou nul (Figure 3.5.2). L'α-sma et la P450scc, des marqueurs de cellules péritubulaires et cellules de Leydig, respectivement, sont également bien détectés dans le testicule entier et enrichis dans la fraction GFP-négative en comparaison à la fraction GFP-positif où les niveaux sont plus faibles ou nuls (Figure 3.5.2). L'Amh et la 3βhsd, des marqueurs des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig sont également bien détectés dans le testicule entier. Cependant, les profils d'expression dans les fractions GFP-positif et GFP-négative sont à l'inverse de ce qui est attendu. La 3βhsd montre une plus forte expression dans la fraction GFP-positif en comparaison à la fraction GFP-négative (Figure 3.5.2). D'autre part, les niveaux d'expression de l'Amh ne diffèrent pas dans les fractions GFP-positif et GFP-négative (Figure 3.5.2). Il est cependant intéressant de noter une absence d'expression de ces 7 marqueurs dans les lignées 1 et 1/2. Nos résultats montrent qu'aucun de ces marqueurs ne sont exprimés dans les cellules des lignées 1 et 1/2. (Figure 3.5.2). Ceci suggère ainsi que les cellules des lignées 1 et 1/2 ne sont ni des cellules germinales, ni des cellules de Leydig, ni des cellules de Sertoli, ni des cellules péritubulaires, ni des cellules endothéliales. Cependant, seulement 1 à 2 marqueurs par type cellulaire ont été testés ici. Il pourrait donc être intéressant d'en tester d'avantage pour confirmer l'identité des cellules de ces lignées.

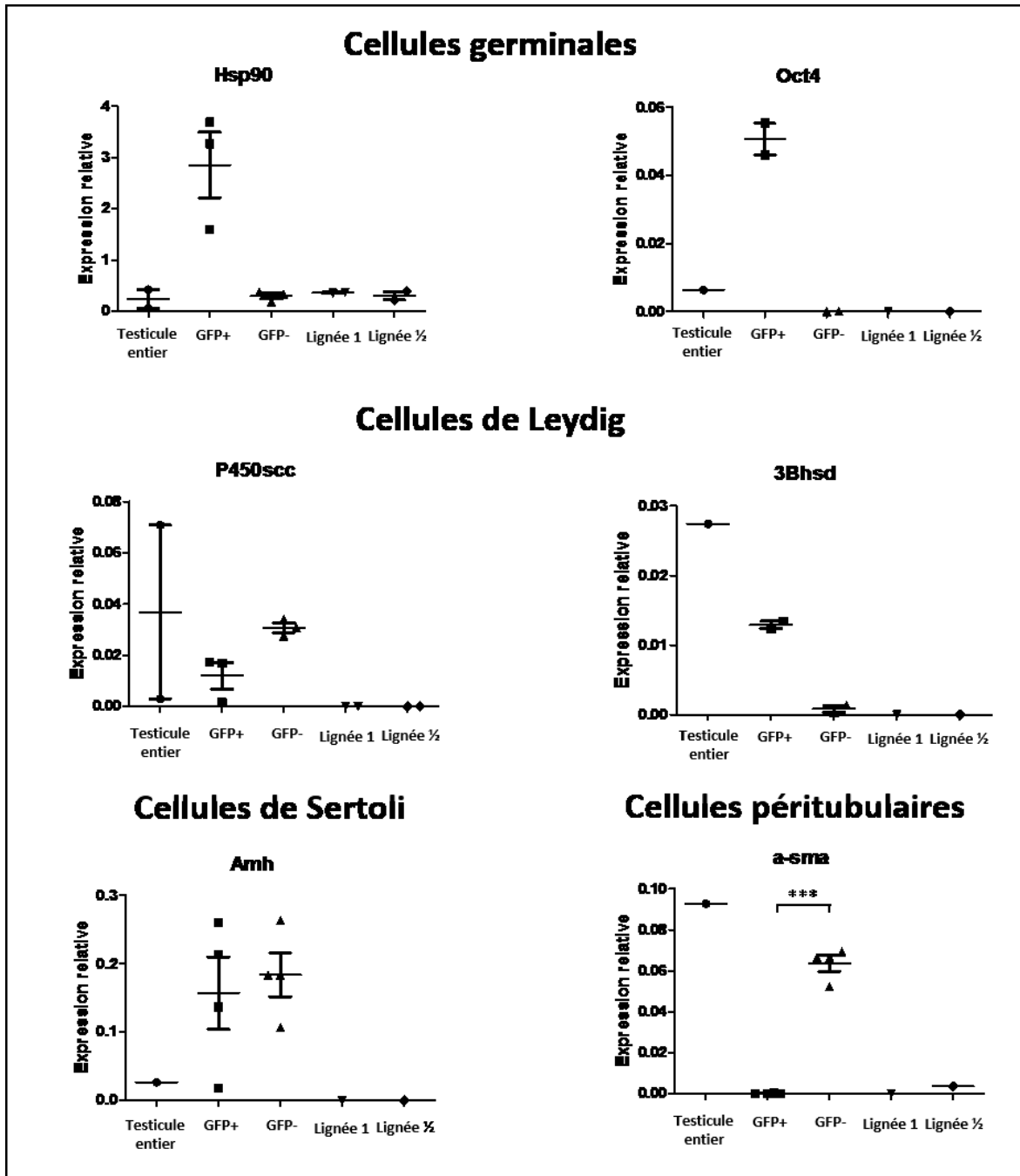


Figure 3.5.2 Expression relative des marqueurs testiculaires des cellules des fractions GFP-positive et GFP-négative et des lignées 1 et ½. L'expression relative a été déterminée en comparant l'expression des marqueurs recherchés à l'expression de l'actine dans les fractions GFP-positive et GFP-négative et dans les lignées 1 et ½. L'expression de marqueurs de (a) cellules germinales, (b/d) cellules de Leydig, (c) cellules périlitubulaires, (d) cellules endothéliales et cellules de Sertoli a été mesurée. S'il y a lieu, les données sont représentées selon la moyenne des échantillons \pm SEM (Testicule entier : n=1-2; GFP+ : n=2-4; GFP- : n=2-4; Lignées 1 et ½ : n=1-2). *** p < 0,001 entre GFP+ et GFP- selon un test *t* de Student; GFP+ : fraction GFP-positive; GFP- : fraction GFP-négative.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION

3.6 Discussion

Dans cette étude, nous avons obtenu et commencer à caractériser deux lignées de cellules immortalisées provenant de testicules de fœtus de rats prélevés à 16 jours de gestation. Grâce au système de tri par cytométrie en flux disponible dans le laboratoire (FACSJazz), nous sommes capables de purifier une suspension de cellules GFP-positives à 16 dpc avec une pureté de 91%. Cette fraction de cellules GFP-positives est considérée comme une suspension de gonocytes alors que la fraction de cellules GFP-négative est considérée comme une suspension de cellules somatiques. Les lignées de cellules obtenues sont maintenues dans des conditions de culture déterminées préalablement par la culture primaire de gonocytes prélevés à 16 dpc. Il a été montré qu'une supplémentation du milieu en bFGF à 2 ng/ml augmente significativement le nombre de gonocytes prélevés à 16 dpc en culture dans un modèle de co-culture (Boulogne *et al.* 2003). Dans un autre modèle de co-culture, un milieu supplémenté en bFGF, LIF et SCF avait également été montré comme augmentant le nombre de gonocytes néonataux *in vitro* (De Miguel *et al.* 1996). Enfin, des modèles de culture *in vitro* de PGC, les précurseurs des gonocytes, ont montré qu'une supplémentation de bFGF, LIF et SCF au milieu de culture stimulait la prolifération de ces cellules (Matsui *et al.* 1991; Resnik *et al.* 1992) Dans cette étude, nous avons en effet observé que la prolifération des cellules GFP-positives est la plus optimale dans un milieu de culture additionné en bFGF, LIF et SCF. Bien que des données suggèrent que la culture des gonocytes puisse être améliorée lorsque ces derniers sont ensemencés sur une couche de Matrigel (van Dissel-Emiliani *et al.* 1993; Orth *et al.* 1991; Yu *et al.* 2005), nous n'avons pas observé de différence avec la culture sur laminine. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la laminine est un composant essentiel du Matrigel (Hughes *et al.* 2010) et jouerait potentiellement un rôle important dans le maintien des gonocytes en culture.

Concernant l'EE2, nous n'avons pas observé d'effet sur la viabilité des cellules de la fraction GFP-positives en culture. L'effet sur la prolifération n'a cependant pas été étudié ici. Bien qu'une addition d'1 μM de 17 β -oestradiol diminue le nombre de gonocytes en co-culture avec des cellules de Sertoli à 16,5 dpc (Delbès *et al.* 2007), l'effet direct de l'EE2 sur la prolifération des gonocytes n'est pas décrit en culture cellulaire dans la littérature. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'ajout d'EE2 sur la prolifération des cellules de la fraction GFP-positives par une incorporation de BrdU par exemple.

Dans un tissu ou en culture, les différents types cellulaires ont des caractéristiques morphologiques spécifiques qui permettent de les identifier. En microscopie électronique, il est ainsi possible de différencier les gonocytes par leur grande taille (24-27 μm), leur noyau rond, leur chromatine distribuée uniformément et la présence d'1 ou 2 nucléoles proéminents (Novi *et al.* 1968). Les cellules de Leydig fœtales sont plus petites, avec un noyau ovoïde ou irrégulier et contiennent de nombreuses mitochondries (Kerr *et al.* 1988). Les cellules de Sertoli sont également plus petites (5-18 μm) avec des noyaux montrant parfois des entailles profondes et des mitochondries sphériques (0,3-0,6 μm de diamètre) ou en forme de tiges courtes d'environ 0,7 μm de long (Novi *et al.* 1968). Les cellules péritubulaires, quant à elles, possèdent un réticulum endoplasmique élaboré, avec un noyau allongé et une morphologie de type épithéliale (Ehrlich *et al.* 1986). Les études ayant mené à ces découvertes ont été réalisées sur des coupes de tissus qui permettent d'observer toutes les caractéristiques spécifiques de chacun des types cellulaires. Cependant, notre étude a été effectuée dans des conditions d'analyses différentes. Dans notre étude, nous avons observé que la lignée 1 est composée d'une majorité de cellules rondes avec des noyaux possédant, ou non, un ou plusieurs nucléoles, avec peu, ou de nombreuses mitochondries rondes ou ovoïdes dont les crêtes sont bien définies, ainsi que des ribosomes libres, seuls ou groupe, liés ou non au réticulum endoplasmique rugueux (Figure 3.4.1). Ces caractéristiques pourraient correspondre à divers types cellulaires. Basé sur cette observation, il est impossible d'établir l'identité des cellules de la lignée 1. Notre étude a été effectuée sur des coupes de culots de cellules obtenues après que ces dernières aient été remises en suspension et centrifugation. Ceci pourrait ainsi limiter la distinction d'un type cellulaire en particulier simplement sur ces caractéristiques cellulaires puisque les cellules en suspension pourraient perdre leur morphologie typique et adopter une forme plus ronde. Nous n'avons donc pas pu établir des caractéristiques aussi tranchées que celles observées *in vivo*. Il serait donc intéressant de réaliser une étude des fractions GFP-positives et GFP-négatives en microscopie électronique et d'établir leur profil morphologique pour les comparer avec les cellules de la lignée 1 puisque ces cellules auront été préparées selon la même méthode. Pour aller plus loin, nous pourrions également étudier la morphologie en microscopie électronique de chaque type cellulaire du testicule préalablement triés par FACS par le biais de marqueurs spécifiques, et les comparer aux cellules de la lignée 1. Une étude plus approfondie avec de nouvelles images est donc requise afin de classer ces cellules.

Pendant la vie fœtale, seules les cellules germinales subissent un effacement des marques épigénétiques, un événement nécessaire au rétablissement des empreintes parentales, pendant la vie fœtale (Ly *et al.* 2015). Dans les gonocytes, on observe une réapparition des nouvelles

marques épigénétiques qui se traduit notamment par l'établissement des patrons de méthylation de l'ADN spécifiques aux cellules germinales entre 18,5 dpc et 21,5 dpc chez le rat (Rose *et al.* 2014; Rwigemera *et al.* 2017). Les cellules somatiques, ne subissant pas d'effacement des marques épigénétiques, maintiennent le même profil, avec des niveaux de méthylation proches de 50%, durant le développement fœtal (Rose *et al.* 2014). Dans le cas des gènes à empreintes parentales, la méthylation de l'ADN est allèle-spécifique et dépendante de l'origine maternelle ou paternelle (Abramowitz *et al.* 2011). Bien que similaires, les niveaux de méthylation de l'ADN des cellules de la fraction GFP-négative (Figure 3.5.1) ne correspondent pas exactement avec le pourcentage théorique (50%). Ceci pourrait être dû aux limites de la technique de pyroséquençage, qui ne permet peut-être pas d'obtenir des niveaux de méthylation identiques, mais proches de ceux retrouvés *in vivo*. Dans les cellules de la fraction GFP-positive, nous avons également observé des niveaux de méthylation proches des niveaux de méthylation retrouvés *in vivo*, mais pas identiques (Figure 3.5.1) Ces niveaux de méthylation supérieur à 0 pourraient être un indicateur d'une contamination par des cellules somatiques comme il a déjà été décrit dans la littérature (Kato *et al.* 2007). De plus, après tri par FACS, le pourcentage de pureté de la fraction GFP-positive est de 91%. Il est donc possible que les 9% restants correspondent à une contamination en cellules somatiques, augmentant ainsi le pourcentage de méthylation dans la fraction GFP-positive. Les niveaux de méthylation non-nuls pourraient également indiquer qu'une partie de la méthylation de l'ADN peut être conservée à partir des patrons parentaux (Niles *et al.* 2011 ; Lees-Murdock *et al.* 2003). Les niveaux de méthylation de l'ADN des cellules des lignées 1 et ½ ont également été mesurés et correspondent à des profils de méthylation de l'ADN des cellules somatiques (Figure 3.5.1). Ces résultats suggèrent ainsi que les cellules des lignées 1 et ½ ne sont pas des cellules germinales, mais bien des cellules somatiques.

Nous avons également cherché à caractériser les lignées 1 et ½ au niveau protéique et transcriptionnel. Au niveau protéique, nous n'avons pas observé d'expression de l'AMH, un marqueur des cellules de Sertoli et une très légère expression de l'HSP90, un marqueur des cellules germinales, suggérant que ces cellules ne sont ni des cellules de Sertoli, ni des cellules germinales. Une analyse par RT-qPCR a permis de mettre en évidence une absence, ou une très légère expression, des marqueurs de cellules germinales (Oct4 et Hsp90), de Leydig (P450scc) et péricytaires (α -sma) dans les lignées 1 et ½. L'Hsp90 a déjà été montré comme étant faiblement exprimée dans les cellules de Sertoli (Wang *et al.* 2004), pouvant ainsi potentiellement expliquer la légère expression de ce marqueur dans la fraction GFP-négative. Nous avons également observé une faible expression de la P450scc dans les cellules de la fraction GFP-positive. Bien que cela soit surprenant, ce pourrait être un indicateur de la présence de cellules

de Leydig dans cette fraction cellulaire. Bien que les profils d'expression de l'AMH et de la 3 β hsd ne correspondaient pas à ceux attendus, nous n'avons pas observé d'expression de ces derniers dans les cellules des lignées 1 et 1/2, suggérant que ces cellules ne sont ni des cellules de Sertoli ni des cellules de Leydig. Cependant, seuls 1 ou 2 marqueurs par type cellulaire ont été utilisés ici. Il serait donc intéressant de tester d'avantage de marqueurs pour confirmer ou infirmer l'identité des cellules des lignées 1 et 1/2. De plus, on peut noter une grande variabilité dans la fraction GFP-positif de l'AMH, pouvant présager d'une erreur technique. Il serait donc intéressant d'augmenter le nombre de réplicats biologiques pour diminuer la variabilité et préciser ces profils d'expression dans les fractions GFP-positif et GFP-négatif ainsi que dans les lignées 1 et 1/2. Pour aller plus loin, il serait intéressant de comparer les niveaux d'expression des gènes des fractions GFP-positif, GFP-négatif et des lignées 1 et 1/2 par la méthode des puces à ADN. Cette méthode, déjà utilisée pour l'étude de l'expression des gènes des gonocytes fœtaux et néonataux (Shultz *et al.* 2001 ; Chen *et al.* 2015 ; McIver *et al.* 2012), permet de mesurer le niveau d'expression de nombreux gènes à partir d'un extrait d'ARN. Ainsi, en utilisant les puces à ADN Affymetrix (ThermoFisher Scientific, Massachussets, USA) par exemple, il serait possible d'étudier la différence d'expression de milliers de gènes entre les différentes fractions et les lignées 1 et 1/2 et potentiellement permettre d'identifier les cellules des lignées 1 et 1/2 de par leur profil d'expression.

Bien que l'immortalisation des lignées 1 et 1/2 ait été effectuée sur les cellules de la fraction GFP-positif, il n'est pas impossible que ces lignées proviennent de cellules somatiques, comme le suggère tous les résultats obtenus. En effet, la suspension de cellules GFP-positives obtenue après tri par cytométrie en flux à 16 dpc possède une pureté de 91%. Ce pourcentage de pureté indique donc qu'environ 9% des cellules obtenues dans la suspension de cellules GFP-positives ne seraient potentiellement pas des cellules germinales, suggérant ainsi une contamination en cellules somatiques. Dans cette fraction on observe en effet certaines cellules positives à l'AMH lors d'un marquage par immunofluorescence (Figure 3.4.3), la présence de cellules allongées adhérentes en culture primaire après 72h dans du Matrigel (Figure 3.2.1) ainsi qu'une expression de la P450scc par RT-qPCR (Figure 3.5.2). À noter cependant que les résultats obtenus pour Hsp90 et Oct4 démontre pourtant clairement un enrichissement en cellules germinales de la fraction GFP-positif.

En bref, la faible expression de l'HSP90, analysée par immunofluorescence et RT-qPCR, l'absence d'expression d'Oct4 en RT-qPCR, les pourcentages de méthylation avoisinant les 50%, l'absence de l'expression de la GFP et les caractéristiques morphologiques observées en

microscopie optique et électronique suggèrent que les lignées 1 et 1/2 ne possèdent pas de caractère germinale. Bien que les niveaux de méthylation élevés pourraient être dus à la mise en culture ou à l'immortalisation comme il a déjà été montré dans de nombreux modèles (Saferali *et al.* 2010; Bork *et al.* 2010; Nestor *et al.* 2015), les autres évidences ne permettent pas d'établir une origine germinale pour les lignées 1 et 1/2. Nous avons pu observer que les cellules des lignées ne semblent pas exprimer l'AMH, la P450scc et l' α -sma, suggérant que ces cellules ne sont ni des cellules de Sertoli, des cellules de Leydig, des cellules périvitubulaires. Cependant, les cellules de ces lignées ne proviennent pas de clones, mais bien d'une population de cellules non-sélectionnée. Il est donc possible que ces lignées soient composées de plus d'un type cellulaire en quantité variable. Ceci ne permettrait donc pas d'avoir un profil optimal lors de l'analyse des différents marqueurs au niveau transcriptionnel.

Dans le compartiment interstitiel du testicule fœtal, il existe au moins deux autres types cellulaires pour lequel aucun marqueur n'ait été analysé ici : les macrophages et les cellules endothéliales. Cependant, dans le testicule fœtal, il a été montré que des macrophages étaient présents à partir de 19 dpc seulement chez le rat (Hutson 1990). Ces macrophages ont été identifiés par l'étude de marqueurs comme ED1, ED2 et OX-42 (Hutson 1990). Bien que l'auteur n'ait pas été en mesure d'identifier de macrophages à 17 dpc et 18 dpc, il serait intéressant de mesurer l'expression d'au moins un de ces marqueurs par immunofluorescence et RT-qPCR dans nos fractions GFP-positives et GFP-négatives obtenues à 16 dpc ainsi que dans nos lignées 1 et 1/2. La limite de détection d'Hudson en 1990 réside potentiellement dans les limites des techniques utilisées à l'époque qui pourraient être surmontées avec les techniques actuelles. En ce qui concerne les cellules endothéliales, les niveaux d'expression de marqueurs spécifiques, comme le vWF, dans les cellules des fractions GFP-positives et GFP-négatives ainsi que dans les lignées 1 et 1/2 pourraient être mesurés. Ceci permettrait alors de confirmer ou d'infirmer l'identité des cellules des lignées 1 et 1/2. Bien que les cellules de ces lignées puissent être des macrophages ou des cellules endothéliales, leur identité pourrait être tout autre. Dans des modèles de culture *in vitro* de PGCs de souris prélevées à 8,5 dpc, il a été montré qu'une supplémentation du milieu en bFGF, LIF et/ou SCF induit une dédifférenciation de ces cellules qui se traduit par un phénotype de cellules souches embryonnaires (Matsui *et al.* 1992 ; Resnik *et al.* 1992) et par une expression de l'antigène-1 embryonnaire de souris stade-spécifique (SSEA-1) (Matsui *et al.* 1992). Dans notre étude, si la culture de cellules présumées germinales dans un milieu supplémenté de bFGF, LIF et SCF a induit une dédifférenciation de ces cellules, il est possible que les lignées obtenues correspondent en fait à un stade dédifférencié de ces dernières. Il serait donc intéressant de mesurer l'expression de marqueurs de PGCs comme AP-2 (Weber *et al.* 2010) et Sox2 (Campolo

et al. 2013) et de cellules souches embryonnaires comme SSEA-1 par immunofluorescence et RT-qPCR dans nos lignées 1 et ½.

À la fin de l'étude, nous avons pu tester le système Nucleofector™ 4-D (Amaxa, Lonza Inc., Basel, Suisse). Ce système permet un transfert de gènes par électroporation des membranes plasmiques et nucléaires. Il a déjà été montré que la nucléofection est une méthode beaucoup plus efficace que les autres méthodes de transfection non virale, dans des cellules souches (Cesnulevicius *et al.* 2006; Lorenz *et al.* 2004; Zeng *et al.* 2012), des cellules épithéliales (Jacobsen *et al.* 2006), des neurones (Zeitelhofer *et al.* 2007) ainsi que dans des cellules souches spermatogoniales de souris (Sato *et al.* 2015). De plus, cette technique offre une alternative pratique et plus sécuritaire que le transfert de gènes par infection virale (Zeitelhofer *et al.* 2007; Lorenz *et al.* 2004). Cette technique nous a permis d'obtenir 11 lignées cellulaires avec une seule tentative de nucléofection et 7 programmes prédéfinis différents (données non présentées). Étonnamment, nous n'avons obtenu qu'un taux de transfection (nombre de cellules rouges/nombre de cellules totales) variant entre 1% et 10% selon les programmes. Ces faibles taux de transfection sont comparables à celui obtenu avec la lipofectamine (Figure 3.3.1). Ces cellules sont bien adhérentes et n'expriment pas ou plus la GFP (données non présentées). La caractérisation complète grâce à la batterie de tests effectuée pour lignée 1 et ½ sera utilisée pour identifier les 11 autres lignées. Il est donc toujours possible d'obtenir une lignée de gonocytes fœtaux chez le rat malgré le caractère somatique des lignées 1 et ½.

3.7 Conclusion

En conclusion, dans cette étude, nous avons déterminé les conditions de culture optimales pour la culture primaires des gonocytes foëtaux. Les gonocytes foëtaux se cultivent ainsi le mieux dans un milieu MEM α supplémenté en bFGF, LIF et SCF, sur un support pré-enduit de laminine. Nous avons également obtenu 2 lignées de cellules immortalisées avec le vecteur d'immortalisation contenant l'antigène large T SV40, Nous n'avons cependant pas encore déterminé à quel type cellulaire ces cellules appartiennent. Toutefois, nos résultats suggèrent que les cellules de ces lignées ne sont pas des cellules germinales, mais plutôt des cellules somatiques. Nous avons également mis au point des techniques d'analyses cellulaires et moléculaires qui permettront de caractériser et d'identifier les lignées cellulaires qui seront éventuellement développées dans le futur. À la fin de notre étude, nous avons en effet pu tester un système de nucléofection qui nous a permis de d'obtenir 11 nouvelles lignées cellulaires. Nous avons ainsi réussi à immortaliser des cellules testiculaires de rat foëtal dont l'identité reste à déterminer, et qui pourront être éventuellement de bons modèles dans des études toxicologiques sur le testicule foëtal.

REFERENCES

- Abramowitz LK & Bartolomei MS (2012) Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Curr Opin Genet Dev* 22(2):72-78.
- Akingbemi BT (2005) Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol* 3:51.
- Alivernini S, Battistelli CL & Turrio-Baldassarri L (2011) Human milk as a vector and an indicator of exposure to PCBs and PBDEs: temporal trend of samples collected in Rome. *Bull Environ Contam Toxicol* 87(1):21-25.
- Allen DD, Caviedes R, Cardenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J & Caviedes PA (2005) Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm* 31(8):757-768.
- Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Nakajima T, Naito H, Ito S, Sasaki S, Cho K, Ikeno T, Nonomura K & Kishi R (2014) Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood: the Hokkaido study on environment and children's health. *PLoS One* 9(10):e109039.
- Aravindakshan J, Paquet V, Gregory M, Dufresne J, Fournier M, Marcogliese DJ & Cyr DG (2004) Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicol Sci* 78(1):156-165.
- Aravindakshan J & Cyr DG (2005) Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway. *Biol Reprod* 72(5):1232-1240.
- Baillie AH (1964) The Histochemistry and Ultrastructure of the Gonocyte. *J Anat* 98:641-645.
- 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.
- Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C & Scherer G (2006) Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 74(1):195-201.
- Barrionuevo F, Burgos M & Jimenez R (2011) Origin and function of embryonic Sertoli cells. *Biomol Concepts* 2(6):537-547.
- Bergmann M & Dierichs R (1983) Postnatal formation of the blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis. *Anat Embryol (Berl)* 168(2):269-275.
- Bork S, Pfister S, Witt H, Horn P, Korn B, Ho AD & Wagner W (2010) DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell* 9(1):54-63.
- Botta S, Cunha GR & Baskin LS (2014) Do endocrine disruptors cause hypospadias? *Transl Androl Urol* 3(4):330-339.

- Boulogne B, Habert R & Levacher C (2003) Regulation of the proliferation of cocultured gonocytes and Sertoli cells by retinoids, triiodothyronine, and intracellular signaling factors: differences between fetal and neonatal cells. *Mol Reprod Dev* 65(2):194-203.
- Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Yolton K, Ye X, Dietrich KN & Lanphear BP (2011) Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics* 128(5):873-882.
- Calafat AM, Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H, Ringer S, Huttner K & Hauser R (2009) Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 117(4):639-644.
- Campolo F, Gori M, Favaro R, Nicolis S, Pellegrini M, Botti F, Rossi P, Jannini EA & Dolci S (2013) Essential role of Sox2 for the establishment and maintenance of the germ cell line. *Stem Cells* 31(7):1408-1421.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N & Skakkebaek NE (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305(6854):609-613.
- Centola GM, Blanchard A, Demick J, Li S & Eisenberg ML (2016) Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: observations from a U.S. sperm bank. *Andrology* 4(2):270-276.
- Cesnulevicius K, Timmer M, Wesemann M, Thomas T, Barkhausen T & Grothe C (2006) Nucleofection is the most efficient nonviral transfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephali with no changes in cell composition or dopaminergic fate. *Stem Cells* 24(12):2776-2791.
- Chen F, Ying GG, Kong LX, Wang L, Zhao JL, Zhou LJ & Zhang LJ (2011) Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. *Environ Pollut* 159(6):1490-1498.
- Chen LY, Brown PR, Willis WB & Eddy EM (2014) Peritubular myoid cells participate in male mouse spermatogonial stem cell maintenance. *Endocrinology* 155(12):4964-4974.
- Chen SR, Tang JX, Cheng JM, Li J, Jin C, Li XY, Deng SL, Zhang Y, Wang XX & Liu YX (2015) Loss of Gata4 in Sertoli cells impairs the spermatogonial stem cell niche and causes germ cell exhaustion by attenuating chemokine signaling. *Oncotarget* 6(35):37012-37027.
- Chiquoine AD (1954) The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 118(2):135-146.
- Combes AN, Wilhelm D, Davidson T, Dejana E, Harley V, Sinclair A & Koopman P (2009) Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol* 326(1):112-120.
- Culty M (2009) Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87(1):1-26.
- De Gendt K, Atanassova N, Tan KA, de Franca LR, Parreira GG, McKinnell C, Sharpe RM, Saunders PT, Mason JI, Hartung S, Ivell R, Denolet E & Verhoeven G (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 Miguel MP, De Boer-Brouwer M, Paniagua R, van den Hurk R, De Rooij DG & Van Dissel-Emiliani FM (1996) Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotropic factor promote the survival of Sertoli cells and gonocytes in coculture system. *Endocrinology* 137(5):1885-1893.
- de Solla SR, Bishop CA, Van der Kraak G & Brooks RJ (1998) Impact of organochlorine contamination on levels of sex hormones and external morphology of common snapping turtles (*Chelydra serpentina serpentina*) in Ontario, Canada. *Environ Health Perspect* 106(5):253-260.
- Delbes G, Levacher C, Pairault C, Racine C, Duquenne C, Krust A & Habert R (2004) Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology* 145(7):3395-3403.
- Delbes G, Levacher C, Duquenne C, Racine C, Pakarinen P & Habert R (2005) Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 146(5):2454-2461.
- Delbes G, Duquenne C, Szenker J, Taccoen J, Habert R & Levacher C (2007) Developmental changes in testicular sensitivity to estrogens throughout fetal and neonatal life. *Toxicol Sci* 99(1):234-243.
- Ehrlich HP, Borland KM, Muffly KE & Hall PF (1986) Contraction of collagen lattice by peritubular cells from rat testis. *J Cell Sci* 82:281-294.
- Finaz C, Lefevre A & Dampfhofer D (1987) Construction of a Leydig cell line synthesizing testosterone under gonadotropin stimulation: a complex endocrine function immortalized by cell hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16):5750-5753.
- Garcia-Castro MI, Anderson R, Heasman J & Wylie C (1997) Interactions between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonad assembly in the mouse embryo. *J Cell Biol* 138(2):471-480.
- Guillette LJ, Jr., Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF & Woodward AR (1994) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102(8):680-688.
- Habert R & Picon R (1984) Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem* 21(2):193-198.
- Habert R, Lejeune H & Saez JM (2001) Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 179(1-2):47-74.
- Hart CA, Nisbet IC, Kennedy SW & Hahn ME (2003) Gonadal feminization and halogenated environmental contaminants in common terns (*Sterna hirundo*): evidence that ovotestes in male embryos do not persist to the pre fledgling stage. *Ecotoxicology* 12(1-4):125-140.

- Hasthorpe S, Barbic S, Farmer PJ & Hutson JM (1999) Neonatal mouse gonocyte proliferation assayed by an in vitro clonogenic method. *J Reprod Fertil* 116(2):335-344.
- Hau J. et al. Schapiro (2011). Handbook of laboratory animal Science, third edition, volume II "Animals Models". *CRC Press*, 740p
- Hofmann MC, Narisawa S, Hess RA & Millan JL (1992) Immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen. *Exp Cell Res* 201(2):417-435.
- Hofmann MC, Van Der Wee KS, Dargart JL, Dirami G, Dettin L & Dym M (2003) Establishment and characterization of neonatal mouse sertoli cell lines. *J Androl* 24(1):120-130.
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dettin L, Johnson E & Dym M (2005) Immortalization of mouse germ line stem cells. *Stem Cells* 23(2):200-210.
- Hoopmann M, Albrecht UV, Gierden E, Huppmann R & Suchenwirth R (2012) Time trends and individual characteristics associated with polybrominated diphenyl ethers in breast milk samples 2006-2009 in Lower Saxony, Germany. *Int J Hyg Environ Health* 215(3):352-359.
- Hughes CS, Postovit LM & Lajoie GA (2010) Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10(9):1886-1890.
- Hutson JC (1990) Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biol Reprod* 43(5):885-890.
- Iwahashi K, Yoshioka H, Low EW, McCarrey JR, Yanagimachi R & Yamazaki Y (2007) Autonomous regulation of sex-specific developmental programming in mouse fetal germ cells. *Biol Reprod* 77(4):697-706.
- Jacobsen F, Mertens-Rill J, Beller J, Hirsch T, Daigeler A, Langer S, Lehnhardt M, Steinau HU & Steinstraesser L (2006) Nucleofection: a new method for cutaneous gene transfer? *J Biomed Biotechnol* 2006(5):26060.
- Jobling S, Beresford N, Nolan M, Rodgers-Gray T, Brighty GC, Sumpter JP & Tyler CR (2002) Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod* 66(2):272-281.
- Kabir ER, Rahman MS & Rahman I (2015) A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol* 40(1):241-258.
- Karl J & Capel B (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* 203(2):323-333.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T & Tilson HA (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4:715-740.

- Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M & Sasaki H (2007) Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 16(19):2272-2280.
- Klaassen C. (2013). Casarett & Doull's Toxicology: The basics science of poisons 8ème édition. *McGraw Hill Professional*, 1473p
- Kemper CH & Peters PW (1987) Migration and proliferation of primordial germ cells in the rat. *Teratology* 36(1):117-124.
- Kerr JB & Knell CM (1988) The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103(3):535-544.
- Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y & Nozawa R (2007) Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 66(6):1160-1164.
- Labelle C. (2000). Endocrine disruptors update. PRB 00-01E, Science and Technology Division. Site internet du gouvernement du Canada ([http://publications.gc.ca/Collection-R/LoPBdP/BP/prb0001-e.htm#RECENT GOVERNMENT MEASURES IN CANADA\(txt\)](http://publications.gc.ca/Collection-R/LoPBdP/BP/prb0001-e.htm#RECENT GOVERNMENT MEASURES IN CANADA(txt)))
- Labosky PA, Barlow DP & Hogan BL (1994) Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* 120(11):3197-3204.
- Lassonde G, Nasuhoglu D, Pan JF, Gaye B, Yargeau V & Delbes G (2015) Ozone treatment prevents the toxicity of an environmental mixture of estrogens on rat fetal testicular development. *Reprod Toxicol* 58:85-92.
- Lassurguere J, Livera G, Habert R & Jegou B (2003) Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *Toxicol Sci* 73(1):160-169.
- Lawson KA & Hage WJ (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182:68-84; discussion 84-91.
- Lees-Murdock DJ, De Felici M & Walsh CP (2003) Methylation dynamics of repetitive DNA elements in the mouse germ cell lineage. *Genomics* 82(2):230-237.
- Li H, Papadopoulos V, Vidic B, Dym M & Culty M (1997) Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology* 138(3):1289-1298.
- Lin L, Zheng LX, Gu YP, Wang JY, Zhang YH & Song WM (2008) [Levels of environmental endocrine disruptors in umbilical cord blood and maternal blood of low-birth-weight infants]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 42(3):177-180.
- Livera G, Rouiller-Fabre V, Durand P & Habert R (2000) Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biol Reprod* 62(5):1303-1314.

- Livera G, Delbes G, Pairault C, Rouiller-Fabre V & Habert R (2006) Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 324(3):507-521.
- Lorenz P, Harnack U & Morgenstern R (2004) Efficient gene transfer into murine embryonic stem cells by nucleofection. *Biotechnol Lett* 26(20):1589-1592.
- Lucas TF, Pimenta MT, Pisolato R, Lazari MF & Porto CS (2011) 17beta-estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis* 1(4):318-324.
- Lyons R, Van de Bittner K & Morgan-Jones S (2014) Deposition patterns and transport mechanisms for the endocrine disruptor 4-nonylphenol across the Sierra Nevada Mountains, California. *Environ Pollut* 195:123-132.
- Maekawa M, Kamimura K & Nagano T (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* 59(1):1-13.
- Magre S & Jost A (1991) Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J Electron Microscop Tech* 19(2):172-188.
- Mahler M & Sundberg JP (1997) Spontaneous Leydig cell tumors in inbred laboratory mice. *Lab Anim Sci* 47(2):148-152.
- Mather JP & Phillips DM (1984) Establishment of a peritubular myoid-like cell line and interactions between established testicular cell lines in culture. *J Ultrastruct Res* 87(3):263-274.
- Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K & Hogan BL (1991) Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353(6346):750-752.
- McIver SC, Stanger SJ, Santarelli DM, Roman SD, Nixon B & McLaughlin EA (2012) A unique combination of male germ cell miRNAs coordinates gonocyte differentiation. *PLoS One* 7(4):e35553.
- Meinhardt A & Hedger MP (2011) Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol* 335(1):60-68.
- Merlet J, Moreau E, Habert R & Racine C (2007)a Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice. *Cell Cycle* 6(18):2258-2262.
- Merlet J, Racine C, Moreau E, Moreno SG & Habert R (2007)b Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9):3615-3620.
- Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O & Roig B (2011) Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health* 8(6):2265-2303.
- Nahar MS, Liao C, Kannan K & Dolinoy DC (2013) Fetal liver bisphenol A concentrations and biotransformation gene expression reveal variable exposure and altered capacity for metabolism in humans. *J Biochem Mol Toxicol* 27(2):116-123.

- Nestor CE, Ottaviano R, Reinhardt D, Cruickshanks HA, Mjoseng HK, McPherson RC, Lentini A, Thomson JP, Dunican DS, Pennings S, Anderton SM, Benson M & Meehan RR (2015) Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems. *Genome Biol* 16:11.
- Nikolic A, Volarevic V, Armstrong L, Lako M & Stojkovic M (2016) Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives. *Stem Cells Int* 2016:1741072.
- Niles KM, Chan D, La Salle S, Oakes CC & Trasler JM (2011) Critical period of nonpromoter DNA methylation acquisition during prenatal male germ cell development. *PLoS One* 6(9):e24156.
- Novi AM & Saba P (1968) An electron microscopic study of the development of rat testis in the first 10 postnatal days. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 86(3):313-326.
- O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM & Huhtaniemi I (1998) Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139(3):1141-1146.
- Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW & Brinster RL (2009) Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development* 136(7):1191-1199.
- Oh S (2014) Disturbance in testosterone production in leydig cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Dev Reprod* 18(4):187-195.
- Olsson IAS, Franco NH, Weary DM et P. Sandøe (2012). The 3Rs principle – mind the ethical gap! *ALTEX Proceedings: Proceedings of the 8 th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal 2011*. 333-336.
- 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 & McGuinness MP (1991) Neonatal gonocytes co-cultured with Sertoli cells on a laminin-containing matrix resume mitosis and elongate. *Endocrinology* 129(2):1119-1121.
- Orth JM, Qiu J, Jester WF, Jr. & Pilder S (1997) Expression of the c-kit gene is critical for migration of neonatal rat gonocytes in vitro. *Biol Reprod* 57(3):676-683.
- Perez CV, Theas MS, Jacobo PV, Jarazo-Dietrich S, Guazzone VA & Lustig L (2013) Dual role of immune cells in the testis: Protective or pathogenic for germ cells? *Spermatogenesis* 3(1):e23870.
- Pognan F, Masson MT, Lagelle F & Charuel C (1997) Establishment of a rat Sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell. *Cell Biol Toxicol* 13(6):453-463.
- Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferre A, Huhtaniemi I, Josso N & di Clemente N (1998) Receptors for anti-mullerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(2):594-599.

- Rebourcet D, O'Shaughnessy PJ, Pitetti JL, Monteiro A, O'Hara L, Milne L, Tsai YT, Cruickshanks L, Riethmacher D, Guillou F, Mitchell RT, van't Hof R, Freeman TC, Nef S & Smith LB (2014) Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Development* 141(10):2139-2149.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L & Donovan PJ (1992) Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359(6395):550-551.
- Rocha MJ, Cruzeiro C, Reis M, Pardal M & Rocha E (2014) Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area. *Environ Monit Assess* 186(6):3337-3350.
- Rolland AD, Lehmann KP, Johnson KJ, Gaido KW & Koopman P (2011) Uncovering gene regulatory networks during mouse fetal germ cell development. *Biol Reprod* 84(4):790-800.
- Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royere D & De Mouzon J (2013) Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod* 28(2):462-470.
- Rouiller-Fabre V, Carmona S, Merhi RA, Cate R, Habert R & Vigier B (1998) Effect of anti-Mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats. *Endocrinology* 139(3):1213-1220.
- Rouiller-Fabre V, Levacher C, Pairault C, Racine C, Moreau E, Olaso R, Livera G, Migrenne S, Delbes G & Habert R (2003) Development of the foetal and neonatal testis. *Andrologia* 35(1):79-83.
- Rouiller-Fabre V, Guerquin MJ, N'Tumba-Byn T, Muczynski V, Moison D, Tourpin S, Messiaen S, Habert R & Livera G (2015) Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: a gapped landscape. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6:58.
- Rwigemera A, Joao F & Delbes G (2017) Fetal testis organ culture reproduces the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes. *Epigenetics Chromatin* 10:19.
- Russel WMS. et RL. Burch (1959) The principles of humane experimental technique. *Methuen & Co. Ltd*, London.
- Saferali A, Grundberg E, Berlivet S, Beauchemin H, Morcos L, Polychronakos C, Pastinen T, Graham J, McNeney B & Naumova AK (2010) Cell culture-induced aberrant methylation of the imprinted IG DMR in human lymphoblastoid cell lines. *Epigenetics* 5(1):50-60.
- Sato T, Sakuma T, Yokonishi T, Katagiri K, Kamimura S, Ogonuki N, Ogura A, Yamamoto T & Ogawa T (2015) Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports* 5(1):75-82.
- Saunders PT, Fisher JS, Sharpe RM & Millar MR (1998) Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol* 156(3):R13-17.

- Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M & Chahoud I (2002) Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 110(11):A703-707.
- Shanmugalingam T, Soultati A, Chowdhury S, Rudman S & Van Hemelrijck M (2013) Global incidence and outcome of testicular cancer. *Clin Epidemiol* 5:417-427.
- Sharpe RM & Skakkebaek NE (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341(8857):1392-1395.
- Sharpe RM (2001) Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett* 120(1-3):221-232.
- Shultz VD, Phillips S, Sar M, Foster PM & Gaido KW (2001) Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 64(2):233-242.
- Sonne C, Leifsson PS, Dietz R, Born EW, Letcher RJ, Hyldstrup L, Riget FF, Kirkegaard M & Muir DC (2006) Xenoendocrine pollutants may reduce size of sexual organs in East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*). *Environ Sci Technol* 40(18):5668-5674.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E & Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16(5):972-978.
- Skinner MK, Dean L, Karmally K & Fritz IB (1987) Rete testis fluid (RTF) proteins: purification and characterization of RTF albumin. *Biol Reprod* 37(1):135-146.
- Stanley LA. (2014). Molecular and cellular toxicology: An introduction. *Wiley Blackwell*. 434p
- Strommen K, Lyche JL, Blakstad EW, Moltu SJ, Veierod MB, Almaas AN, Sakhi AK, Thomsen C, Nakstad B, Braekke K, Ronnestad AE, Drevon CA & Iversen PO (2016) Increased levels of phthalates in very low birth weight infants with septicemia and bronchopulmonary dysplasia. *Environ Int* 89-90:228-234.
- Takahashi M, Tatsugi Y & Kohno T (2004) Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocr J* 51(4):425-434.
- Tan KA, De Gendt K, Atanassova N, Walker M, Sharpe RM, Saunders PT, Denolet E & Verhoeven G (2005) The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 146(6):2674-2683.
- Toms LM, Guerra P, Eljarrat E, Barcelo D, Harden FA, Hobson P, Sjodin A, Ryan E & Mueller JF (2012) Brominated flame retardants in the Australian population: 1993-2009. *Chemosphere* 89(4):398-403.
- Toppari J, Virtanen HE, Main KM & Skakkebaek NE (2010) Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88(10):910-919.

- Tung PS, Skinner MK & Fritz IB (1984) Cooperativity between Sertoli cells and peritubular myoid cells in the formation of the basal lamina in the seminiferous tubule. *Ann N Y Acad Sci* 438:435-446.
- Turyk ME, Anderson HA, Steenport D, Buelow C, Imm P & Knobeloch L (2010) Longitudinal biomonitoring for polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in residents of the Great Lakes basin. *Chemosphere* 81(4):517-522.
- van den Driesche S, Kilcoyne KR, Wagner I, Rebourcet D, Boyle A, Mitchell R, McKinnell C, Macpherson S, Donat R, Shukla CJ, Jorgensen A, Meyts ER, Skakkebaek NE & Sharpe RM (2017) Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. *JCI Insight* 2(6):e91204.
- van den Ham R, van Pelt AM, de Miguel MP, van Kooten PJ, Walther N & van Dissel-Emiliani FM (1997) Immunomagnetic isolation of fetal rat gonocytes. *Am J Reprod Immunol* 38(1):39-45.
- van Dissel-Emiliani FM, de Boer-Brouwer M, Spek ER, van der Donk JA & de Rooij DG (1993) Survival and proliferation of rat gonocytes in vitro. *Cell Tissue Res* 273(1):141-147.
- Van Dissel-Emiliani FM, De Boer-Brouwer M & De Rooij DG (1996) Effect of fibroblast growth factor-2 on Sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period. *Endocrinology* 137(2):647-654.
- van Pelt AM, de Rooij DG, van der Burg B, van der Saag PT, Gustafsson JA & Kuiper GG (1999) Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology* 140(1):478-483.
- van Pelt AM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij DG & van Dissel-Emiliani FM (2002) Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology* 143(5):1845-1850.
- Vecino P, Urange JA, Alonso A & Aréchaga J (2001) Immortalization of type A spermatogonia using the SV40 Large T Antigen. *Int. J. Dev. Biol* 45(S1):S161-S162
- Vergouwen RP, Jacobs SG, Huiskamp R, Davids JA & de Rooij DG (1991) Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* 93(1):233-243.
- 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.
- Virtanen HE & Adamsson A (2012) Cryptorchidism and endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol* 355(2):208-220.
- Walker WH & Cheng J (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130(1):15-28.
- Wang ZX, Wreford NG & De Kretser DM (1989) Determination of Sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods. *Int J Androl* 12(1):58-64.

- Wang Y, Thuillier R & Culty M (2004) Prenatal estrogen exposure differentially affects estrogen receptor-associated proteins in rat testis gonocytes. *Biol Reprod* 71(5):1652-1664.
- Wartenberg H (1976) Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of the "Gonia". *Andrologia* 8(2):117-130.
- Weber S, Eckert D, Nettersheim D, Gillis AJ, Schafer S, Kuckenberg P, Ehlermann J, Werling U, Biermann K, Looijenga LH & Schorle H (2010) Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance. *Biol Reprod* 82(1):214-223.
- Welsh M, Saunders PT, Fiskens M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB & Sharpe RM (2008) Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 118(4):1479-1490.
- Wen L, Yuan Q, Sun M, Niu M, Wang H, Fu H, Zhou F, Yao C, Wang X, Li Z & He Z (2017) Generation and characteristics of human Sertoli cell line immortalized by overexpression of human telomerase. *Oncotarget* 8(10):16553-16570.
- Wilhelm D, Palmer S & Koopman P (2007) Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87(1):1-28.
- Winnall WR & Hedger MP (2013) Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: a new regulatory model. *J Reprod Immunol* 97(2):147-158.
- WHO (2013). State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals. *United Nations Environment Programme and the World Health Organization*. 289p
- Wuttke W, Jarry H & Seidlova-Wuttke D (2010) Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones (Athens)* 9(1):9-15.
- Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T & Nabeshima Y (2006) The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 133(8):1495-1505.
- Yang O, Kim HL, Weon JI & Seo YR (2015) Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J Cancer Prev* 20(1):12-24.
- Yasuda Y, Kihara T & Tanimura T (1985) Effect of ethinyl estradiol on the differentiation of mouse fetal testis. *Teratology* 32(1):113-118.
- You L & Sar M (1998) Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. *Endocrine* 9(3):253-261.
- Yu X, Sidhu JS, Hong S & Faustman EM (2005) Essential role of extracellular matrix (ECM) overlay in establishing the functional integrity of primary neonatal rat Sertoli cell/gonocyte co-cultures: an improved in vitro model for assessment of male reproductive toxicity. *Toxicol Sci* 84(2):378-393.

- Zeitelhofer M, Vessey JP, Xie Y, Tubing F, Thomas S, Kiebler M & Dahm R (2007) High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc* 2(7):1692-1704.
- Zeng W, Tang L, Bondareva A, Luo J, Megee SO, Modelski M, Blash S, Melican DT, Destrempe MM, Overton SA, Gavin WG, Ayres S, Echelard Y & Dobrinski I (2012) Non-viral transfection of goat germline stem cells by nucleofection results in production of transgenic sperm after germ cell transplantation. *Mol Reprod Dev* 79(4):255-261.
- Zhao GQ & Garbers DL (2002) Male germ cell specification and differentiation. *Dev Cell* 2(5):537-547.
- Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS & Hess RA (2002) Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 23(6):870-881.
- Zogbi C, Tesser RB, Encinas G, Miraglia SM & Stumpp T (2012) Gonocyte development in rats: proliferation, distribution and death revisited. *Histochem Cell Biol* 138(2):305-322.